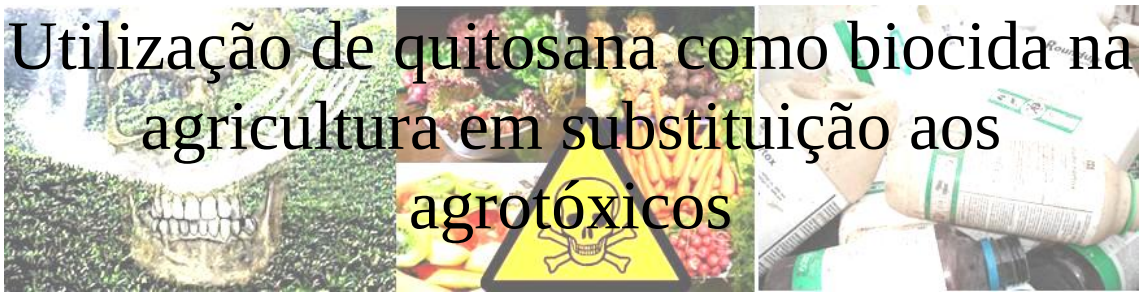
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA REGIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E MEIO AMBIENTE

SÉRGIO ROBERTO CABRAL DE ALCATARA

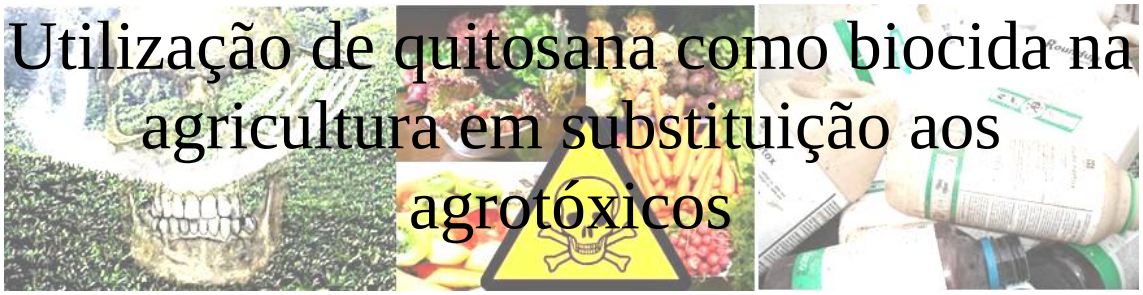
Utilização de quitosana como biocida na agricultura em substituição aos agrotóxicos



2011
João Pessoa – PB
Brasil

SÉRGIO ROBERTO CABRAL DE ALCATARA

Utilização de quitosana como biocida na agricultura em substituição aos agrotóxicos



Dissertação apresentada ao Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr Alberto Kioharu Nishida.

2011

João Pessoa – PB

Brasil

A347u *Alcântara, Sérgio Roberto Cabral de.*
Utilização de quitosana como biocida na agricultura em substituição aos agrotóxicos / Sérgio Roberto Cabral de Alcântara.- João Pessoa, 2011.
93f. : il.
Orientador: Alberto Kioharu Nishida
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Agrotóxicos. 2. Quitosana. 3. Agricultura.

UFPB/BC *CDU: 661.163(043)*

SÉRGIO ROBERTO CABRAL DE ALCATARA

Utilização de quitosana como biocida na agricultura em substituição aos agrotóxicos

Dissertação submetida ao Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente.

Aprovada em: _____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Alberto Kioharu Nishyda – UFPB
(Orientador)

_____

Profª. Dra. Cristina Crispim – UFPB
(Examinador Interno)

_____

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná – UFRPE
(Examinador Externo)

DEDICATÓRIA

À todo aquele povo que vem sem ser chamado
Que entra sem ser convidado
E vai embora sem ser mandado
Mas que sempre tá peito guardado.
É a minha família, cheia de mulheres e homens arretados
Que fizeram de tudo com amor e carinho
Para que hoje eu acabasse o mestrado.

AGRADECIMENTOS (ao povo do interior)

Este trabalho trás em cada letra
Um coração pra meu povo matuto
Pra Chiquinho filho de Zequinha
Irmão de "Nhô" Joaquim
De Gravatá, Pernambuco.
Tras as rimas cansadas
Como o olhar de Zé de Zôia
Uma seresta e uma pinga
Para as noites frias e de garoas

Para a bruguelada do compadre Nado
Que nos apadrinhamos em uma fogueira
Mando cheiros e abraços
Mando força e carinho
E uma saudade arretada
Dos banhos no açude vizinho

Mando um beijo bem forte
Pra minha quase mãe Severina
A mãe de toda minha familha
Ligia, Marcelo e Zezinho,
Novilha e Cícera, que é Ninha,
A mãe do meu afilhado Luizinho

Para Tizio peço a bensa
E mando uma pinga brejeira
O cabra que nunca fez questão
De emprestar sua égua ligeira
E para toda pinguça Liliu, Vanderli e Zé bocão
Mando a frase de todo bêbado
Para mim você é mesmo um irmão

Para aqueles que já foram
Desse mundo de meu Deus
Desejo apenas a paz
O descanço que mereceu
Não mando as flores que plantaram
Não mando vela nem oração
Fico aqui na saudade
De todos esses irmãos.

Jurandir é inesquecível
Canta samba feito a peste
Sabe de tudo da vida alheia
De todo vilarejo conhece
Lebra da mulher amada
Toma um copo ligeiro
O problema é que depois de bêbado
Esquece onde é o banheiro

Para Noca e Carmina
Que são flores rosa e cravo
So desejo que desencalhe
Tire o santo Antônio do copo
Pois o santo não é escravo
Fica uma Biliu
E a outra com Tôim Rego
Pois pra encarar mulher feia
Só o cabra tando "bêbo".

Pra Thaisinha, Wedja e Maria
As jovens flores do jardim
Estudem sempre muito
E continuem lindas assim
Eu espero até crescer
Pra fazer um dia um encanto
Pois mulher loira, carro disel e nelore
Tem mercado em todo canto.

Para Lidiane e Daniel
Que alem de compadre é afilhado
Pai da minha afilhada Ayana
Neta de Alberto Delegado
Casado com comadre Lucia
Mando afagos e mando beijos
Pense nom povo Arretado!

Muitos Beijos, abaços e sossego
Para todo meu povo da Limeira
Se esqueci de alguém me perdoe
Pois é muita gente pra lembrar
Termino esse trabalho correndo
Pois o peito tá doendo
De saudade de Gravatá.

AGRADECIMENTOS (Ao povo da Capitá)

Já se passaram dois anos
Dês do inicio do mestrado
Conheci muita gente Boa
Marcio, Eugênio e Thiago
Maria Lucia la do Ácre
Terra que ninguém viu mais existe
So de pensar na nossa distância
O peito de feliz fica triste

Katiana a amarelinha
De sorriso de criança
A "maga" Luciana ou Lígia
Que agora tá distante
São meninas de alma pura
Que quero junto a todo instante

Padre Valnir, o homem que cria gia
Abensoado o seu beiço
Que de cachaça se enchia
Brabo danado o sugeito
Mas prum cabra desse quilate
So tenho amor e respeito

Fabiana é menina da praia
Michele filha Cuti-cuti
Gisele a grande botânica
Que de planta sabe e curti
Para todas elas na vida
Muita paz, saúde e dinheiro
E se alguma tá encalhada
Que arrange um bom companheiro

Marcio é o cara mais nerd
Henrique o mais calado
Tati a mais magrinha
Andre o mais virado
Mais o incrível de todos eles
É o amor bem devotado

O Irmão mais velho
Quase que vovô Smurf
E o Claudio Lessa
Que todos levam no coração
Abraço forte em você
Namastê! Meu irmão

Andersom é um grande amigo
A quem tenho especial atenção
E o bom é que o peste canta
Musica do mundo e de irmão
So não sei porque até hoje
Nunca me cantou uma canção

Os estagiários do laboratório
La da microbiologia
Quebravam tanto galho
Que chega dava agonia
Mas estagiário é pra isso mesmo
Tem que fazer pra aprender
Se faz certo ganha banana
Pra depois refazer

Netinho é meu irmão caçula
Menino prodígio de onze anos
Acompanhou todo o processo
Aprendeu tudo sem engano
Hoje é quase um doutor
E dentro da pesquisa já faz plano

A velha Zilda la da Penha
Estudou tudo comigo
Me deu aula sobre meio ambiente
Sobre vida e equilíbrio
Mesmo sem saber escrivinhar
Sabe de tudo um bocado
Até mestre Guy ficou besta
Com tanto conhecimento guardado

Thata miha amada Esposa,
Ou noiva, ou namorada
Fez da minha dissertação
Uma parte de sua estrada
E de tanto ajudar
Já tá cansada a coitada

A os meus amados professores
Que no PRODEMA me ensinaram
Cada um é um amigo
Um companheiro de mestrado
Agradeço a paciência
A lição foi aprendida
O resto é com a vida
Ou dentro do doutorado

"A História não é repetitiva, mas recursiva: como um ponto que se desloca em espiral ascendente, cuja projeção vai traçando e redesenhando uma circunferência. Quem enxerga apenas essa projeção, não só pensará que tudo se repete, como também agirá dessa forma, tentando segurar a roda da História, como outros já o fizeram.

Nunca vencerão, mas terão deixado como legado imensos prejuízos à humanidade pelo atraso na aplicação de conhecimentos, que poderiam minimizar nossos sofrimentos há mais tempo. A imagem que Humberto Maturana criou, de um carro num atoleiro, é bastante esclarecedora: quem olhar somente para as rodas do automóvel, nunca saberá se ele está andando ou atolado...

Pode parecer uma contradição, mas somente com uma agricultura cada vez mais tecnificada, ou seja, mais produtiva, será possível preservar e recuperar o ambiente em que vivemos. O avanço na ciência, ou seja, no conhecimento, é a única forma capaz de acompanhar e até de ultrapassar o crescimento geométrico da população do planeta e é a principal base de sustentação para qualquer sonho de justiça social.

Com o advento da biotecnologia, a era dos agroquímicos está no fim, mas teve um papel importante. Entretanto, não fossem esses, calculam os especialistas, estaríamos hoje no mundo utilizando uma área de terras três vezes superior, e as catástrofes geradas pela fome seriam bem mais trágicas do que aquela que matou mais de um milhão de pessoas no século 19, na Irlanda, devido a "requeima" da batatinha sem considerar a falta de estatísticas referentes aos milhões de mortos, devido às destruições de extensas regiões causadas pelas, literalmente, quilométricas nuvens de gafanhotos, que dizimavam tudo que fosse verde.

A agricultura convencional não tem mais condições de suportar os novos desafios para a humanidade, pois já teve seu potencial esgotado. É consenso entre os cientistas que o próprio melhoramento genético convencional esgotou-se pela falta de variabilidade genética dentro da espécie. Os agrotóxicos, por exemplo, não têm sido mais eficientes para controlar insetos-praga e doenças das plantas, pois a velocidade com que adquirem resistência aos produtos químicos é maior do que a velocidade de elaboração de novas fórmulas de defensivos agrícolas por parte da indústria.

E o desafio central é o de produzir mais e com melhor qualidade, em áreas de terras cada vez mais reduzidas, pelo avanço da urbanização e necessidade de preservação ambiental. Felizmente, ao invés de um abismo, temos pela frente a Revolução da Biotecnologia, tendo a engenharia genética como principal ferramenta e os organismos geneticamente modificados (OGMs) como a solução básica para essa nova etapa.

Dentre os OGMs, as plantas transgênicas ocupam um lugar importante, pois são elas que estão revolucionando a agricultura. Não há mais barreiras entre espécies e nem propriamente cruzamentos. Qualquer ser vivo pode fornecer um gene (uma determinada característica) para outro. Um gene que interessa pode ser isolado e clonado (multiplicado) em laboratório. Após, pode ser introduzido na variedade de planta que interessa (geralmente uma que está em cultivo). A variedade recebe, então, o novo caráter, sem os inconvenientes do método convencional, o que torna o melhoramento genético bem mais eficiente e seguro.

Variedades resistentes ou tolerantes a espécies- praga, dispensando o uso de agrotóxicos, adaptadas ao frio, ao calor e à seca, a solos encharcados, a solos ácidos, a solos salinos, a solos pobres e outros caracteres, preservando e recuperando o ambiente, certamente proporcionarão mais segurança de colheita e maior previsibilidade. Cultivares com melhor qualidade industrial e com características

especiais facilitarão a comercialização da produção em razão da procura pela indústria e pelo maior interesse dos consumidores... Enfim, a agricultura, com o apoio da biotecnologia, encaminhar-se-á definitivamente para ser uma atividade de alta precisão, com o que os produtores rurais e, conseqüentemente, toda a sociedade serão beneficiados.

Sustentabilidade, portanto, só é vislumbrada com avanços; jamais com recuos. Com raras exceções, não é por acaso que nos países mais avançados tecnologicamente a natureza tem sido tratada com mais cuidado e as desigualdades sociais são cada vez menores.

A Revolução Verde, amaldiçoada por muitos, foi uma solução revolucionária importante, mas que, como toda a tecnologia, vem com riscos e benefícios. Hoje se sabe que se fossem minimizados os riscos e maximizados os benefícios, os impactos ambientais teriam sido bem menores. É preciso analisar a questão sob o prisma daquela época e perguntar se com os conhecimentos e consciência que se tinha seria possível detectar o que hoje vemos com clareza. Isso, entretanto, não é motivo para que muitos levem ao extremo o Princípio da Precaução, preferindo nada fazer a correr o risco de fazer alguma coisa. Tais interpretações extremistas e equivocadas de algumas Organizações Não-Governamentais (ONGs) levam a que foquem apenas os riscos das tecnologias ou inovações e ignorem os riscos da própria estagnação, que, por restrição ou banimento de avanços tecnológicos, podem criar grandes problemas aos humanos e imensos riscos ambientais.

Por conseguinte, a mais antiga forma de contaminação ambiental (por fezes) ainda é a mais grave, apesar da tecnologia disponível ser suficiente para eliminá-la totalmente, o que demonstra que a causa principal da poluição mais devastadora do ambiente reside principalmente na questão político-econômica. Entretanto, muito pouco se tem feito relativamente a esse problema, tanto que não se tem visto nenhuma ONG protestando contra essa forma de poluição em lugar nenhum. Seria também razão dessa ordem, esse descaso, por parte das ONGs?

Igualmente, a mais moderna forma de contaminação ambiental, ou seja, resultante da emissão de gases dos veículos automotores, que comprometem significativamente a camada de ozônio, pouco ou nenhum protesto tem provocado, de tal forma que as providências para diminuição desse tipo de poluição têm partido dos próprios governos e dos fabricantes.

É bastante intrigante que os protestos e campanhas nos países do Terceiro Mundo sejam praticamente apenas concentrados em tecnologias novas ou de ponta, como a energia nuclear e a biotecnologia, por parte da maioria das ONGs. Não seria mais uma manobra por parte do Primeiro Mundo para manter os países subdesenvolvidos afastados de tecnologias estratégicas?

A história não é repetitiva, mas recursiva. Assim como tecnologias esgotadas têm sido recicladas à luz dos novos conhecimentos, a resistência fanática e dogmática aos avanços tecnológicos nada mais é do que efeito da recursividade do obscurantismo, reacionário ao caráter perfectível do Espírito Humano."

Luiz Alberto Silveira Mairesse, Ervandil Corrêa Costa
Contaminação ambiental pela agricultura e as novas perspectivas com a moderna biotecnologia pag 09-12 – Orium, 2009.

UTILIZAÇÃO DE QUITOSANA COMO BIOCIDA NA AGRICULTURA EM SUBSTITUIÇÃO AOS AGROTÓXICOS

RESUMO

Os agrotóxicos modernos surgiram na metade do século XIX, com o intuito de promover o controle de pragas nas áreas de cultivo ao redor do mundo. A modernização e o crescer do conhecimento sobre a química junto ao desenvolvimento de variedades mais produtivas de plantas na revolução verde nos proporcionou um considerável incremento na produtividade das lavouras, entretanto, essa combinação acabou por causar uma série de outros problemas de ordem social, econômica e ambiental não esperados até então como o envenenamento de pessoas e animais, perda de biodiversidade, alterações drásticas nos ecossistemas e contaminações imensuráveis devido a falta de conhecimento sobre a conseqüência do uso destes produtos. Na atualidade, a busca de novas tecnologias, tenta remediar os problemas causados pelos agrotóxicos e a formulação de novos produtos que venham a apresentar maior eficácia e eficiência no combate aos problemas relacionados aos cultivos em todo mundo, mas que ao mesmo tempo seja menos danoso ao meio ambiente e ao homem. Tendo em vista este novo paradigma, o presente trabalho objetivou testar o potencial de quitosana como fungicida e bactericida em substituição aos agrotóxicos.

Palavras-Chave: 1. Agrotóxicos. 2.quitosana . 3.Agricultura

ABSTRACT

The modern pesticides have emerged in the mid-nineteenth century, with the aim of promoting the control of pests in the growing areas around the world. The modernization and growth of knowledge about chemistry with the development of more productive varieties of plants in the green revolution resulted in a considerable increase in crop yields, however, this combination will eventually cause a host of other problems in the social, economic and environmental not expected until then as the poisoning people and animals, loss of biodiversity, drastic changes in ecosystems and immeasurable contamination due to lack of knowledge about the consequence of using these products. Currently, the search for new technologies, try to remedy the problems caused by pesticides and formulation of new products that will provide greater efficiency and effectiveness in dealing with problems related to crops worldwide, but at the same time is less damaging to the environment and man. Given this new paradigm, this study aimed to test the potential of chitosan as a fungicide and bactericide to replace pesticides.

Keywords: 1. Pesticides. 2. Chitosan. 3. Agriculture

LISTA DE IMAGENS E DIAGRAMAS

Figura 1	Estrutura química da quitina. Fonte: Signini, 2002	39
Figura 2	Estrutura química da quitosana. Fonte: Signini, 2002	40
Figura 3	Esquema da reação de N-desacetilação da quitina para obtenção de quitosana. Fonte: Anjos (2005)	40
Figura 4	Mapa de Pernambuco com a localização do município de Gravatá. Fonte IBGE 2008	52
Figura 5	Estocagem do defensivo. (A) Em saco plástico próximo à área de produção. (B) A céu aberto, junto a entulhos domésticos. (C) Bombas de aplicação, sacos de pesticidas e barril de preparo deixados ao relento. Fonte ANTEAG.	58
Figura 6	Aplicação de defensivos sem utilização de EPI's. Fonte ANTEAG	59
Figura 7	Descrição esquemática da extração de quitina e quitosana segundo método descrito por Stamford *et al.* (2007)	64
Figura 8	Curva de crescimento da *Cunninghamella elegans* (UCP 542), *Mucor rouxxi* (UCP 064), *Mucor javanicus* (UCP 049) e *Rhizopus orizae* (UCP 402) no meio Jacatupé durante 96 horas de cultivo a 28°C e sob agitação orbital de 150rpm	70
Figura 9	Produção de quitina (A) e de quitosana (B) em mg por grama de biomassa seca de *Cunninghamella elegans* (UCP 542), *Mucor rouxxi* (UCP 064), *Mucor javanicus* (UCP 049) e *Rhizopus orizae* (UCP 402) no meio Jacatupé durante 96 horas de cultivo a 28°C sob agitação orbital de 150rpm, em intervalos de 24 horas	72
Figura 10	Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) das amostras de quitosana extraídas das biomassas de *Cunninghamella elegans* (A), *Mucor rouxxi* (B), *Mucor javanicus* (C) e *Rhizopus orizae* (D) crescidas em meio Jacatupé	73
Figura 11	Crescimento radial de *Aspergillus flavus* na ausência de quitosana (A), na presença de quitosana desacetilada em concentração abaixo da Mínima Inibitória (B) e na concentração Mínima Inibitória (C)	78

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	Principais compostos organofosforados vendidos no Brasil. Fonte: Caldas L.Q.A., 2000	22
Tabela 2	Carbamatos mais vendidos no Brasil. Fonte: Caldas L.Q.A., 2000	24
Tabela 3	Principais compostos piretroides vendidos no Brasil. Fonte: Caldas L.Q.A., 2000	25
Tabela 4	Dados consolidados do PARA. Fonte: PARA, 2008	28
Tabela 5	Inseticidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	35
Tabela 6	Fungicidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	35
Tabela 7	Herbicidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	36
Tabela 8	Desfolhantes: classificação segundo seu grupo químico e quanto a à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	36
Tabela 9	Fumigantes: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	37
Tabela 10	Raticidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	37
Tabela 11	Moluscocidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	37
Tabela 12	Nematicidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003.	38
Tabela 13	Acaricidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto a à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003	38
Tabela 14	Classificação dos agrotóxicos quanto ao risco à saúde. Fonte: IMA (1999) *apud* SANTOS (2003)	38

Tabela 15	Classificação de periculosidade ambiental dos agrotóxicos. Fonte: IMA (1999) *apud* Santos (2003)	39
Tabela 16	Agrotóxicos mais utilizados pelos produtores rurais da Limeira e seus grupos químicos. Fonte ANTEAG 2008	57
Tabela 17	Valores de referência do potencial de irritação das substâncias	68
Tabela 18	Valores de grau de desacetilação (*GD*) e massa molar média viscosimétrica (*Mv*) das amostras de quitosana extraídas das biomassas de Mucorales crescidas em meio Jacatupé	73
Tabela 19	Avaliação do potencial de irritação da quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* (Qce), Quitosana desacetilada a 95% (Qce6H), Quitosana despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce)	74
Tabela 20	Avaliação da biocompatibilidade da quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* (Qce), Quitosana desacetilada a 95% (Qce6H), Quitosana despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce)	75
Tabela 21	Atividade antimicrobiana da quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* (Qce), Quitosana desacetilada a 95% (Qce6H), Quitosana despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce) para patógenos pré e pós-colheita isolados de frutas, grãos e flores tropicais da Limeira	76
Tabela 22	Crescimento radial dos fungos filamentosos na presença de quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce) nas concentrações abaixo da Mínima Inibitória e na concentração Mínima Inibitória (CMI)	77

SUMÁRIO

Topicos	**Pag**
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Principais defensivos agrícolas	18
3.1.1 Organoclorados	18
3.1.2 Organofosforados	21
3.1.3 Carbamatos	23
3.1.4 Piretroides	24
3.2 A produção e o uso de defensivos agrícolas no Brasil e no mundo	26
3.3 Os riscos à segurança alimentar causados por resíduos	27
3.4 Evidências e efeitos da exposição das comunidades rurais aos agrotóxicos	31
3.5 Leis dos agrotóxicos	32
3.6 Classificação dos agrotóxicos	34
3.7 Considerações gerais sobre a quitina e quitosana	39
3.8 Produção de quitina e quitosana	40
3.9 Aplicações da quitosana na agricultura	41
3.10 Atividade antifúngica e antibacteriana	42
3.11 Indução de resistência a patógenos	45
3.12 Efeitos da quitosana na fixação biológica do N^2	51
4 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA	51
4.1 Caracterização do município de Gravatá	51
4.2 Localização e acesso	52
4.3 Aspectos socioeconômicos	53
4.4 Aspectos fisiográficos	54
4.5 Recursos hídricos	54
4.5.1 Águas superficiais	54

4.5.2 Águas subterrâneas (Domínios hidrogeológicos)	55
4.6 O vilarejo da Limeira	55
4.7 Obtenção dos agrotóxicos	56
4.8 Estocagem dos defensivos	57
4.9 Preparação e aplicação dos agrotóxicos	58
5 METODOLOGIA	61
5.1 Cepas utilizadas para a produção de quitosana	61
5.2 Cepas testes utilizadas para revelação de atividade antimicrobiana	61
5.2.1 Bactérias	61
5.2.2 Fungos	61
5.3 Meios de cultivo	62
5.4 Manutenção dos micro-organismos e padronização do inóculo	62
5.5 Consumo de glicose e de proteínas totais	63
5.6 Determinação do pH	63
5.7 Produção de quitosana	64
5.8 Extração de quitosana	64
5.9 Caracterização das quitosanas	65
5.9.1 Determinação do grau de desacetilação (DD%)	65
5.9.2 Determinação do peso molecular	65
5.9.3 Desacetilação da quitosana	65
5.9.4 Despolimerização da quitosana	66
5.9.5 Preparo do cloridrato de quitosana (quitosana solúvel em água)	66
5.9.6 Preparação das soluções de quitosana	66
5.10 Teste da membrana corioalantoide do ovo - Teste de biocompatibilidade	67
5.11 Atividade antimicrobiana	68
5.12 Interferência sobre o crescimento micelial radial de fungos filamentosos	69
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1 Produção, extração e caracterização de quitosana por fungos da ordem Mucorales em meio Jacatupé	70
6.2 Biocompatibilidade das soluções de quitosana	74

6.3 Atividade antimicrobiana	75
6.4 Crescimento radial dos fungos filamentosos	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

As pragas agrícolas sempre foram um grande problema para o processo agrário mundial. A historia é cercada de relatos desses eventos, os quais causaram fome e perda de biodiversidade. Tais efeitos podem ser exemplificados com a perda das plantações de arroz na Índia por fungos; a devastação da cultura de cacau pela vassoura-de-bruxa na região de Itabuna e Ilhéus, na Bahia, a qual, além de consequências econômicas, ocasionou sérios problemas sociais como o êxodo rural e o desemprego, e ecológicos, como a destruição de partes da mata atlântica; diminuição drástica das populações de águias, falcões e açores, na década de 80 devido a fragilidade dos ovos pela ação dos agrotóxicos, entre outros. Assim, as pragas agrícolas apresentam forte repercussão na economia sendo uma grande promotora, em muitos casos, de sérios problemas sociais como o êxodo rural e o desemprego (RYAN, 2004).

Na tentativa de se obter domínio sobre as pragas o homem lança mão de métodos físicos, químicos e biológicos de controle, sendo o químico o mais utilizado. O uso indiscriminado de defensivos agrários, associado à desinformação por parte dos agricultores sobre os métodos de aplicação e os riscos da utilização dos agrotóxicos tem iniciado uma cadeia de eventos catastrófica causando resistência das pragas, antes sensíveis aos venenos.

Isso gerou a falsa ideia da necessidade de se colocar quantidades maiores, por parte dos agricultores, e a produção de novos agrotóxicos ainda mais fortes por parte das indústrias químicas, o que vem colocando em risco a saúde dos agricultores e seus familiares assim como a dos consumidores finais desses produtos e de todo meio ambiente (BADACH, *et al.*., 2000).

Os agrotóxicos aplicados a qualquer sistema de cultivo são transportados para o solo pelas águas da irrigação e/ou chuvas seguindo três prováveis caminhos: ser degradado pela luz, calor ou interação com outras partículas do solo, bactérias etc., o que gera produtos muitas vezes mais ofensivos que o composto original; serem carreados pelas enxurradas até os rios, contaminando-os e permear o solo com alto ou baixo grau de adsorção atingindo os lençóis freáticos, contaminando as fontes de água potáveis subterrâneas (BUOSI & FELFILI, 2004; RISSATO, *et al.*., 2004).

É imperativo mediante esse quadro, o desenvolvimento de metodologias para degradação e retirada desses agrotóxicos do meio ambiente, buscando-se processos

rápidos, baratos e que apresentem resultados satisfatórios no sequestro de agrotóxicos. A quitosana devido as suas propriedades específicas está sendo largamente estudada para emprego no processo de remoção de venenos agrários como também no controle de pragas e de micro-organismos patogênicos, por se tratar de uma substância natural e de fácil aquisição (SYNOWIECKI e AL-KHATTEB, 2003; STAMFORD *et al.*, 2008).

Frente à contaminação do meio ambiente e dos seres vivos por agrotóxicos, principalmente organoclorados, e o alto poder teratogênico e toxigênico que esses produtos apresentam, faz-se necessária a utilização de substâncias naturais atóxicas que apresentem propriedades biocidas para aplicação como agente controlador de pragas agrárias e que possibilitem a remoção dos agrotóxicos sintéticos dos solos e águas contaminados. Dessa forma o presente projeto de pesquisa tem por objetivo testar o potencial da quitosana em substituição aos agrotóxicos fungicidas e bactericidas utilizados nas diversos tipos culturas desenvolvidas no vilarejo sítio da Limeira, em Gravatá-PE.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Testar o potencial da quitosana em substituição aos agrotóxicos fungicidas e bactericidas utilizados nos diversos tipos de culturas desenvolvidas no vilarejo sítio da Limeira em Gravatá – PE.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar fisico-quimicamente a quitosana fúngica produzida em meio jacatupé;
- Obter quitosana solúvel em agua e estável em pH neutro, na forma de cloridrato de quitosana;
- Testar o potencial da quitosana e do cloridrato de quitosana como agente fungicida e fungiostático;
- Testar o potencial da quitosana e do cloridrato de quitosana como agente bactericida e bacteriostático.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Principais defensivos agrícolas

3.1.1 Organoclorados

Os defensivos organoclorados são considerados os defensivos agrícolas menos tóxicos, pois raramente causam manifestações de forma aguda. Todavia, apresentam um poder de intoxicação crônica maior do que os organofosforados ou os carbamatos (RIBEIRO & MACHADO, 1991).

Uma característica marcante dos compostos organoclorados é a alta persistência no meio ambiente, podendo permanecer no solo por mais de três decênios, após sua aplicação e ainda poder se acumular nos tecidos biológicos. Além disso, o seu uso, como foi o caso do DDT, não foi eficiente no combate aos ácaros e outros grupos de insetos, frequentemente causando desequilíbrio biológico (ELLENHORN, 1997).

O BHC, inseticida organoclorado, em meio alcalino, se decompõe produzindo o ácido clorídrico e o tetraclorobenzeno, caracterizando sua ação residual. O lindane, isômero gama do BHC, perde cloro em meio básico e se transforma em triclorobenzeno, que é volátil e age sobre os insetos por inalação, contato e/ou ingestão (GARCIA, 2001).

Mais tarde, surgiram outros compostos como audrin, dieldrin e heptacloro, em 1948, e o endrin, em 1951. Finalmente, surgiram o telodrim, toxafeno e dodecacloro, que foram utilizados intensamente até 1970 (COUMOL *et al.*., 2002).

Os altos níveis de organoclorados na água do mar têm ocasionado vários problemas ambientais como, por exemplo, o fracasso da reprodução da truta-do-mar, na Laguna Madre, no Texas (TOPOS, 1999). O DDT, também pode ser detectado em golfinhos na área que vai desde o litoral paulista até as regiões da Antártida (CAMPANILLI, 2004).

O DDT sofre transformação por duas vias: uma oxidativa e outra redutora (You *et al.*., 1996). Na via oxidativa, o *p,p'*-DDT perde um átomo de cloro e outro de hidrogênio transformando-se em *p,p'*-DDE (diclorodifenil-etileno). Muitos dos organoclorados presentes no mar, e 80% dos presentes nos organismos marinhos estão na forma de *p,p'*-DDE, que é a forma mais persistente, porém menos tóxica, e

provavelmente quase a sua totalidade é derivada da degradação de *p,p'*-DDT (CLARK, 2001).

O DDE tem sido apontado como responsável pela deficiência na formação da casca dos ovos das aves, causando fragilidade das cascas que findam por se quebrarem antes do tempo correto para a sua eclosão o que tem diminuído drasticamente a população de águias, falcões e açores, na década de 1980, no ecossistema mundial (SOLOMONS, 1989; TAN, 1994).

Análises realizadas em leite materno na década de 1990 forneceram dados alarmantes em várias partes do mundo. Com a presença de DDE e Lindano em praticamente todas as amostras. Outros organoclorados, como DDT, Endrin e Endossulfan I também foram encontrados em níveis elevados em algumas amostras. (SALEH *et al..*, 1996).

A solubilidade em gorduras dos organoclorados faz com que percorram rapidamente a cadeia alimentar, com resultados desastrosos para espécies, incluindo o ser humano, que ocupao o topo dessa cadeia (MATUO *et al..*, 1990). Estudos realizados na Espanha, com 134 amostras de tecido adiposo humano, constataram a presença de compostos como o DDE e o BHC, os quais apresentaram níveis médios elevados de 1.870,0 μg L –1 e 240,0 μg L –1. Dessa forma foi confirmada a afinidade dos pesticidas organoclorados pelas gorduras e a crescente contaminação dos seres humanos através da cadeia alimentar por esses compostos (COSTABEBER, 1999).

O câncer gastr0intestinal é o terceiro tipo de câncer mais comum na Índia nas regiões cortadas pelo rio Ganges, o qual apresenta altos níveis de organoclorados. Num trabalho realizado com 60 indivíduos doentes dessas regiões, observou-se altas concentrações biliares dos organoclorados BHC, DDT, Aldrin e Endossulfan. Foi sugerido que essas substâncias estão implicadas na ocorrência de câncer gastrointestinal nesses locais (SHUKLA *et al..*, 2001).

Análises feitas em leite de vaca entre 1993 e 1995 em Hong Kong, apresentaram níveis de DDE e BHC que excediam limites permitidos pelo Coder Committee on Pesticide Residues. Apesar da China ter proibido o uso desses pesticidas, desde 1983, os resultados das análises revelaram a persistência de tais compostos no meio ambiente causando contaminação da cadeia alimentar (WONG & LEE, 1997). Resultados semelhantes foram observados em 2003 em populações das áreas urbana e rural de Portugal. Apesar de, neste país, o uso de organoclorados ter sido proibido desde 1988,

essas substâncias foram encontradas em níveis bastante elevados no soro sanguíneo de vários indivíduos (CRUZ & SILVEIRA, 2003).

No Brasil, estudos realizados com moradores de área urbana do Rio de Janeiro mostraram a presença de resíduos de pesticidas organoclorados persistentes (POPs) em amostras de sangue de várias pessoas (DELGADO *et al.*., 2002). Na Cidade dos Meninos, município de Duque de Caxias, RJ, uma fábrica de inseticidas abandonada na década de 1950, liberou no ambiente grande quantidade de BHC. O poluente atingiu o solo e a vegetação sendo encontrados traços do veneno até na água de coco do local. Escavações realizadas mais tarde mostraram que o lençol freático também estava contaminado (OLIVEIRA & ADEODATO, 1997).

Foram investigados os níveis de organoclorados em águas e sedimentos da bacia do rio Piracicaba, na região central do Estado de São Paulo. Essa região abriga uma população de aproximadamente 2.960.000 habitantes e abrange cerca de 61 municípios (CETESB, 2002). Os resultados da investigação revelaram que a bacia apresenta alto comprometimento devido a presença significativa de alguns organoclorados. Nos municípios de Santa Bárbara d'Oeste, Sumaré e Campinas, por exemplo, foram encontradas quantidades do fungicida BHC bem acima do limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde, que é de 10,0 ng L^{-1} (DEL GRANDE & REZENDE, 2003).

Um relatório feito pela Secretaria de Saúde de Paulínia-SP, sobre exames médicos de 181 moradores do bairro Recanto dos Pássaros, contaminados por uma indústria química, indicou que 86% dos moradores apresentaram contaminação por pelo menos um produto tóxico, estando a dose ainda acima dos índices recomendados. De acordo com o documento, os exames revelaram que quatro pessoas tinham BHC acima dos níveis recomendados, 28 tinham Heptacloro (seis crianças), 20 tinham Aldrin (cinco crianças), sete tinham Endrin (quatro crianças), duas tinham Endossulfan e 44 tinham DDT (17 crianças). O relatório constatou uma alta incidência de tumores hepáticos e da tireoide, benignos e malignos, alterações neurológicas, típicas de exposição aos organoclorados, alto índice de dermatoses, de rinites alérgicas, disfunções gastrointestinais, pulmonares e hepáticas. Ainda, segundo o documento, 35% das crianças apresentavam distúrbios neurocomportamentais, afetando a capacidade de aprendizagem dessas crianças (GUAIUME, 2001).

3.1.2 Organofosforados

Os organofosforados são compostos com ligações fósforo-nitrogênio (P-N) de fundamental importância para a manutenção da vida, como, por exemplo, os ácidos nucleicos. Organofosforados são parentes dos gases neurotóxicos utilizados como agentes de guerras químicas, por apresentarem alta toxicidade ao sistema nervoso humano, como os gases sarin, soman e tabum (CASIDA e QUISTAD, 1998; WARE, 2003). Esses compostos são os inseticidas que apresentam maior toxidade para os vertebrados, como mamíferos e peixes. Porém, sua estrutura química altamente instável conferiu-lhe o status de substituto dos organoclorados, pois a sua persistência no solo é de um a três meses (MIDIO & SILVA, 1995; WARE, 2003).

Os organofosforados podem ser utilizados para combater insetos sugadores, desfolhadores e alguns rizófagos. Segundo FERREIRA (1999), o modo de ação pode ser sistêmico ou de fumigação, mas a ação de contato é a mais importante. Além do amplo emprego como pesticidas, alguns organofosforados têm potencial medicamentoso, podendo ser utilizados no tratamento do glaucoma e da miastenia gravis, embora sejam subutilizados, por serem medicamentos de risco, tendo sua dose tóxica próxima à dose terapêutica. Estes compostos são ainda utilizados em saúde pública no controle de vetores, como o da malária (NAMBA & COL, 1971; CARLTON, HADDAD & SIMPSON, 1998) e vetores de outras doenças, como a dengue.

Os organofosforados são rapidamente absorvidos pela pele, pulmões e pelo trato gastrointestinal. Seus sintomas de envenenamento agudo são: sudorese, excesso de secreção bronquial, náuseas e vômitos, contrações musculares e dormência das extremidades. Os efeitos crônicos são, principalmente, neuropatia, mudanças psiquiátricas, necrose no músculo esquelético (FALK *et al*.., 2002).

No Brasil são comercializados vários compostos organofosforados, como os listados na tabela 1.

Tabela 1. Principais compostos organofosforados vendidos no Brasil. Fonte: Caldas L.Q.A., 2000.

NOME GENÉRICO	NOME COMERCIAL
Acefato	Ortran, Orthene
Acetion	Acethion
Cianofos	Cyanox
Clortion	Chlorthion
Crufomato	Ruelene
Fenitrothion	Sumithion
Formotion	Aflix
Fostex	Phostex
Iodofenfos	Alfacron
Malation	Cythion, Malatol
Menazon	Sayfos
Merfos	Folex
Metamidofos	Tamaron, Filitox, Monitor
Ronel	Ectoral
Temefós	Abate
Tetraclorvinfos	Gardona
Tiopirofosfato de Propila	___
Tribufon	Butonate
Triclorfon	Neguvon
Amiton	Citram
Carbofenotion	Trithion
Ciantoato	Tartan
Coroxon	Coroxon
Dialifor	Torak
Dimefox	Terra-Systam
Dioxation	Delnav
Disulfoton	Disyston
EPN	EPN
Etil Azinfos	Gusathion-Aafos
Etion	Nialate
Fenamifos	Nemacur
Fensulfotion	Dasanit
Fonofos	Dyfonate
Forato	Thimet
Fosfamidon	Dimecron
Fosfolan	Cyolate
Menvinfos	Phosfrin
Metil oxidemeton	Metasystox-R
Metil-Azinfos	Gusathion
Oxidissulfoton	Disyston-S
Paration metílico	Folidol
Protoato	Fostion
Sulfotep	Bladafum
Tionazin	Nem

3.1.3 Carbamatos

Descobertos nos Estados Unidos em 1954, os carbamatos apresentarem estruturas simples e facilidade de sintetização de diversos análogos, o que possibilita a criação de diversas moléculas, e consequentemente inúmeras formulações a serem lançadas no mercado. A rápida detoxificação em mamíferos, em relação a dos insetos foi o principal fator descoberto nestes agentes, pois além de oferecer maior segurança, apresentam toxicidade seletiva para insetos e seus efeitos tóxicos, em mamíferos, mais prováveis aparecem muito mais pela exposição aguda do que por efeitos cumulativos; sendo assim menos persistentes e mais biodegradáveis que os organoclorados (CASIDA & QUISTAD, 1998).

Segundo Casida & Quistad (1998) outro importante avanço obtido com os carbamatos foi a possibilidade de preparo de combinações sistêmicas que translocam-se dentro das plantas após uma aplicação, protegendo-as durante semanas. Os carbamatos apresentam uma alta atividade inseticida; baixa ação residual, devido à instabilidade química das moléculas e baixa toxicidade em longo prazo, quando comparado com os derivados fosforados (MIDIO e SILVA, 1995).

Segundo Ware (2003), os compostos carbamatos possuem toxicidade oral e dermal baixas para mamíferos, se comparado aos fosforados. Por apresentarem menor odor em relação aos organofosforados, algumas formulações inseticidas dos carbamatos tendem a ser usadas no ambiente intradomiciliar (FERREIRA, 1999).

Em geral, os carbamatos sofrem hidrólise com facilidade, principalmente em temperaturas elevadas. Dentre os carbamatos é o Carbaril que possui maior efetividade de ação e menor toxicidade para os mamíferos, com meia vida de 10 dias em pH 7 e 15 minutos em pH 10.

Observam-se na tabela 2 os principais compostos carbamatos vendidos no Brasil e seus nomes comerciais.

Tabela 2. Carbamatos mais vendidos no Brasil. Fonte: Caldas L.Q.A., 2000

NOME GENÉRICO	NOME COMERCIAL
Aldicarb	Temik
Aminocarb	Metacil
Carbaril	Sevin
Carbofuran	Furadan
Landrin	Landrin
Metacalmato	Bux
Metiocarb	Mesurol
Mexacarbato	Zectran
Propoxur	Unden

3.1.4 Piretroides

Os primeiros piretroides foram sintetizados em 1949, possuindo síntese complexa, compreendendo 22 reações químicas até a obtenção do produto final. Em 1972 foram registradas algumas moléculas com atividade inseticida excepcional (WARE, 2003).

Os píretros são substâncias extraídas de algumas espécies de plantas da família Compositae, mais comumente de uma flor amarela chamada crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium)*, e são um dos inseticidas mais antigos usados pelo homem. Esse tipo de inseticida tem propriedades lipofílicas e de rápido efeito em insetos, atuando na paralisação do sistema nervoso (REIGART *et al.*., 1999). As piretrinas são misturas de princípios ativos que incluem piretrina I e II e cinerina I e II, jasmolin I e II (NICHOLSON 1995).

Os piretroides são compostos sintéticos desenvolvidos particularmente a partir da piretrina natural. Entres seus ingredientes ativos, encontram-se: aletrina, cipermetrina, permetrina, fenotrina, deltametrina, resmetrina, bioresmetrina e muitos outros (WARE 1983).

A Bayer® incorporou no seu produto conhecido com o nome comercial Baygon, piretroides de origem sintética, sendo o último o transfluthrin, comercializado desde 1996 contra insetos voadores (http://www.baygon.com). Um aspecto observado na química desses insecticidas é a estereoquímica, já que diferentes estereoisômeros possuem atividades inseticidas diferentes (SIEGFRIED 2000).

Os piretroides de origem natural ou sintética possuem o mesmo modo de ação, sendo bastante semelhantes ao do DDT, afetando o sistema nervoso central e periférico

(WARE 1983, SIEGFRIED 2000). Contudo, esse efeito é apenas temporário, se não for administrado um composto sinergético, como por exemplo, butóxido de piperonilo, que potencializa a atividade dos piretroides. Os piretroides são muito tóxicos para os peixes e pessoas com problemas asmáticos, o que exige cautela na sua utilização. Na tabela 3 pode-se visualizar os principais compostos piretroides vendidos no Brasil.

Tabela 3. Principais compostos piretroides vendidos no Brasil. Fonte: Caldas L.Q.A., 2000.

NOME GENÉRICO	NOME COMERCIAL
Aletrina	Pynamin
Alfacipermetrina	Fastal; Fendona; WL 85871; FMC 65318; Dominex; Epitax; Bala
Bifenthrin	FMC54800; Talstar; Capture; Brigade
Betacyfluthrin	Bulldock
Cipermetrina	Ripord; Cymbush
Cloreto de Mepiquat (grupo das Piretrinas)	Pix
Cyfluthrin	Baytruid; Sulfac
D- aletrina	Pynamin-forte
Esbiol	S-bioaletrina
Esfenvalerate	Halmark; Sumidan
Esbiotrin	—
Fenvalerato	Belmark; Sumicidin
Flucythrinate	Pay-off
Fenpropatrin Meothrin;	Danimen
Lambdacyalothrin	Cyhalothrin; Clocythrin
Permetrina	Ambushl ; Pounce
Piretrinas ou Píretro (grupo das piretrinas)	—
Resmetrina (grupo das piretrinas)	—
Sumitrin (Phenothrin) (grupo das piretrinas)	Sumithrin forte
Acrinathrin (grupo nor-pirétrico)	RU 88702; Rufast
Bioaletrina (grupo do ácido crisantêmico)	SBP
Bio-resmetrina (grupo do ácido crisantêmico)	—
Deltametrina	RU 22974; NRDC 161;
Decametrina	Obcis; K-ogiol; K-othrine
D-tertrametrina	Neo-pynamin forte
Tetrametrina	Neo-pynamin
Praletrina (grupo do ácido crisantêmico)	—
Transfluthrin	NAK 4455

3.2 A produção e o uso de defensivos agrícolas no Brasil e no mundo

Em 1990 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimava um consumo de agrotóxicos no mundo em um valor aproximado de 3 milhões de toneladas/ano o que correspondia a 500 milhões de pessoas expostas através do trabalho agrícola. Porém, hoje, somente no Brasil, a mesma instituição estima um consumo de 3,5 toneladas/ano (BRASIL ANVISA, 2005). Verifica-se que os países em desenvolvimento são os maiores consumidores de biocidas absorvendo uma faixa de 20% dos agrotóxicos. O Brasil destaca-se com 35% do montante mundial e 50% do total utilizado na América Latina (PERES *et al.*., 2001, MOREIRA *et al.*., 2002).

O mercado nacional é formado por oito grandes indústrias, responsável por uma produção com faturamento de 4,5 bilhões de dólares/ano e com um volume exorbitante de 500.000 toneladas/ano. Atualmente, 100.000 produtos aparecem em circulação no mercado brasileiro sendo acrescido mais 1000 novos produtos a cada ano (BRASIL, 2005). De acordo com a avaliação da Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM), a agroindústria brasileira teve um sobresalto de 6% no 1º semestre de 2010, sobre o mesmo período do ano anterior, puxada por todos os setores que compõem o mercado de agrotóxicos: agricultura (+2,6%), pecuária (+4,3%), inseticidas, herbicidas e outros defensivos para uso agropecuário (+34,1%) e madeira (+23,8%) (ABIQUIM, 2009).

De acordo com as estimativas do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) de agosto, a safra de 2010 deve crescer 11,1% sobre a de 2009, com a produção de grãos atingindo 148,0 milhões de toneladas, enquanto a área colhida deve cair 1,2%, para 46,7 milhões de hectares. Para os defensivos agrícolas observa-se um crescimento de 4,2% do faturamento líquido das indústrias químicas o que mostra um aumento gradativo do lucro nos últimos anos de US$ 37 bilhões ao ano em 2003 chegando a US$ 45,3 bilhões em 2009 (BRASIL IBGE, 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aponta que todos os tipos de agrotóxicos tiveram um aumento significativo nas suas vendas entre os anos de 2000 a 2009 (BRASIL ANVISA, 2010).

A ostentada modernização agrícola e a desordenada ocupação das mais diversas áreas geográficas brasileiras provocaram profundas transformações no espaço agrário nacional. Para Pedroso (2006), os chamados pacotes tecnológicos da Revolução Verde,

financiados pelas políticas desenvolvimentistas do governo brasileiro, tentam promover o crescimento da produção nacional, com aposta no subsequente aumento econômico do país sem levar em conta de forma sustentável os aspectos ambientais e sociais das áreas ocupadas. O Estado proporcionou a industrialização, financiamentos agrários dos mais diversos e incentivos de fixação do homem à terra através da capitalização da agricultura nas mais diversas regiões.

A acelerada modernização agrícola é baseada em um modelo falho que tenta criar as áreas comerciais de produção, com grande aplicação de insumos modernos em todos os territórios e grande mecanização nas áreas Centro-Oeste e Sudeste do país. A região Nordeste, particularmente na região do vale do São Francisco, entre os estados de Pernambuco e Bahia, vem obtendo o seu desenvolvimento agrícola principalmente através da produção de citrus, consolidando a economia dessa região em escala mundial nos últimos 20 anos (BRASIL, IBGE 2010).

As regiões de Brejo de altitude dos estados de Pernambuco e algumas áreas da Paraíba têm apresentado um grande salto na produção de flores temperadas (Brejo do Bonito e Brejo Gravatá, em Pernambuco e Areia e Pilões, na Paraíba), e ainda morangos e outras pequenas lavouras frutíferas e de hortaliças, o que ocasiona de forma direta um maior consumo de defensivos agrícolas (BRASIL, SEBRAE – PE, 2003).

3.3 Os riscos à segurança alimentar causados por resíduos

Segundo o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que é coordenado pela ANVISA em parceria com as Secretarias Estaduais de Saúde, em 2007, as amostras de tomate estavam entre as mais contaminadas por resíduos de agrotóxicos, a nível nacional, seguidos pelas amostras de morango e alface. Os problemas encontrados nas amostras foram teores de resíduos acima do permitido e o uso de agrotóxicos não autorizados para as culturas em questão. No balanço geral, os nove produtos avaliados (alface, batata, morango, tomate, banana, mamão e cenoura), o índice de amostras insatisfatórias ficou em 17,28%, como observado na tabela 4 (BRASIL, ANVISA, 2008).

Tabela 4. Dados consolidados do PARA. Fonte: PARA, 2008.

Resultados insatisfatórios (%) *							
Cultura	**2002**	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**
Alface**	8,64	6,67	14	46,45	28,68	40,00	19,80**
Banana	6,53	2,22	3,59	3,65	N	4,32	1,03
Batata	22,20	8,65	1,79	0	0	1,36	2,00
Cenoura	0	0	19,54	11,30	N	9,93	30,39
Laranja	1,41	0	4,91	4,70	0	6,04	14,85
Mamão	19,50	37,56	2,50	0	N	17,21	17,31
Maçã	4,04	3,67	4,96	3,07	5,33	2,90	3,92
Morango	46,03	54,55	39,07	N	37,68	43,62	36,05
Tomate	26,10	0	7,36	4,38	2,01	44,72	18,27
Abacaxi							9,47
Arroz							4,41
Cebola							2,91
Feijão							2,92
Manga							0,99
Pimentão							64,36
Repolho							8,82
Uva							32,67

N = Análises não realizadas.
* Os resultados referem-se aos estados: AC, BA, DF, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SE, TO.
** Grupo químico ditiocarbamato não analisado na cultura da alface em 2008.

O PARA foi criado no ano de 2001 e o seu objetivo é manter a segurança alimentar do consumidor e a saúde do trabalhador rural. O programa abrange 16 estados e chegou a todo o país no ano de 2009. A escolha dos itens leva em consideração algumas variáveis como: importância destes alimentos na cesta básica do brasileiro; o consumo *in natura*; o uso de agrotóxicos e a distribuição das lavouras pelo território nacional (BRASIL, ANVISA, 2008). O programa trabalha executando coletas de amostras através das vigilâncias sanitárias de cada um dos estados e municípios em pontos de venda e, posteriormente, enviam o material para análise dos resíduos de agrotóxicos. Em caso de resultados insatisfatórios, apresentando quantidades superiores de agrotóxicos às permitidas ou detectando utilização de agentes de uso proibido pela legislação vigente, os órgãos responsáveis pelas áreas de plantio e meio ambiente são acionados para rastrear e solucionar o problema. As medidas tomadas em relação aos produtores são de orientação para adoção de boas práticas agrícolas (BRASIL, ANVISA, 2008).

Quando falamos em risco na utilização de substâncias químicas Garcia & Alves Filho (2005) definem a probabilidade de uma substância produzir um dano em condições específicas de uso. Eles relatam, ainda, o que vem a ser a segurança na utilização de substâncias químicas como a probabilidade de não ser produzido um dano pelo uso de uma substância em condições características. Concluindo, assim, que a toxicidade é a capacidade do risco associado a uma substância de produzir danos à saúde humana e/ou ao meio ambiente.

A Associação Nacional de Defensivos Agrícolas (BRASIL ANDEF, 2005) define o risco de intoxicação como a probabilidade estatística de uma substância química causar efeito tóxico, sendo este obtido em função da toxicidade de um determinado produto e a exposição a ele. Sendo assim, a toxicidade é uma relação direta entre a dose e a sensibilidade do organismo exposto. Sabendo-se que não é possível ao usuário alterar a toxicidade do produto, uma maneira de amenizar o risco é por meio do tempo de exposição (ANDEF, 2005).

A percepção do risco é definida como a habilidade de interpretar uma situação de potencial dano à própria saúde, ou de terceiros, com base em um conhecimento prévio e fazendo-se extrapolação para um momento futuro. Esta habilidade pode variar entre uma vaga opinião a uma firme convicção pessoal. Dessa forma a Percepção de Risco está principalmente baseada em imagens, crenças e 'backgrounds' de conhecimento (WIEDERMANN, 1993).

Para Garcia (2001), a visão simplista com que é abordado o uso de agrotóxicos acaba por associar o risco, única e exclusivamente, ao seu manuseio e aplicação e não à própria substância. Entretanto, no correto, acontece que o risco não é determinado somente pela exposição, a toxicidade do produto é de fundamental importância na determinação do risco. É necessária, por parte dos grupos populacionais que são expostos, a formulação de estratégias que venham a intervir sobre o problema (MOREIRA *et al.*., 2002).

Guivant (1992) realizou um estudo sobre as percepções dos agricultores e os riscos decorrentes do uso de agrotóxicos. A autora descreve que mesmo quando os trabalhadores têm informações, ainda que insuficientes, não as seguem no tocante às normas relativas à segurança no uso de defensivos. Isto se deve ao fato de não acreditarem nas fontes nem nos riscos que os agrotóxicos potencialmente representam. Outro ponto relevante do estudo foi a forma como o agricultor manipula os agrotóxicos

acreditando que nenhum mal ou doenças está associada ao uso imprudente destas substâncias, concluindo que efetivamente não são perigosos à saúde.

A mesma autora, em 1994, publicou um trabalho com uma abordagem sobre a percepção dos riscos à saúde e apresenta a seguinte discussão: (...) *para os agricultores faltam evidências que confirmem a existência do risco, que para ser "real" já deveria ter levado à morte não só eles próprios, mas os outros produtores também. Não são consideradas evidências suficientes casos de intoxicação ou de tontura, vômitos, dores de cabeça etc. Que são vistas como não comprometedoras da saúde. Com esses sintomas se convive, é o patamar aceito como "normal". Os riscos assim são descartados como abstratos e distantes. Se o agricultor tem manipulado, até o presente, os agrotóxicos sem que nada de negativo tenha acontecido para ele, acaba concluindo que, efetivamente, não são perigosos à saúde, se até agora nada aconteceu, tampouco irá acontecer.*

Veiga *et al.*. (2006) enfatizam a importância de dar aos produtores rurais e a toda população local, assim como, a todos os demais atores sociais envolvidos, informação correta sobre os riscos potenciais da utilização de agrotóxicos. Possibilitando a tomada de medidas que venham prevenir de forma eficiente. Uma ampla divulgação da informação sobre o risco torna-se assim a principal medida de promoção a uma atitude preventiva.

Os processos inerentes ao trabalho rural são, para Dejours *et al.*. (1994), determinantes da percepção de riscos dos trabalhadores e, em última instância, o trabalhador rural vê o processo de pulverização, por exemplo, como não causador de desconfortos excessivos, não o obriga a esforços físicos acentuados, desconsiderando assim o risco causado pela nuvem de agrotóxico formada durante o processo de a aplicação. Não raras vezes, os trabalhadores reconhecem aquela atividade como perigosa, ainda que desconheçam os limites deste risco. Para estes mesmos autores, o desprezo com que é tratado o risco pode ter também um elemento de ideologia defensiva frente a um ambiente/processo de trabalho injurioso, causando a falsa ideia de domínio sobre o perigo, numa tentativa de autovalorização mediante as precárias condições de trabalho a que estão submetidos.

3.4 Evidências e efeitos da exposição das comunidades rurais aos agrotóxicos

Não é fácil evidenciar os efeitos da exposição aos pesticidas e seus potenciais perigos. Estudos realizados por Solomon *et al.*. (2007), mostram que os sintomas agudos são comuns, mas sugeriu que em muitos casos a doença pode surgir através de mecanismos psicológicos ao invés de tóxicos, dentre eles hábitos de vida (alcoolismo, tabagismo) e somatização (sintomas orgânicos decorrentes de perturbações psicológicas como níveis de aflição, ansiedade, dentre outros).

Embora esse tipo de acompanhamento venha sendo feito, ainda são desconhecidos os reais números de casos notificados no país. Além do mais, muitas das informações não retratam a realidade do problema por serem de uma forma geral insuficientes, parciais, fragmentados, desarticulados e dispersos em várias das suas fontes. Estimativas do Ministério da Saúde relatam que para cada evento de intoxicação por agrotóxico notificado, há outros 50 não notificados. Essas mesmas informações são citadas nos estudos da OPAS (1996) e de Peres & Moreira (2003).

Os números impressionam, e estão diretamente associados ao fato das dificuldades na assistência ao homem do campo por parte do poder público corroborando com uma extrema situação de risco à saúde desses trabalhadores (PERES, 1999).

Nos últimos anos têm sido observadas, no trabalho rural brasileiro, transformações relacionadas à incorporação de novas tecnologias e processos produtivos no meio rural e a crescente subordinação do homem do campo à economia de mercado. Em ambos, esse processo de transformação acabou por determinar uma série de agravos à saúde e à qualidade de vida do trabalhador rural (PERES *et al.*., 2004).

O impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana é um problema que tem merecido atenção da comunidade científica em todo o mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde se observa o maior número de mortes decorrentes da exposição humana a esses agentes (SILVA & ALVES, 2007). Os danos à saúde causados pela aplicação do veneno nas lavouras atingem não apenas aos aplicadores, mas aos demais trabalhadores que exercem outras atividades na área do plantio e aos consumidores dos alimentos contaminados com resíduos (ALVES, 2006).

Calcula-se que, anualmente, mais de três milhões de pessoas são contaminadas por agrotóxicos em todo o mundo, estando 70% de todos os casos concentrados nos países em desenvolvimento (WHO, 2001) onde o difícil acesso às informações e a baixa escolaridade por parte dos usuários desses produtos, assim como a falta de controle sobre sua produção, distribuição e utilização são alguns dos principais fatores determinantes na constituição desse cenário compondo para Peres (2005), um dos principais desafios à saúde pública.

3.5 Leis dos agrotóxicos

O sobressalto no número de casos de intoxicações por uso de pesticidas culminou com a criação da Lei dos Agrotóxicos, promulgada em 1989. Levando o Ministério da Saúde a implantar junto ao sistema de controle de informações toxicológicas, um procedimento de investigação dos acidentes causados por esses produtos. Esse monitoramento teve como objetivo primordial expor a situação das intoxicações por agrotóxicos e delimitar campos de atuação, a fim de reduzir o número de acidentes (FILHO, 2002; ARAÚJO *et al.*., 2000).

Em regra geral, comumente se alega que o uso inadequado dos agrotóxicos pelos agricultores seja a causa maior dos problemas provocados por estes produtos, pois a rigidez e evolução da legislação e, ainda, do próprio sistema de registro garantiriam que os produtos colocados no mercado prioritariamente seriam seguros se bem utilizados. Essa forma simplória e inconsistente de expor os argumentos de modo a responsabilizar apenas o usuário dos agrotóxicos foi bastante discutida por Garcia (2001).

A necessidade de criar ferramentas legais para a obtenção de controle sobre substâncias que venham a oferecer riscos à saúde e ao ambiente é indiscutível. Para as substâncias utilizadas no controle de pragas e doenças da agricultura, a chamada "Lei dos Agrotóxicos", promulgada em 1989 (Lei n.º 7.802/89), oferece especial importância. Anterior à sua promulgação, a legislação que regulamentava o setor de agrotóxicos baseava-se no decreto n.º 24.114,2 de 14 de abril de 1934, ou seja, 55 anos antes que os primeiros produtos organossintéticos, fossem utilizados como pesticidas.

Entre os vários assuntos tratados dentro da, então, Lei dos Agrotóxicos, o artigo que se refere ao registro parece ser um dos mais importantes, pois exige que no processo de registro sejam avaliados os resultados de estudos prévios requeridos para essa

finalidade no tocante aos aspectos de eficiência e eficácia agronômica levando ainda em consideração os potenciais impactos à saúde pública e ao ambiente. Mediante esses resultados, o registro fica responsável em definir se determinada substância ou produto comercial pode ser utilizado e sob que condições e ainda definindo todos os demais aspectos relacionados ao controle e uso dos agrotóxicos.

Desde 1934 o registro de agrotóxicos já era obrigatório, contudo a Lei dos Agrotóxicos é considerada por muito juristas e ambientalistas um avanço do ponto de vista da preservação da saúde pública e do ambiente. Pois, segundo ela, so é permitido o registro de novo produto agrotóxico, se for comprovadamente igual ou de menor toxicidade aos já registrados para o mesmo fim.

É questionado por alguns juristas que determinados feitios da regulamentação da lei trouxeram certas preocupações. A sua regulamentação a princípio, baseada no Decreto n.º 98.816,3 de 11 de janeiro de 1990, foi alterada pelo Decreto n.º 991,4 de 24 de novembro de 1993, que eliminou a validade de cinco anos para o registro dos agrotóxicos e, com isso, a necessidade de serem periodicamente reavaliados para renovação do registro. O Decreto n.º 4.074/02, atualmente em vigor, revogou o Decreto n.º 98.816/90 e o nº 991/93 e incorporou a modificação estabelecida por este último.

A validade do registro com duração de cinco anos era adotada desde 1934, mas o Decreto n.º 991/93 modificou todos os artigos que tratavam do assunto. Eliminou-se a necessidade de renovação, mantendo-se a possibilidade de reavaliação do registro a qualquer tempo no caso destes produtos apresentarem redução da sua eficiência agronômica ou riscos à saúde ou ao meio ambiente.

A regulamentação preocupa ainda no tocante ao papel da Classificação Toxicológica. É especificada na regulamentação da Lei dos Agrotóxicos feita pelo Ministério da Saúde por meio da Portaria SNVS n.º 3/92, parâmetros de classificação similares àqueles recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os agrotóxicos são enquadrados em quatro Classes Toxicológicas, que são definidas principalmente pela DL50 (Dose Letal capaz de matar 50% de uma população de estudo), dos produtos formulados, ainda que existam outros indicadores que venham a mostrar problemas ligados à saúde e não ao número de óbitos, e a CL50 (Concentração Letal Inalatória do tóxico no ambiente capaz de produzir a morte de 50% da população exposta).

A maior problemática é verificada pela não necessidade de que todos os dados toxicológicos pertençam à mesma classe. A classificação é dada pelo dado mais agravante, ou seja, aquele que determinar enquadramento na classe de maior toxicidade. O real propósito de classificação dos agrotóxicos é distinguir entre os de maior e os de menor periculosidade. No Brasil, essa classificação tem servido apenas para definir a comunicação de riscos colocada nos rótulos das embalagens. Devemos lembrar que o emprego de agrotóxicos só deveria ocorrer em condições bastante específicas, principalmente quando a necessidade de uso for daqueles de maior periculosidade.

Isso demonstra as implicações de ordem técnica, administrativa e econômica correspondentes a cada Classe Toxicológica. A classificação deveria influenciar na distribuição dos agrotóxicos, fazendo com que os produtos de maior periculosidade tenham seu uso restrito, como é recomendada pela OMS, a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a agência ambiental dos Estados Unidos (EPA).

Reivindicações nesse sentido, incluindo a restrição da disponibilidade e a proibição de alguns produtos que venham a oferecer grandes riscos à saúde e ao ambiente, foram expressas pelo Fórum Intergovernamental de Segurança Química (IFCS), em sua IV reunião, realizada em novembro de 2003, em Bangkok, na Tailândia.

3.6 Classificação dos agrotóxicos

Segundo Peres *et al.*. (2003), os agrotóxicos podem ser classificados de várias maneiras, pela sua ação, risco ambiental à saúde humana, persistência no ambiente e função (pragas que controlam).

De acordo com sua função os agrotóxicos podem ser classificados como:

- **Inseticidas**: controlam insetos;
- **Fungicidas:** destróem ou inibem fungos;
- **Herbicidas:** combatem plantas invasoras;
- **Desfolhantes:** eliminam folhas indesejadas;
- **Fumigantes**: combatem bactérias do solo;
- **Raticidas:** combatem ratos e outros roedores;
- **Moluscocidas:** combatem moluscos;
- **Nematicidas:** combatem nematoides;
- **Acaricidas:** utilizados no combate a ácaros.

E ainda podem ser subdivididos quanto ao grupo químico ao qual pertence. As tabelas abaixo demonstram essas classificações quanto à praga controlada pelos agrotóxicos em relação aos grupos químicos:

Tabela 5. Inseticidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Inseticidas (controle de insetos)	Inorgânicos	Fosfato de alumínio, Arsenato de cálcio
	Extratos vegetais	Óleos vegetais
	Organoclorados	Aldrin, DDT, BHC
	Organofosforados	Fenitrotion, Paration, Malation, Metil-paration
	Carbamatos	Carbofuran, Aldicarb, Carbaril
	Piretroides sintéticos	Deltametrina, Permetrina
	Microbiais	*Bacillus thuringiensis*

Tabela 6. Fungicidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al..*, 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Fungicidas (combate aos fungos)	Inorgânicos	Calda Bordalesa, enxofre
	Ditiocarbamatos	Mancozeb, Tiram, Metiram
	Dinitrofenóis	Binapacril
	Organomercuriais	Acetato de fenilmercúrio
	Antibióticos	Estreptomicina, Ciclohexamina
	Trifenil estânico	Duter, Brestan
	Microbiais	*Bacillus thuringiensis*
	Compostos	Formilamina Triforina, Cloraniformetam
	Fentalamidas	Captafol, Captam

Tabela 7. Herbicidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al.*., 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Herbicidas (combate às plantas invasoras)	Inorgânicos	Arsenito de sódio, cloreto de sódio
	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC
	Fenoxiacéticos	CMPP, 2,4-D, 2,4,5-T
	Carbamatos	Profam, Cloroprofam, Bendiocarb
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat, Difenzoquat
	Dinitroanilinas	Nitralin, Profluralin
	Benzonitrilas	Bromoxinil, Diclobenil
	Glifosato	Round-up

Tabela 8. Desfolhantes: classificação segundo seu grupo químico e quanto a à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al.*., 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Desfolhantes (combate às folhas indesejadas)	Dipiridilos	Diquat, Paraquat
	Dinitrofenóis	Dinoseb, DNOC

Tabela 9. Fumigantes: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al.*., 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Fumigantes (combate às bactérias do solo)	Hidrocarbonetos halogenados	Brometo de metila, cloropicrina
	Geradores de Metilisocianato	Dazomet, Metam
	-	Formaldeídos

Tabela 10. Raticidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al.*., 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Rodenticidas/raticidas (combate aos roedores/ratos)	Hidroxicumarinas	Cumatetralil, Difenacum
	Indationas	Fenil-metil-pirozolona, Pindona

Tabela 11. Moluscocidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al.*., 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Moluscocidas (combate aos moluscos)	Inorgânicos (aquáticos)	Sulfato de cobre
	Carbamatos (terrestres)	Aminocarb, Metiocarb, Mexacarbato

Tabela 12. Nematicidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al.*., 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Nematicidas (combate aos nematoides)	Hidrocarbonetos Halogenados	Dicloropropeno, DD
	Organofosforados	Diclofention, Fensulfotion

Tabela 13. Acaricidas: classificação segundo seu grupo químico e quanto a à praga combatida. Fonte: Peres, 1999 *apud* Peres *et al.*., 2003.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (PRODUTO/ SUBSTÂNCIA/AGENTES)
Acaricidas (combate aos ácaros)	Organoclorados	Dicofol, Tetradifon
	Dinitrofenóis	Dinocap, Quinometionato

Os agrotóxicos são ainda agrupados em quatro grupos onde se atribui uma cor a cada categoria como observado na tabela 14.

Tabela 14. Classificação dos agrotóxicos quanto ao risco à saúde. Fonte: IMA (1999) *apud* SANTOS (2003).

CLASSIFICAÇÃO	COR DA FAIXA	DOSAGEM LETAL 50	DOSE CAPAZ DE MATAR UM ADULTO
Classe I:	**Extremamente tóxico**	5mg/Kg de peso corpóreo	1 pitada/ algumas gotas
Classe II:	**Altamente tóxico**	5-50mg/Kg de peso corpóreo	Algumas gotas/ 1 colher de chá
Classe III:	**medianamente tóxico**	50-500mg/Kg de peso corpóreo	1 colher de chá/ 2 colheres de sopa
Classe IV:	**Pouco tóxico**	500-5000mg/Kg de peso corpóreo	2 colheres de sopa/ 1 copo

Outra forma de classificação dos agrotóxicos é de acordo com os riscos ambientais ofertados pelo produto como verificado na tabela 15.

Tabela 15. Classificação de periculosidade ambiental dos agrotóxicos. Fonte: IMA (1999) *apud* Santos (2003).

CLASSE	NÍVEL DE PERIGO AO AMBIENTE
I	Altamente perigoso
II	Muito perigoso
III	Perigoso
IV	Pouco perigoso

3.7 Considerações gerais sobre a quitina e quitosana

Os polímeros naturais apresentam ampla aplicabilidade em diversas áreas de estudo devido às suas propriedades, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil obtenção e não serem tóxicos. Entre esses polímeros destacam-se a quitina e a quitosana (AZEVEDO *et al.*., 2007).

Quitina é um polímero natural, insolúvel, linear que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β-1,4 N-acetilglucosamina (Figura 1), e com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, atuando como material estrutural e protetor (CANELA & GARCIA, 2001; LARANJEIRA, 2009). A quitina é encontrada no exoesqueleto dos crustáceos, insetos, artrópodes e na parede celular de fungos (FRANCO *et al.*., 2005; STAMFORD *et al.*., 2008).

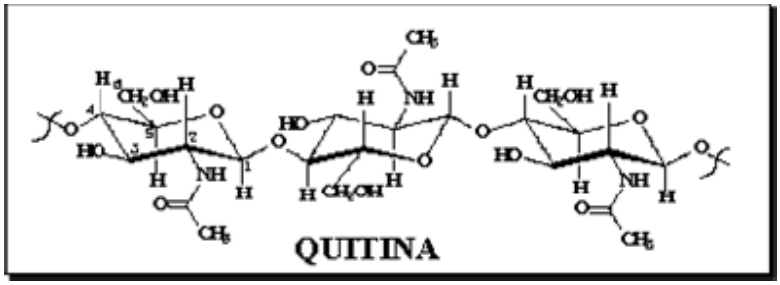


Figura 1: Estrutura química da quitina. Fonte: Signini, 2002

A quitosana é um heteropolímero natural, composto por unidades β-1,4 D-

glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina (Figura 2), podendo ser encontrado, na natureza, na parede celular de alguns fungos, principalmente da Classe Zygomycetes e em alguns moluscos (CHATTERJEE *et al.*., 2005; SILVA *et al.*, 2006; STAMFORD *et al.*., 2007). A quitosana é obtida na indústria, principalmente, pela hidrólise química da quitina, como demonstrado na figura 3 (POCHANAVANICH & SUNTORNSUK, 2002; FRANCO *et al.*., 2005; AMORIM *et al.*., 2006). Existem vários derivados da quitosana, os quais podem se diferenciar pelo grau de deacetilação, assim como pela disposição dos grupos N-acetil residuais, na cadeia do polímero (RINAUDO, 2006; STAMFORD *et al.*., 2007).

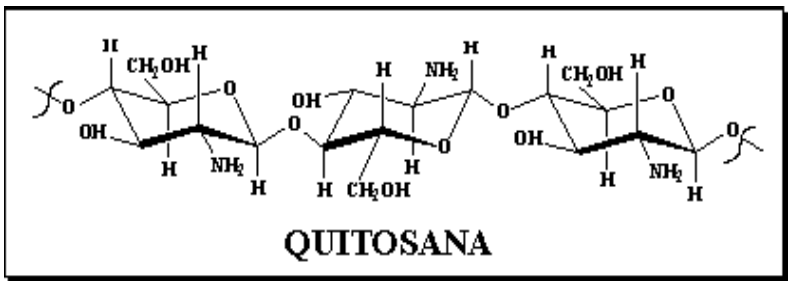
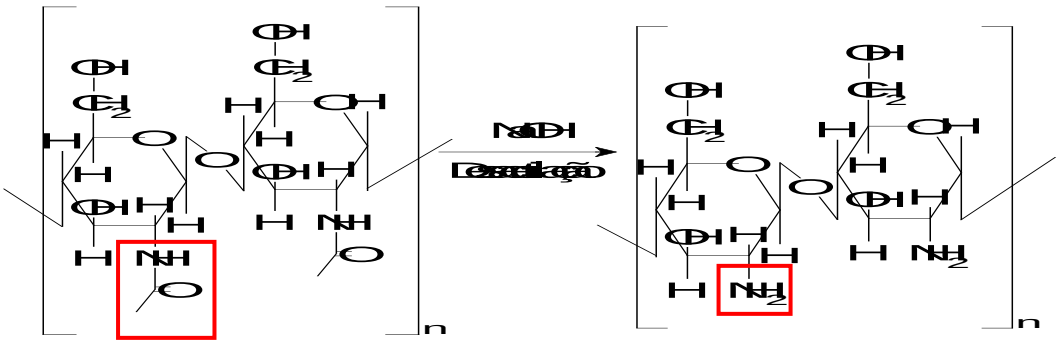


Figura 2: Estrutura química da quitosana. Fonte: Signini, 2002



Quitina Quitosana

Figura 3: Esquema da reação de N-desacetilação da quitina para obtenção de quitosana. Fonte: Anjos (2005)

3.8 Produção de quitina e quitosana

Exoesqueletos de crustáceos constituem a fonte tradicional para a obtenção de quitina e quitosana. O conteúdo de quitina nos crustáceos varia com a espécie estando o rendimento entre 2% e 12% da massa corpórea total, e de 13% a 42% na casca. A

quitosana é obtida pela deacetilação da quitina utilizando NaOH 50% e temperatura em torno de 110 ºC (SYNOWIECHI & AL-KHATEEB, 2003).

Existem várias limitações em relação à viabilidade do processo de obtenção da quitina e quitosana proveniente de crustáceos, tais como: adaptação ao clima, sazonalidade, locais de confinamento e o processamento em larga escala, associado à conversão química de quitina em quitosana, processos químicos para a remoção de impurezas, forte associação com material inorgânico, pigmentos, lipídios e proteínas, as quais podem induzir a reações alérgicas e não existir um processo padrão para a extração dos polímeros (POCHANAVANICH & SUNTORNSUK, 2002; FRANCO *et al..*, 2005; AMORIM *et al..*, 2005).

Utilização de massa micelial de fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana tem demonstrado grandes vantagens, tais como: extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala (AMORIM *et al..*, 2000; FRANCO *et al..*, 2005; AMORIM, *et al.*, 2006; STAMFORD, *et al..*, 2007). A quantidade desses polissacarídeos extraídos da biomassa varia com a espécie de fungo e condições de cultivo utilizadas. Geralmente, fungos da classe Zygomycetes apresentam maior quantidade de quitina e quitosana em sua parede celular (FRANCO *et al..*, 2005; AMORIM *et al.*, 2006; STAMFORD, *et al..*, 2007).

Várias pesquisas utilizando fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana relatam rendimentos iguais ou superiores, desses polímeros, aos obtidos quando utilizadas fontes tradicionais (ANDRADE *et al..*, 2003; AMORIM *et al..*, 2005). Estudos utilizando biomassa de Mucor rouxii e M. javanicus como fonte de polissacarídeos obtiveram rendimento de quitosana em torno de 8% e de quitina entre 8,9% e 23,9% (SYNOWIECK & AL-KHATEEB, 1997; ANDRADE *et al..*, 2003).

3.9 Aplicações da quitosana na agricultura

A quitosana é um polímero caracterizado por propriedades específicas que revelam o seu potencial para inúmeras aplicações em vários produtos comerciais. As principais propriedades desse polissacarídeo são: bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, reatividade do grupo amino deacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrolítica, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelação e capacidade adsortiva (SYNOWIECK & AL-KHATEEB, 2003; THARANATHAN &

KITTUR, 2003). A toxicidade da quitosana é menor do que a glicose ou sacarose. A dose letal de glicose em mamíferos é da ordem de 8 a 12 gramas por quilograma de massa corporal, enquanto que 18 gramas de quitosana por quilograma de massa corporal em mamíferos não apresenta qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade (YADAV & BHISE, 2004; COSTA SILVA *et al..*, 2006).

No pH biológico, a quitosana apresenta-se como um policátion. Em meio ácido os grupos amino da quitosana captam íons hidrogênio do meio, resultando em uma carga global positiva ao polímero, o que permite a sua interação com moléculas carregadas negativamente tais como: gorduras, tecidos animais ou vegetais, membrana celular, entre outras formas (HORNER *et al..*, 1997; PAUTLOWSKA, 1997). As possibilidades de aplicações são ainda ampliadas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas (CAMPANA FILHO *et al..*, 2007, JAYAKUMAR & MANO, 2007; SEZER *et al..*, 2007; WONGPANIT *et al..*, 2007).

A quitosana vem sendo extensivamente estudada devido às suas propriedades peculiares que lhe conferem um aproveitamento bastante versátil, tais como: carreador de fármacos de liberação controlada e DNA (KIM *et al..*, 2005; PARK *et al..*, 2004), regeneração de tecidos epiteliais (MAIA *et al..*, 2006; CHO *et al..*, 2008; OLMEZ *et al..*, 2007), confecção de membranas artificiais (COSTA *et al..*, 2006), promotor de osteogênese (MURUGAN & RAMAKRISHNA, 2004), antimicrobiano (IKINCI *et al..*, 2002; CHUNG *et al..*, 2004; YADAV & BHISE, 2004; CAO & SUN, 2007), remoção e recuperação de diferentes resíduos (VIVEK & TORRES, 2000), biotransformação e detecção de pesticidas (DU *et al..*, 2007; YOSHIZUKA, *et al..*, 2007), recobrimento de sementes na agricultura (VELÁSQUEZ, 2003), degradação de corantes, aminoácidos e proteínas (BORDERÍAS., *et al..*, 2005), agente de floculação no tratamento de efluentes aquosos, liberação controlada de fertilizantes agroquímicos, estimular o sistema imune da planta, o seu crescimento, produção vegetal e também proteger a planta contra o ataque de patógenos (BADAWY & RABEA, 2008; GHAOUTH *et al..*, 1991; HERNÁNDEZ-LAUZARDO *et al..*, 2008).

3.10 Atividade antifúngica e antibacteriana

A atividade antimicrobiana da quitosana e derivados contra diferentes grupos de

micro-organismos, tais como bactérias, fungos e leveduras tem recebido uma atenção especial nos últimos anos (CHOI *et al.*., 2001). Em virtude de sua carga positiva, a quitosana é mais solúvel e possui maior atividade antimicrobiana do que a quitina. O uso de substâncias bioativas como a quitosana para o controle de doenças microbianas tem chamado bastante atenção na área agrícola, e experimentos vêm mostrando que esse biopolímero inibe o crescimento de vários micróbios fitopatogênicos (KUMAR, 2000; ZIANI *et al.*, 2009; KHOUSHAB & YAMABHAI, 2010).

Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrolíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados, provavelmente, se ligam à superfície celular carregada negativamente, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana causando perda de componentes intracelulares (AVADI *et al.*., 2004; TSAI & HWANG, 2004; YADAV & BHISE, 2004). Embora, o mecanismo exato pelo qual a quitosana exerce sua atividade antifúngica e antibacteriana ainda não tenha sido esclarecido, algumas hipóteses têm sido sugeridas. Singh *et al.*. (2008) relatam que a quitosana induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células dos fungos causando estresse oxidativo, e consequentemente, danos aos principais componentes da célula (proteínas, lipídios, DNA e outros).

De acordo com Di Piero & Garda (2008) e Laflamme *et al.*. (1999), a quitosana, por apresentar alta massa molecular e cargas positivas, pode interferir com os resíduos das macromoléculas com cargas negativas quando expostas sobre a superfície celular fúngica, e dessa forma, modifica a permeabilidade da membrana plasmática. Essa interação pode provocar desbalanço osmótico e pronunciada desorganização celular. Além disso, Laflamme *et al.*. (1999) também sugerem que a quitosana pode interagir com o DNA da célula fúngica e alterar a sua conformação, inibindo a síntese de mRNAs e proteínas. Outros estudos revelam, ainda, que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas das soluções, concentração utilizada e tempo de exposição, além das características inerentes à membrana do micro-organismo alvo (COSTA SILVA *et al.*., 2006).

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de comprovar a eficiência da quitosana no controle de doenças durante os períodos de plantio e de colheita, substituindo ou competindo com os produtos químicos. A quitosana pode aumentar a

síntese de compostos antifúngicos na planta como fitoalexinas e enzimas hidrolíticas como quitinases e glucanases, induzindo a resistência natural das plantas (PACHECO *et al..*, 2008) e apresentar ação antifúngica e antibacteriana (DOTTO *et al..*, 2008). A quitosana e seus derivados são capazes de inibir o crescimento de micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (ZHENG & ZHU, 2003), *Salmonella typhimurium*, *S. faecalis* (CHUNG *et al..*, 2004), *S. enterica*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* (YADAV & BHISE, 2004), *Listeria monocytogenes* (COMA *et al..*, 2004), *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, Fusarium, Alternaria, Helminthosporium (COSTA SILVA *et al..*, 2006), *Sacharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Cryptococcus albidus*, Candida sp. e Rhodotorula sp. (RHOADES & ROLLER, 2000; SAGOO *et al..*, 2002).

A utilização de pesticidas durante a pré-colheita é um método eficiente para diminuir a podridão na pós-colheita, principalmente pela redução da fonte de inóculo. Entretanto, esse controle químico apresenta algumas limitações como: alta contaminação com resíduos encontrados nos produtos vegetais, riscos à saúde humana, poluição do meio ambiente, aumento da resistência dos patógenos e, em alguns casos, falta de fungicidas mais eficientes para determinadas culturas. Por isso, o uso de compostos naturais ou biodegradáveis, não tóxicos ao homem e animais, que têm efeito fungistático ou induzam à resistência natural das plantas, tem se mostrado um método alternativo para o biocontrole de fungos fitopatogênicos (BASSETTO, 2006; MAZARO *et al..*, 2008; RAPPUSSI *et al..*, 2009).

Pacheco *et al.*. (2008), observaram *in vitro* o efeito inibitório da quitosana de baixo peso molecular juntamente com a levedura *Pichia guillirmondii* no crescimento micelial e germinação de esporos de *Penicillium digitatum*, fungo conhecido como bolor verde que causa apodrecimento de frutos cítricos. Liu *et al.*. (2007) também comprovaram *in vitro* a atividade antifúngica da quitosana na inibição do crescimento micelial e na germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*. O efeito antifúngico da quitosana também foi constatado por Rappussi *et al.*. (2009), os quais verificaram que este polissacarídeo em todas as concentrações (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 3,0 %) testadas inibiram o crescimento micelial afetaram a germinação dos conídios e a formação de apressórios de *Guignardia citricarpa*, fungo causador da mancha negra em frutos cítricos.

Testes *in vitro* constataram que quitosana com baixo peso molecular (0,5 x 104

g/mol) apresentam melhor efeito antifúngico, inibindo o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em frutos de tomate (BADAWY RABEA, 2008). O crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, também, foi completamente inibido pelas concentrações de quitosana de 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0 % durante o período de incubação de cinco dias a 22^{o}C, e independente da concentração do polímero, os conídios germinaram mais tardiamente quando comparado ao tratamento controle, apresentando alterações morfológicas no micélio como hifas atrofiadas, mais espessas e muitas vezes ramificações excessivas (CAMILI *et al.*, 2007).

A grande redução na incidência e severidade do mofo cinzento causado por *B. cinerea* em uvas cvs. "Thompson Seedless", "Autumn Black", e "Emperor" foram relatadas em tratamentos com quitosana a 1%. As uvas foram pulverizadas com quitosana, colhidas e imediatamente inoculadas com *B. cinerea*, em intervalos de 24 horas, no total de 120 horas (cinco dias), sendo observada menor incidência e severidade da doença nos frutos colhidos com maior antecedência, ou seja, com 1 e 2 dias após o tratamento com quitosana (ROMANAZZI *et al.*., 2006).

A lise da membrana plasmática e a inibição da germinação de esporos de fungos foram demonstradas em trabalho sobre biocontrole de fungos patogênicos. Através desse estudo, verificou-se que os fungos entomopatogênicos e nematófagos são menos inibidos pela quitosana que os fitopatogênicos e micoparasiticos provavelmente porque apresentam a enzima quitosanase que degrada a quitosana. Mesmo assim, a quitosana pode ajudar a desenvolver novas estratégias para o biocontrole em geral de fungos patogênicos, evitando o uso de fungicidas que prejudicam o meio ambiente e a saúde humana (PALMA-GUERRERO *et al.*., 2007).

3.11 Indução de resistência a patógenos

Diversas situações de estresse como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar e ataque de patógenos, ocorrem durante o ciclo de vida de uma planta. Através da ativação de mecanismos de resposta contra danos e doenças, a planta tenta superar esses estresses bióticos e abióticos e restabelecer o seu metabolismo natural (SOARES & MACHADO, 2007). Além disso, a resistência natural da planta às doenças geralmente diminui durante o desenvolvimento de frutos e flores da planta e após sua colheita levando a infecções, doenças e finalmente à morte. Em produtos

hortícolas, as doenças pós-colheita causadas por fungos, geralmente surgem a partir de infecções latentes estabelecidas no campo; ou de infecções durante a colheita e do manuseio do produto vegetal. O declínio da resistência da planta às doenças pode ativar infecções quiescentes e a incidência ou severidade de determinada doença (RAPPUSSI *et al..*, 2009).

Os patógenos atacam áreas da planta que possuem afinidades, penetrando no hospedeiro através de aberturas naturais, ferimentos, ou por ação enzimática, força física ou ambas. Essa ação enzimática pode liberar fragmentos da parede celular do patógeno (oligossacarídeos solúveis) que apresentam potencial tóxico às plantas ou elicitam resposta de defesa (RODRIGUES, 2003). As respostas de defesa das plantas e o reconhecimento do patógeno são regulados de acordo com o tipo de interação patógeno-planta. Numa interação incompatível (patógeno avirulento e hospedeiro resistente), o sistema de defesa da planta é ativado de forma eficaz, conduzindo à resistência. Quando se trata de uma interação compatível (patógeno virulento e hospedeiro suscetível) o sistema de defesa é tardiamente ativado ou não é ativado, condicionando a doença (RESENDE *et al.*., 2003). Entretanto, os mesmos mecanismos de defesa que ocorrem em uma interação incompatível podem ser apresentados por hospedeiros suscetíveis ou com baixo nível de resistência através da indução de resistência.

A resposta da resistência natural dos tecidos vegetais à presença de um patógeno pode ser através de mecanismos estruturais ou bioquímicos pré e pós-formados. Os mecanismos pré-formados existem na planta antes da chegada do patógeno como a cutícula, tricomas, adaptações em estômatos, parede celular espessa e espinhos. Os fatores bioquímicos envolvem a presença de fenóis, alcaloides, fototoxinas, glicosídeos cianogênicos, glicosídeos fenólicos, inibidores proteicos, enzimas hidrolíticas. Por outro lado, os mecanismos de defesa pós-formados são mais eficientes na proteção da planta contra patógenos; eles permanecem inativos ou latentes e são apenas ativados após a chegada do patógeno. Esse processo também é conhecido como resistência induzida, sendo que as barreiras estruturais podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas, de camadas de abscisão e de cortiça, bem como tiloses. Enquanto os bioquímicos pós-formados podem englobar o acúmulo de fitoalexinas, proteínas protetoras relacionadas com a patogênese (PR-proteins), subdivididas em diversos grupos (β-1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, etc) e espécies reativas de oxigênio

(ERO). Esses mecanismos atuam na planta no sentido de evitar ou retardar a entrada de um micro-organismo no interior da mesma, bem como criar condições adversas para a colonização dos tecidos vegetais pelo patógeno (KUHN, 2007; PASCHOLATI *et al..*, 2008).

As plantas, durante o final do seu desenvolvimento e após o período de colheita, têm reduzida sua resistência natural ao ataque de patógenos, o que contribui para que se manifestem infecções quiescentes e aumente a incidência e severidade das doenças. Esse declínio da resistência natural pode ser ocasionado devido ao aumento dos requerimentos nutricionais do patógeno; à diminuição na produção dos compostos antifúngicos pré-formados e de fitoalexinas; ao aumento da ativação dos fatores de patogenicidade dos fungos. (BASSETTO, 2006).

O estresse na planta causado pelo ataque de patógenos induz a transcrição de genes responsáveis pela síntese de enzima de defesa, como por exemplo, a poligalacturonase que é ativada na planta por um mecanismo ainda não conhecido. Essa enzima degrada a parede celular da planta produzindo o ácido oligogalacturonico que causa a explosão oxidativa, ou seja, induz a produção de EROs. Alguns compostos de defesa em plantas, como as fitoalexinas (pisatina, faseolina,risitina, orchinol, ipomeamarone), inibidores proteicos e ligninas, têm a sua atividade induzida pela presença da quitosana. O uso terapêutico previne doenças infecciosas e aumenta a produção da planta (OROZCO-CADENAS *et al..*, 1999; DESAKI *et al..*, 2006).

Orozco-Cadenas *et al.*. (1999) verificaram que a aplicação em tomates de 125 µg/mL de quitosana induziu a produção de H_2O_2 e a atividade da poligalacturonase. Além disso, os resultados mostram o declínio nos níveis de H_2O_2 ,ao mesmo tempo em que a atividade da enzima poligalacturonase diminui. Isso reforça a hipótese que a atividade desta enzima está diretamente relacionada com a produção de H_2O_2.

Em resposta à presença de quitosana e seus derivados, as células vegetais induzem a produção de quitinase extracelular e fenilalanina amônia-liase. Essas enzimas hidrolisam a parede celular de agentes patogênicos, prevenindo infecções microbianas (DESAKI *et al..*, 2006). Sementes durante o período de germinação e plantação têm a atividade da quitinase (enzima que degrada a quitina em oligossacarídeos) elevada devido ao próprio sistema de autodefesa da planta. Essa atividade é aumentada mais de 1,5 com a cobertura das sementes com Quitosana em gel (Di PIERO & GARDA, 2008)

Outra resposta de defesa da planta contra ataques de patógenos e insetos é a

inibição da enzima proteinase que atua no lumen do intestino de insetos fornecendo os aminoácidos essenciais para sua nutrição. Esses inibidores estão presentes em muitas famílias de plantas e se localizam em seus órgãos reprodutivos e de reserva e tecidos vegetativos. A maioria desses inibidores são moléculas pequenas, estáveis, abundantes e fáceis de purificar, podendo também atuar como proteínas de reserva e como reguladores de enzimas endógenas. O mecanismo pelo qual os inibidores de proteinases interferem no processo digestivo dos insetos deve-se à diminuição da assimilação de nutrientes (FRANCO *et al.*., 1999). A quitosana quando aplicada em plantas de tomate induziu a transcrição de genes envolvidos com a síntese dos inibidores de proteinase através da via do octadecanoide. Mesmo na presença de inibidores desta via como o sódio p-chloromercuribenzenosulfonato (PCMBS), sódio diethyldithiocarbanato (DIECA), e sódio salicilato (SA), apenas os dois últimos inibiram a atividade indutora da quitosana (DOARES *et al.*., 1995).

Badawy & Rabea (2008) observaram efeitos da quitosana em frutos de tomate inoculados com Botrytis cinerea diretamente proporcional ao conteúdo de proteínas totais e aos compostos fenólicos solúveis em relação à concentração de quitosana aplicada. Ortega-Ortiz *et al.*. (2007) avaliaram o nível da atividade das enzimas peroxidase e catalase em frutos de tomate cv. "Petoseed" em diferentes estágios de desenvolvimento quando tratados com o indutor quitosana a 0,1%; ácido salicílico e ácido benzóico. Os autores constataram que os indutores de resistência exercem diferentes efeitos de acordo com o estágio de desenvolvimento do fruto nos quais são aplicados, bem como o aumento na atividade da catalase em tomate quando a quitosana foi aplicada durante o crescimento dos frutos. Segundo os autores, este aumento no nível da catalase está relacionado com a maior tolerância a danos oxidativos causados pelo frio. Entre os três indutores avaliados a quitosana resultou em maior diferença na atividade da peroxidase em relação ao controle. A atividade da peroxidase esta correlacionada à resposta de defesa do fruto na presença de patógenos. A maior atividade da peroxidase com o polímero parece indicar maior eficácia deste composto como um indutor do sistema antioxidante da planta.

Liu *et al.*. (2007) comprovaram aumento da atividade da peroxidase, da polifenoloxidase e de compostos fenólicos em tomates tratados com quitosana na presença de Botrytis cinerea e Penicillium. A indução de resistência em frutos também foi observada por Rappussi *et al.*. (2009), os quais aplicaram quitosana em frutos de

laranja inoculados com o fitopatógeno Guignardia citricarpa, e verificaram a inibição do desenvolvimento de novas lesões nas laranjas em condição de temperatura ambiente e sob refrigeração, e assim como o aumento da atividade da quitinase, β-glucanase, peroxidase e polifenoloxidase.

Di Piero & Garda (2008) ao avaliarem o controle da antracnose em feijoeiro-comum utilizando quitosana, constataram diferença na resposta da planta em relação ao intervalo de tempo entre a aplicação da quitosana e a inoculação do patógeno Colleotrichum lindemuthianum. A aplicação da quitosana em um intervalo maior antes da inoculação mostrou ser mais efetiva em reduzir a severidade da antracnose e induzir o sistema de defesa da planta. O biopolímero promoveu o aumento na atividade da enzima β- 1,3-glucanase, que atua diretamente nas glucanas presentes na parede celular do fungo fitopatogênico inibindo o seu desenvolvimento.

As enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e a tirosina amônia-liase (TAL) participam da via fenilpropanoide e seus produtos são modificados em precursores de metabólitos secundários, como por exemplo: ligninas, flavonoides e fitoalexinas os quais participam na interação da planta com o patógeno. A quitosana quando aplicada em plantas de soja aumentou a atividade das enzimas TAL e PAL, e consequentemente, elevou a quantidade de compostos fenólicos, que estão relacionados com o fenômeno de resistência da planta a doenças. A quitosana de alto peso molecular (hexameros de quitosana) induziu uma maior atividade destas enzimas ao ser comparada com tetrâmeros e pentâmeros de quitosana (KHAN *et al.*., 2003).

Fálcon *et al.*. (2002), observaram que a aplicação da quitosana hidrolizada em todas as concentrações estudadas (5, 50, 100 e 500 mg/L), quando aplicadas em plantas de tabaco inoculadas com o fungo fitopatógeno Phytophthora parasítica var. nicotianae apresentou maior atividade das enzimas FAL e glucanase. Além disso, a quitosana não hidrolizada nas concentrações de 50 e 500 mg/L também induziu maior atividade das enzimas quitinase, glucanase e FAL em plantas de tabaco, quando comparadas com o controle. A quitinase e a glucanase têm a capacidade de degradar parcialmente os polissacarídeos da parede celular dos fungos fitopatógenos.

De acordo com Otha *et al.*. (2004) e Rabea *et al.*. (2003) a quitosana possui na sua constituição química entre 6,89 % a 8,7% de nitrogênio, o que pode promover aumento no crescimento vegetativo e reprodutivo em algumas plantas. Otha *et al.*. (2004) observaram que o crescimento de Eustoma grandiflorum na presença de

quitosana a 1% acrescida ao solo ou de fertilizante rico em nitrogênio, fósforo e potássio, foi semelhante e maior do que o controle. Já a combinação dos dois tratamentos acentuou o crescimento da planta quando comparado com a aplicação separada. Os autores sugeriram que a quitosana além de proporcionar elevação no crescimento da planta devido ao seu conteúdo de nitrogênio, também pode induzir o sistema de defesa da planta. Resultados semelhantes foram encontrados por Otha *et al.*. (2004), que observaram durante o cultivo de várias plantas ornamentais o efeito da quitosana acrescida ao solo, em comparação com tratamentos utilizando fertilizante contendo a mesma dose de nitrogênio da quitosana e com o controle. A quitosana proporcionou maior produção de matéria seca e fresca da parte aérea e raiz e uma floração antecipada em comparação com os demais tratamentos.

Além de melhorar o crescimento, a resistência às doenças e a produtividade das plantas quando aplicada em pré-colheita, a quitosana também influencia na transpiração das plantas. Bittelli *et al.*. (2001) observaram que a quitosana (concentração 1g/L) aplicada nas folhas de Capsicum sp, cultivadas em casa-de-vegatação e no campo consumiram 26% e 43 % menos água do que o controle, respectivamente. A quitosana aplicada nas folhas induziu o fechamento dos estômatos através de uma diminuição do potássio (K) nas células guarda. Este elemento é o principal regulador do potencial osmótico em células-guarda, deste modo baixas concentrações de K resultam no fechamento dos estômatos, e vice-versa. Entretanto, a diminuição no consumo de água dos tratamentos com quitosana não afetou a produção de biomassa destas plantas, quando comparadas com o controle. Já a relação biomassa/água foi maior nas plantas tratadas com quitosana. Essa nova aplicação da quitosana mostra-se interessante economicamente porque pode ajudar a diminuir o consumo de água, principalmente na agricultura irrigada.

Kowalski *et al.*. (2006) e Asghari-Zakaria *et al.*. (2009), ao estudarem, *in vitro*, os efeitos da quitosana, respectivamente em batata (Solanum tuberosum cv. Désirée) e batata cv. Agria, relataram que a quitosana apresentou efeito positivo na matéria seca da parte aérea, melhorou a aclimatização das plantas em casa de vegetação, aumentando o número de minitubérculos e a produção, pode estabilizar a qualidade da planta, aumentou a qualidade das sementes, resultando em plantas no campo com aumento na produção e número de tubérculos e os rendimentos na micropropagação em um nível elevado. Os autores supracitados, também observaram que o biopolimero, além de

induzir a resistência e promover o crescimento das plantas, também, pode aliviar o estresse causado pelas condições de cultivo *in vitro* e durante a aclimatização.

3.12 Efeitos da quitosana na fixação biológica do N^2

O efeito da quitosana em plantas cultivadas *in vitro* foi avaliado em relação ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Costales *et al.*. (2005), estudaram a influência da quitosana, submetida a diferentes tratamentos de hidrólise, na interação da soja inoculada com Bradyrhizobium elkanii e seus efeitos na nodulação. A quitosana hidrolizada por 24 horas apresentou os melhores resultados tanto na formação dos nódulos como no incremento da biomasssa nodular, o que sugere que neste tempo de hidrólise se obteve fragmentos de quitosana com menor tamanho e atividade biológica.
A quitosana induz a planta a produzir mais flavonoides e outros indutores dos genes nod em bactérias, o que incrementa a interação simbiótica planta-bactéria contribuindo para uma melhor nodulação. Ali *et al.*. (1997) avaliando o efeito da quitosana na FBN em soja, observaram que a aplicação deste biopolímero no solo resultou em um efeito deletério no desenvolvimento dos nódulos e na fixação de nitrogênio durante o estágio inicial de desenvolvimento (28 dias após o plantio). Entretanto, a utilização de 0,1% de quitosana no solo ocasionou aumento da nodulação, da FBN e um melhor crescimento das plantas em comparação com o controle durante o último estágio de desenvolvimento avaliado (42 dias após o plantio). De acordo com estes autores, durante os estágios iniciais de desenvolvimento, a baixa concentração de quitosana estimulou a multiplicação dos rizóbios, o que pode ter estendido o processo de infecção das raízes pelos rizóbios nos estágios iniciais e o desenvolvimento dos nódulos produzidos no último estágio de desenvolvimento da soja.

4 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA

4.1 Caracterização do município de Gravatá

A caracterização foi realizada através de pesquisas literárias, e teve seus dados obtidos a partir do projeto intitulado “Cadastro de Fontes de Abastecimento por Água

Subterrânea no Estado de Pernambuco" - Diagnóstico do município de Gravatá. Realizado pelo Ministério de Minas e Energia com a supervisão do Programa de Desenvolvimento Energético dos Estados e Municípios - PRODEEM no ano de 2005 com posterior atualização para os dados obtidos pelo IBGE nos anos subsequentes.

4.2 Localização e acesso

O município de Gravatá está localizado na mesorregião Agreste e na microrregião Vale do Ipojuca do Estado de Pernambuco, limitando-se ao norte com Passira, ao sul com Barra de Guabiraba, Cortês e Amaraji, a leste com Pombos e Chã Grande, e a oeste com Bezerros e Sairé.

A área municipal ocupa 505 km^2 e representa 0,50 % do Estado de Pernambuco. Está inserido nas Folhas SUDENE de Caruaru e Vitória de Santo Antão na escala 1:100.000.

A sede do município tem uma altitude aproximada de 447 metros e coordenadas geográficas de $08^0$12'04" de latitude sul e $35^0$33'53" de longitude oeste, distando 87,7 km da capital, cujo acesso é feito pela BR-232.

Figura 04. Mapa de Pernambuco com a localização do município de Gravatá. Fonte IBGE 2008.

4.3 Aspectos socioeconômicos

O município foi criado em 30/05/1881, pela Lei Provincial n.º 1.560, sendo formado pelos distritos Sede, Mandacaru, Urucu-Mirim e pelos povoados de Russinhas e São Severino.

De acordo com o censo 2010 do IBGE, a população residente total é de 76.669 habitantes sendo 68.389 (89,2%) na zona urbana e 8.280 (10,8%) na zona rural. Os habitantes do sexo masculino totalizam 37.032 (48,3) %, enquanto que do feminino totalizam 39.637 (51,7) %, resultando numa densidade demográfica de 151,81 hab/km^2 (IBGE, 2010).

A rede de saúde compõe-se de 34 estabelecimentos de saúde, sendo 23 públicos e 11 privados com um total de 62 leitos, 25 ambulatórios, e 61 agentes comunitários de saúde pública (IBGE, 2010). A taxa de mortalidade infantil, segundo dados da DATASUS 2008 é de 58 crianças no ano.

Na área de educação o município possui 93 estabelecimentos de ensino fundamental com 12.220 alunos matriculados, e sete estabelecimentos de ensino médio com 3.410 alunos matriculados (IBGE, 2010).

Dos 34.128 domicílios particulares permanentes, 26.585 (77,9%) são abastecidos pela rede geral de água, 1.156 (3,9%) são atendidos por poços ou fontes naturais e 2.830 (8,3%) por outras formas de abastecimento. A coleta de lixo urbano atende a 12.012 (36%)% dos domicílios (IBGE 2009).

Os setores de atividade econômica formais são: indústria de transformação, gerando 611 empregos em 69 estabelecimentos; comércio com 792 empregos em 219 estabelecimentos; serviços com 907 empregos em 154 empresas; administração pública com 777 empregos em três instituições; agropecuária, extrativista vegetal, caça e pesca com 212 empregados em 46 estabelecimentos; extrativa mineral com 18 empregados em cinco empresas e construção civil com 126 empregados em 19 empresas.

O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal - IDH-M é de 0,654. Esse índice situa o município em 47º no ranking estadual e em 3.702º no nacional.

O Índice de Exclusão Social, que é construído por sete indicadores (pobreza, emprego formal, desigualdade, alfabetização, anos de estudo, concentração de jovens e violência) é de 0,366, ocupando a 46º colocação no ranking estadual e a 3.722º no nacional.

4.4 Aspectos fisiográficos

O município de Gravatá está inserido predominantemente na unidade geoambiental do Planalto da Borborema, formada por maciços e outeiros altos, com altitude variando entre 650 a 1.000 metros. Ocupa uma área de arco que se estende do sul de Alagoas até o Rio Grande do Norte.

O relevo é geralmente movimentado, com vales profundos e estreitos dissecados. Com respeito à fertilidade dos solos é bastante variada, com certa predominância de média para alta. Parte de sua área, a sudeste, está inserida na unidade ambiental das Superfícies Retrabalhadas.

A área da unidade é recortada por rios perenes, porém de pequena vazão e o potencial de água subterrânea é baixo.

A vegetação desta unidade é formada por florestas subcaducifólica e caducifólica, próprias das áreas agrestes.

O clima é do tipo tropical chuvoso, com verão seco. A estação chuvosa se inicia em janeiro/fevereiro com término em setembro, podendo adiantar-se até outubro.

Nas superfícies suaves onduladas a onduladas, ocorrem os planossolos, medianamente profundos, fortemente drenados, ácidos a moderadamente ácidos e fertilidade natural média e ainda os podzólicos, que são profundos, textura argilosa, e fertilidade natural média a alta. Nas elevacões ocorrem os solos litólicos, rasos, textura argilosa e fertilidade natural média. Nos vales dos rios e riachos, ocorrem os planossolos, medianamente profundos, imperfeitamente drenados, textura médio-argilosa, moderadamente ácida, fertilidade natural alta e problemas de sais. Ocorrem ainda afloramentos de rochas.

4.5 Recursos hídricos

4.5.1 Águas superficiais

O município de Gravatá encontra-se inserido nos domínios das bacias hidrográficas dos rios Ipojuca e Capibaribe. Seus principais tributários são os rios: Ipojuca e Amaraji, além dos riachos: do Esquerdo, Cotunguba, Caruá, Várzea do Saco, Muxoxo, da Botija, Gravatá, do Mel, Tigra, Vertente, de Penon e do Caranguejo. Não

existem açudes com capacidade de acumulação igual ou superior a 100.000 m^3. Todos os cursos d'água no município têm regime de escoamento intermitente e o padrão de drenagem é o dendrítico.

4.5.2 Águas subterrâneas (Domínios hidrogeológicos)

O município de Gravatá está totalmente inserido no Domínio Hidrogeológico no Fissural. O Domínio Fissural é formado de rochas do embasamento cristalino que englobam o subdomínio rochas metamórficas constituído do Complexo Vertentes e do Complexo Belém do São Francisco e o subdomínio rochas ígneas composto da Suite calcialcalina Itaporanga, dos Granitoides, Suite Intrusiva Leucocrática Peraluminosa e da Suite Gabro-anortosito Passira.

4.6 O vilarejo da Limeira

O Brejo da Limeira localizado entre as marcações geográficas ao norte 08°12'47.67"S e 35°31'13.95"W, 8º12'41.84"S 35º28'45.74"W e ao Sul entre as marcas 8º14'10.78"S e 35º30'25.12"W, 8º13'53.15"S e 35º28'43.26"W, situa-se no chamado vilarejo da Limeira, um remanescente florestal de brejo de altitude localizados no município de Gravatá, microrregião homogênea do Brejo pernambucano, a qual está inserida entre zonas fisiográficas distintas, a da mata, mais úmida, e a do sertão, mais seca. Do ponto de vista geomorfológico, os terrenos estão situados na escarpa oriental do Planalto da Borborema. A altitude varia de 650-700m e a precipitação média anual é de 1.100mm.

Trata-se de um remanescente que sofreu exploração seletiva e que há aproximadamente 12 anos passou a ser uma APP.

Em um pré-projeto que tinha como finalidade a elaboração do projeto de captação de recursos junto a financiadores, capacitação, otimização e aprimoramento da produção agrícola dos associados e/ou cooperativados, a ANTEAG (Associação Nacional das Empresas de Auto Gestão e Participação Acionária) junto a APSIL (Associação dos Produtores Rurais do Sitio Limeira), levantou em seu estudo prévio que a região compreende uma área total de 353 ha, onde moram aproximadamente 58 famílias. Destas, 47 vivem da agricultura familiar com médias de 2,8 ha por propriedade

e 2,6 pessoas por família trabalhando diretamente na lavoura. As demais (nove famílias) têm suas rendas provenientes de outros trabalhos nas regiões circunvizinhas ou possuem pequenos comércios locais com uma renda familiar média anual de sete mil cento e setenta e oito reais e setenta e seis centavos.

Os dados que mais chamaram atenção neste levantamento prévio foram a presença de adolescentes com idade entre 14 e 17 anos trabalhando nas lavouras e a baixa escolaridade, onde 78,3% dos produtores e familiares, com idade entre 18 e 60 anos eram analfabetos, analfabetos funcionais ou semialfabetizados.

4.7 Obtenção dos agrotóxicos

É determinado pela lei n.° 7.802/89 que a compra dos agrotóxicos só deve ser feita mediante a apresentação do receituário agronômico emitido por um profissional técnico competente, Engenheiro agrônomo, ou florestal, com registro no CREA. Porém não é difícil observar na comunidade da Limeira a aquisição destes produtos pelos agricultores no comércio da cidade de Gravatá ou nos municípios circunvizinhos e, em alguns casos, nas cooperativas de produtores sem a observação técnica necessária.

Os casos de compra de produtos proibidos por lei de forma clandestina são raras, mas ainda são observadas na região, sendo esses produtos utilizados, segundo os agricultores, apenas quando a praga não consegue ser dominada com os agortóxicos permitidos.

As informações e instruções referentes ao uso dos produtos são feitas de forma geral pelos balconistas das lojas ou pelos vizinhos e estes últimos em não raros casos recomendam a mistura de dois ou tres tipos de produtos diferentes na hora da preparação da calda. Poucos parecem seguir o recomendado na bula dos produtos.

Desta forma, o que vemos é o não cumprimento da lei que, somada à desinformação, passa a ser um problema sério de saúde pública.

A falta de conhecimento sobre os produtos e a baixa escolaridade dos agricultores de forma geral, suscita fatos como a utilização de fertilizante químico NPK, liquido, como defensivo agrícola, fato observado no Sítio Cabeleira localizado na região.

Os produtos mais utilizados pelos agricultores da Limeira pertencem aos grupos químicos dos organofosforados, piretroides e Carbamatos sendo estes produtos usados desde o plantio até a colheita.

Na tabela 16 observam-se os agrotóxicos mais utilizados pelos produtores rurais da Limeira e seus grupos químicos.

Tabela 16. Agrotóxicos mais utilizados pelos produtores rurais da Limeira e seus grupos químicos. Fonte ANTEAG 2008.

NOME COMERCIAL	GRUPO QUÍMICO	UTILIZAÇÃO	CLASSE
Baytroid CE	Piretroide	Inseticida	I
Elsan	Organofosforado	Inseticida	I
Folidol	Organofosforado	Inseticida	I
Folysuper	Organofosforado	Inseticida	IV
Karate 50 CE	Piretroide	Inseticida	II
Lannate Br	Carbamato	Inseticida	I
Microsol	Enxofre	Fungicida/acaricida	IV
Reconil	Cúprico	Fungicida	IV
Ridomil Mancozeb BR	alaninatos editiocarbamato	Fungicida	II
Stron	Organofosforado	Inseticida/acaricida	I
Sumidan 25 CE	Piretroide	Inseticida	I

4.8 Estocagem dos defensivos

Observamos em todas as 15 roças visitadas anteriormente à execução do projeto, que os trabalhadores rurais da região do Sítio Limeira armazenavam seus agrotóxicos de forma completamente inadequada, estando estes dispostos fora de qualquer especificação técnica em barracos de apoio no meio da plantação, sob arbustos ou pendurados dentro de sacos plásticos em árvores nas proximidades da área de plantio e em alguns casos, dentro de casa. Não raras vezes, os vasilhames dos produtos após

vazios eram descartados de forma irregular nas proximidades dos roçados, corpos e cursos de água ou enterrados junto com o lixo doméstico.

A B C

Figura 5. Estocagem do defensivo. (A) Em saco plástico próximo à área de produção. (B) A céu aberto, junto a entulhos domésticos. (C) Bombas de aplicação, sacos de pesticidas e barril de preparo deixados ao relento. Fonte ANTEAG.

4.9 Preparação e aplicação dos agrotóxicos

Foi observado que em todos os casos os próprios agricultores fazem a diluição dos produtos de forma intuitiva, não seguindo às medidas recomendadas nos rótulos. Esse tipo de procedimento notoriamente gera prejuízo financeiro pelo uso excessivo e desnecessário de quantidades maiores que as recomendadas pelos fabricantes, e evidente sobrecarga de veneno nas plantações. O procedimento é justificado por eles por acharem que a praga não está sendo controlada de forma eficaz na dosagem recomendada.

O preparo da calda é feita no campo, junto às áreas de cultivo, sendo colocadas as doses dentro da bomba de pulverização, modo este recomendado pelos fabricantes, e em seguida, diluídas com água sendo a concentração definida de acordo com critério pessoal.

No caso dos agrotóxicos em pó e de difícil diluição, eles utilizam baldes de plástico onde é feita a mistura que, em seguida, é retirada com uma caneca ou lata afixada em um cabo de madeira improvisado e colocado dentro do regador. Em um caso observamos que após se utilizar o balde para diluição do veneno em pó, este era lavado e usado para a lavagem de roupa da família.

A lavagem do material e o descarte das sobras são feitos nas proximidades das áreas de plantio no solo, o que faz com que seja maior a probabilidade de contaminação

ambiental dos aquíferos como açudes, riachos e olhos d'água. Esse tipo do procedimento passa a ser potencialmente perigoso ao ambiente, à saúde do agricultor e a sua família, pois todo esse rejeito, e a própria pulverização, correm o risco de serem carreados através dos canais de irrigação para outras áreas. O quadro é agravado ainda pela forma como o agricultor aplica o agrotóxico, sem uso de EPIs.

Os trabalhadores aplicam mais de 60 litros de veneno por dia e esse valor pode ser elevado para mais de 200 litros, quando se trata de lavoura de alto rendimento e alto risco como a do tomate.

Observou-se de forma corriqueira a adulteração do bico de aspersão da bomba com a finalidade de dar maior despejo de veneno sobre a planta sob a alegação de que "*tem que deixar a planta molhada mesmo!*"

O momento escolhido pelo agricultor para a aplicação é feito de forma empírica baseado na experiência e por ter ocorrido prejuízos em outras safras. Dessa forma as aplicações passam a ter um caráter preventivo.

Nas culturas assistidas na comunidade da Limeira que tem como principais produtos agrícolas o tomate, o pimentão, o morango, flores temperadas, o feijão, o chuchu e a macaxeira a frequência de aplicação varia de acordo com o processo produtivo:

Na fase de sementeira ocorre geralmente uma aplicação apenas.

Figura 6. Aplicação de defensivos sem utilização de EPI'S. Fonte ANTEAG.

Após o plantio e durante a colheita – 63% dos produtores aplicam duas vezes por semana, 21% aplicam uma vez por semana e os demais (15%) apenas uma aplicação quinzenalmente.

Mediante esses dados preocupantes foram realizadas palestras na Associação dos Produtores Rurais do Sítio Limeira (APSIL), visando esclarecer, instruir e alertar os agricultores da região sobre os ricos e a boa prática no uso dos pesticidas.

Com esse objetivo, foram utilizados materiais impressos sobre o manuseio, estocagem e cuidados, além de apresentação, com recursos audiovisuais e métodos lúdicos trabalhando a consciência ambiental dos participantes, levando em consideração não apenas os problemas relacionados com os agrotóxicos, mas outras questões como lixo doméstico, higiene pessoal e cuidados na preparação dos alimentos.

5 METODOLOGIA

5.1 Cepas utilizadas para a produção de quitosana

A produção e extração de quitosana foram realizadas a partir das biomassas de *Cunninghamella elegans* (UCP 542), *Mucor rouxxi* (UCP 064), *Mucor javanicus* (UCP 049) e *Rhizopus orizae* (UCP 402), isoladas do sedimento de mangue do município de Rio Formoso, e pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB - Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP. As amostras foram mantidas em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (ABD) e estocadas sob refrigeração (5ºC).

5.2 Cepas testes utilizadas para revelação de atividade antimicrobiana

As cepas utilizadas para a determinação da atividade antimicrobiana da quitosana foram isoladas de frutos (morango, tomate, feijão, limão, pimentão, quiabo, maracujá, graviola, laranja, banana) e flores temperadas pré-colheita cultivados na Limeira. Os micro-organismos foram identificados no Departamento de Micologia e de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco.

5.2.1 Bactérias

Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Yersinia enterocolitica, Staphylococcus aureus e *Escherichia coli*

5.2.2 Fungos

Fungos filamentosos *Aspergilus niger*, *Aspergillus flavus*, A*spergillus parasiticus, Aspergillus fumigatus, Penicillium expansum*, *Penicillium fumigatus, Penicillium citrinum, Penicillium funiculosum, Penicillium pinophilum, Fusarium oxysporum, Fusarium moniliforme*, *Rhizopus stolonifer, Botrytis cinerea* e *Colletotrichum musae, Colletotrichum gloeosporioides.*

Fungos leveduriformes *Saccharomyces cerevisiae, Candida guillermondi, Candida glabrata* e *Candida krussi.*

5.3 Meios de cultivo

O meio ágar Sabouraud foi utilizado para manutenção das cepas fúngicas, tanto para os fungos produtores de quitosana, quanto para os fungos utilizados na revelação de atividade antimicrobiana. Para a produção de quitina e quitosana foi utilizado o meio de cultura: Caldo Jacatupé (*Pachyrhizus erosus L. Urban*) cuja composição química contém 8,72g de proteínas totais, 16,9g de lipídeos, 40,9g de amido, 11,14g de glicose , para 1L de água destilada, pH 7,0. Os tubérculos de jacatupé que foram usados na preparação do caldo foram colhidos na Estação Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, cuja superfície foi lavada com água e sabão, para a retirada de impurezas. O caldo jacatupé foi preparado a partir das túberas descascadas e fatiadas em rodelas (±1,5cm), as quais foram fervidas em água destilada na proporção de 1:2 (p/v) por 45 minutos. Após o resfriamento, o caldo obtido foi filtrado em filtro de papel e em seguida, autoclavado a 121,5°C, por 15 minutos, como descrito por Stamford *et al.*. (2007).

Para o crescimento bacteriano e a determinação da atividade antimicrobiana frente às bactérias estudadas foram utilizados os meios Brain Heart Infusion (BHI) e gar Müeller Hinton, respectivamente. Para o crescimento fúngico e determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado o meio ágar Sabouraud.

5.4 Manutenção dos micro-organismos e padronização do inóculo

Esporos obtidos a partir de culturas de fungos da ordem Mucorales foram coletados e transferidos para um tubo de ensaio contendo uma solução 0,1% de "Tween 80". A suspensão foi inoculada, em uma placa de Petri, contendo caldo Jacatupé. Após 12 horas de crescimento, foi retirada uma UFC (unidade formadora de colônia) e realizado o cultivo por cinco dias a 28ºC. Os esporos formados foram retirados com o auxílio de 'cotonetes' estéreis e suspensos em solução salina tamponada, sendo o inóculo padronizado na concentração de 10^7 esporos/mL (STAMFORD *et al.*., 2007).

As cepas bacterianas reveladoras de atividade antimicrobiana foram cultivadas em meio Agar Muller Hinton e incubadas a 37ºC por 24/48 horas, sendo conservadas a 4ºC. Foram preparadas suspensões de células 10^8 UFC/mL dessas cepas bacterianas em meio líquido BHI, sendo então, incubadas por 24 horas, a 37ºC.

As cepas de fungos filamentosos e leveduriformes reveladores de atividade antifúngica foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud inclinado sob refrigeração (8°C, ±1°C). Para os ensaios de atividade antifúngica foram utilizados repiques das culturas estoques subcultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud incubados a 25-28°C durante sete dias para suficiente esporulação dos fungos filamentosos e por 48 horas para crescimento dos fungos leveduriformes.

Os esporos fúngicos e as células das leveduras foram colhidos através da adição de solução salina (0,85% p/v) estéril no meio contendo o fungo, seguido por agitação durante 30 segundos. O número de esporos/unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na suspensão foi determinado através de contagem utilizando câmara de Newbauer. A concentração obtida de esporos/UFC foi ajustada com solução salina estéril para prover um inóculo fúngico final de aproximadamente 10^7 esporos/mL para fungos filamentosos ou 10^7 UFC/ml para as leveduras (RASOOLI & ABYANEH, 2004; RASOOLI & OWLIA, 2005).

5.5 Consumo de glicose e de proteínas totais

O consumo de glicose e de nitrogênio foi avaliado no meio jacatupé, utilizando método colorimétrico (Lab-Test). Para a determinação de glicose foi realizada uma curva padrão com solução de glicose (0,5 - 5,0 g/ml). Para proteínas totais foi utilizada a solução padrão BSA (albumina de soro bovino) com faixa de concentração variando entre 1,0 e 4,0 g/dl. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital de duplo feixe (Spectronic Mod. Genesys 2) no comprimento de onda de 510nm e de 545nm, respectivamente para glicose e proteína total.

5.6 Determinação do pH

O acompanhamento da variação do pH do líquido metabólico foi realizado por potenciometria (potenciômetro digital Quimis mod. 400 A).

5.7 Produção de quitosana

Esporangíolos produzidos após sete dias de crescimento em ágar batata dextrose (ABD) foram coletados utilizando-se água destilada e contados em hematocitômetro com padronização de inóculo em 10^8 esporangíolos/mL. As culturas foram crescidas em reatores de 5L, contendo meio Jacatupé, sendo mantida a temperatura de 28ºC sob agitação de 300rpm durante 72 horas, como descrito por Stamford *et al.*. (2007). Ao final do crescimento a massa micelial foi filtrada a vácuo lavada duas vezes com água destilada gelada e posteriormente submetida à extração de quitosana.

5.8 Extração de quitosana

A quitosana foi extraída a partir da massa micelial liofilizada dos fungos de acordo com método descrito por Stamford *et al.*. (2007). O processo envolve desproteinização por hidróxido de sódio 2% (p/v), seguida de centrifugação, hidrólise ácida com ácido acético 10% (v/v), a quitosana foi obtida por precipitação com NaOH como podemos ver no esquema da descrito na figura 7.

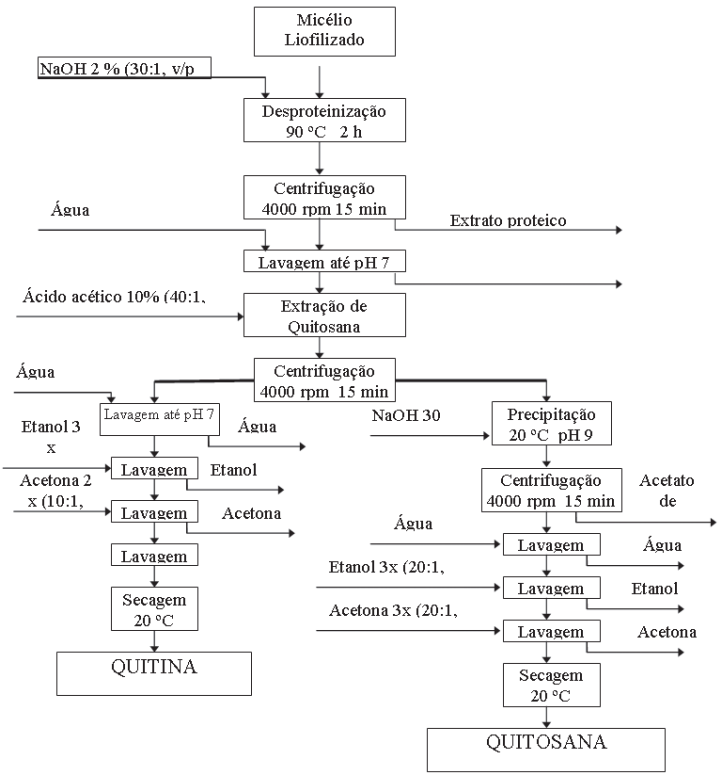


Figura 7. Descrição esquemática da extração de quitina e quitosana segundo método descrito por Stamford *et al.* (2007)

5.9 Caracterização das quitosanas

5.9.1 Determinação do grau de desacetilação (DD%)

O grau de desacetilação das amostras de quitosana foi determinado por espectometria de raio de infravermelho, segundo metodologia descrita por Amorim *et al.*, (2006). Aproximadamente, 1,5 mg, de cada amostra de quitosana, foi seca em estufa a vácuo por 15 horas a 60 °C. Após este período, 100mg de KBr foram adicionados e a mistura homogeneizada em almofariz de ágata. As pastilhas foram preparadas e deixadas em estufa a vácuo a 110°C por 20 horas. Os espectros de IR foram registrados em um espectrofotômetro BRUKER Mod. IFS 66**.** O grau de desacetilação foi determinado pela equação: 100- DA (grau de acetilação), enquanto que o grau de acetilação (DA) foi determinado usando a absorbância A_{1655}/ A_{3450} , calculado através da seguinte equação:

$$DA/\% = (A1655/A3450) \cdot 100/1.33$$

5.9.2 Determinação do peso molecular

Os pesos moleculares das amostras da quitosana foram determinados por viscosidade, segundo a metodologia proposta por Santos *et al.*. (2003). As medidas de viscosidade foram feitas utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske ($d_{interno}$= 1,01mm) termostatizado a (25± 0,01)ºC, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte. Para a determinação da viscosidade intrínseca, [η], foram preparadas soluções de quitosana (utilizando tampão de ácido acético como solvente) com concentrações variando de 9,0 x 10^{-4} a 3,0 x 10^{-3}g. ml^{-1}. Os tempos de escoamento foram determinados em segundos. As amostras foram feitas em quatro replicatas e a média das medidas foi calculada.

5.9.3 Desacetilação da quitosana

Cinco gramas de quitosana (Qce) foram suspensos em 220 ml de solução aquosa de NaOH 40% e mantidos sob agitação mecânica a 350 rpm, por 6h à temperatura de 115ºC. Após, esse período, o meio reacional foi filtrado e o sólido lavado com água até

atingir um pH próximo a 7,0. Em seguida, a quitosana obtida (Qce6H) foi lavada com 30 ml de metanol e seca à temperatura ambiente.

5.9.4 Despolimerização da quitosana

Dois gramas de quitosana (Qce) foram dissolvidos em 100 ml de 0,1M HCl e agitados por 24 horas. Após esse período, foi acrescentado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na razão de 1:5, e mantidos sob agitação mecânica a 350rpm por 2 horas à temperatura de 60ºC. Em seguida, o meio reacional foi filtrado a vácuo com três papéis de filtros quantitativo da VETEC seguindo as especificações de filtração rápida, média e lenta na respectiva ordem de filtragem. Após a filtração lenta, parte da solução foi retirada para a medida de viscosidade e na outra parte foi adicionado etanol na proporção de 1:1 (v/v). Depois de 48 horas observou-se a precipitação da quitosana (QceD). Para retirar todo o sobrenadante foi necessário centrifugar a amostra a 4.500 rpm e em seguida transferir o precipitado para uma placa de vidro e armazená-la em um dissecador contendo sílica até que a amostra fique completamente seca.

5.9.5 Preparo do cloridrato de quitosana (quitosana solúvel em água)

O cloridrato de quitosana (ClQce) foi obtido por dissolução de 1 g de quitosana (Qce) em 100 ml de ácido clorídrico 0,1M e agitação contínua durante 18 horas. Após esse período a solução obtida foi filtrada a vácuo com papel de filtro quantitativo da VETEC com especificação de filtração lenta. Em seguida foram realizadas diálises com membrana de celofane com limite de exclusão de 12.000 Dalton por dois períodos consecutivos de 36 horas; o primeiro contra solução aquosa de NaCl 0,2mol/L e o segundo contra água deionizada. Após as diálises a amostra foi liofilizada e armazenada em dessecador contendo sílica.

5.9.6 Preparação das soluções de quitosana

Soluções de quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* (Qce), solução de quitosana desacetilada (Qce6H) e solução de quitosana despolimerizada (QceD) nas concentrações de 10 a 0 mg/ml foram preparadas em acido acético 1%

(v/v), de acordo com metodologia descrita por Shigemasa & Minami (1996). O pH foi ajustado pela adição controlada de NaOH 0,010 mol/L para obtenção de pH final 5,5. As soluções de cloridrato de quitosana (ClQce) nas concentrações de 10 a 0 mg/ml foram preparadas em água destilada, com pH final 7,0.

5.10 Teste da membrana corioalantoide do ovo - Teste de biocompatibilidade

O teste da membrana corioalontoide do ovo visa avaliar o potencial de irritação e a biocompatibilidade de uma substância, no presente trabalho das soluções de quitosana (Qce, Qce6H, QceD e ClQce). No décimo dia de incubação, o reservatório acima do espaço aéreo do ovo foi removido. A membrana corioalantoide do ovo foi exposta e umedecida com salina fisiológica a 0,9%, a qual foi cuidadosamente removida com algodão, expondo a membrana corioalantoide. Uma alíquota de 200µl da substância foi aplicada na membrana corioalantoide para verificar os efeitos irritantes (hemorrágia, coagulação e lise) por um período de 5 minutos. Observou-se o tempo (em segundo) em que os processos de hemorragia, coagulação e lise iniciavam-se, para posterior inserção na fórmula abaixo, segundo Kalweit *et al.* 1987, 1990:

$$\frac{(301 - \text{Hemorragia})}{300} \times 5 + \frac{(301 - \text{Lise})}{300} \times 7 + \frac{(301 - \text{Coagulação})}{300} \times 9$$

Onde:

Hemorragia → Representa o tempo (em segundo) quando primeiro apareceu a hemorragia sanguínea.

Lise → Representa o tempo (em segundo) quando primeiro surgiu a lise dos vasos.

Coagulação → Representa o tempo (em segundo) quando primeiro apareceu a coagulação.

Após aplicação na fórmula foi possível quantificar o potencial de irritação observado e obter a média ± desvio padrão da média para realizar a análise conforme classificação abaixo.

A classificação do potencial de irritação das substâncias é avaliada de acordo com a tabela 17.

Tabela 17. Valores de referência do potencial de irritação das substâncias

FAIXA DE PONTUAÇÃO	CATEGORIA DE IRRITAÇÃO
0 - 0,9	Não irritante
1 – 4,9	Ligeiramente irritante
5 – 8,9	Irritação moderada
9 – 21	Irritação grave/severa

5.11 Atividade antimicrobiana

Para determinar as concentrações mínimas bacteriostáticas/fungiostáticas, bactericidas/fungicidas das amostras de quitosana (Qce, Qce6H, QceD e ClQce) foi realizado o teste de Heilman, descrito por Marmonier (1987).

Para determinação da atividade antimicrobiana das amostras de quitosana (Qce, Qce6H, QceD e ClQce), foram utilizados tubos de ensaios contendo 0.3 ml do pré-inóculo e 2.7 ml de meio BHI ou caldo Sabouraud, contendo solução de quitosana (Qce, Qce6H, QceD e ClQce) em concentrações variando de 0 a 10mg/ml. Dois ensaios controle foram realizados, em que primeiro os micro-organismos foram crescidos na ausência de quitosana e no segundo os micro-organismos foram crescidos na presença de ácido acético a 1%. As bactérias foram incubadas por 48 horas, a 37°C, e os fungos leveduriformes e filamentosos, respectivamente, 2 e 7 dias, a 28° C, sendo realizada a leitura após esse período.

A concentração mínima bacteriostática/fungiostática (CMI) foi considerada como sendo a concentração de quitosana (Qce, Qce6H, QceD e ClQce) a partir da qual não for observado crescimento microbiano visível, nos tubos de ensaio. Para a determinação da concentração mínima bactericida/fungicida foram retiradas alíquotas, dos tubos de ensaios, anterior e posterior ao referente à CMI e realizadas diluições (10^{-1}, 10^{-2},10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}) para o crescimento microbiano em placa de Petri contendo meio Müeller Hinton para as cepas bacterianas e meio ágar Sabouraud para as cepas fúngicas. As bactérias foram incubadas, a 37ºC por 48 horas, as leveduras e fungos filamentosos foram incubados a 28ºC por 2 dias e por 7 dias, respectivamente. A concentração mínima bactericida/fungicida (CMB/CMF) foi considerada como sendo aquela a partir

da qual não foi observado crescimento microbiano após cultivo, na ausência de quitosana.

5.12 Interferência sobre o crescimento micelial radial de fungos filamentosos

A avaliação da inibição do crescimento micelial radial foi determinada utilizando-se a técnica do envenenamento do substrato de crescimento (diluição em meio sólido). Para tal, fez-se a medida diária do crescimento micelial radial em ágar Sabouraud adicionado de diferentes concentrações de quitosana ou de cada óleo essencial. Para a execução da técnica, inicialmente, foi tomada uma porção de 2 mm de diâmetro de uma cultura da cepa fúngica com crescimento de 10 dias em ágar Sabouraud a 25-28 °C, a qual foi colocada no centro de uma placa de Petri estéril com ágar Sabouraud adicionado de quitosana ou do óleo essencial em diferentes concentrações. O sistema foi incubado a 25-28°C por 14 dias. Em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4, 6, 9, 12 e 14 dias) de incubação, o crescimento micelial radial da colônia fúngica foi medido e o resultado expresso em milímetros (mm) (ADAM *et al*..,1998; DAFERERA *et al*.., 2003). O controle incluído nesse ensaio foi a observação do crescimento micelial radial da cepa fúngica em ágar Sabouraud sem adição de quitosana ou do óleo essencial.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Produção, extração e caracterização de quitosana por fungos da ordem Mucorales em meio Jacatupé

O perfil de crescimento dos fungos estudados no meio Jacatupé foi observado durante 96 horas, como apresentado na Figura 10.

Os resultados evidenciam maior produção de biomassa com 48 horas de crescimento para *C. elegans* e *R. orizae*, onde se observa peso de matéria seca correspondente a 24,3 g/L e 20,7g/L, respectivamente. Entretanto, as amostras de *M. javanicus* e *M. rouxii* apresentaram melhor rendimento de biomassa, peso de matéria seca, com 72 horas de cultivo, sendo, respectivamente, de 16,6g/L e 16,8g/L.

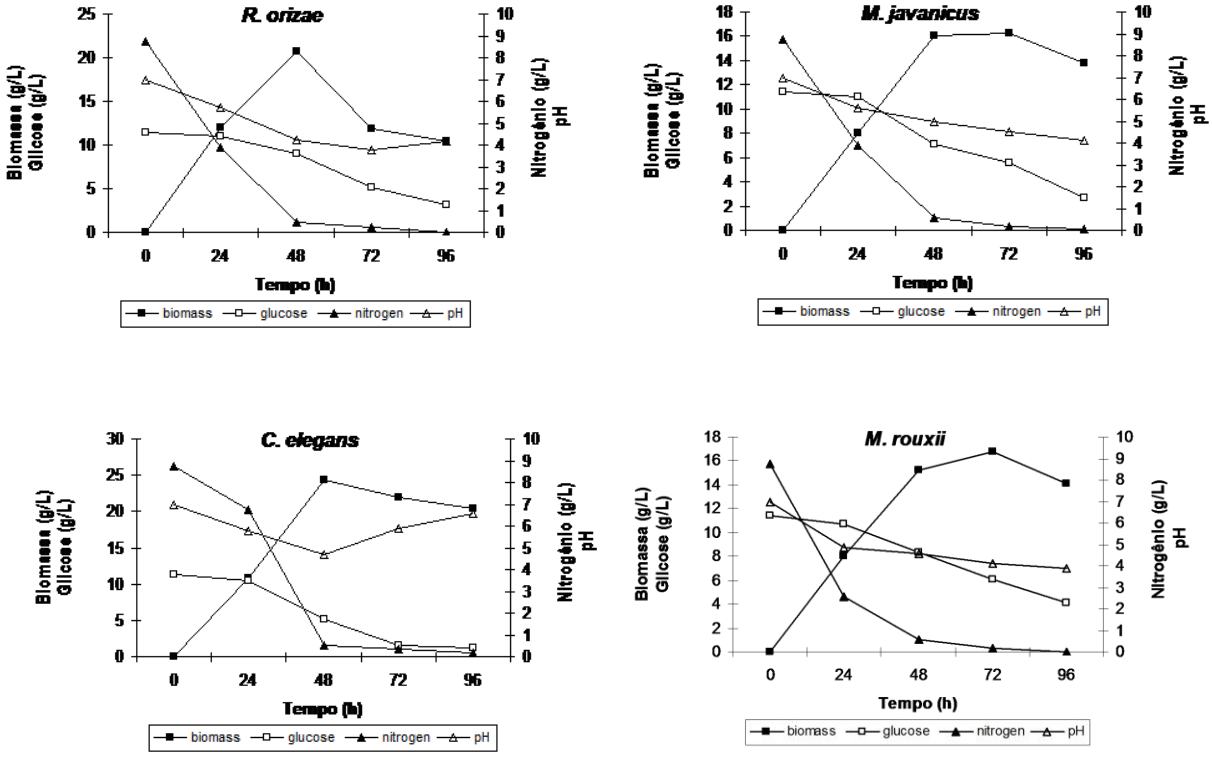


Figura 8. Curva de crescimento da *Cunninghamella elegans* (UCP 542), *Mucor rouxxi* (UCP 064), *Mucor javanicus* (UCP 049) e *Rhizopus orizae* (UCP 402) no meio Jacatupé durante 96 horas de cultivo a 28°C e sob agitação orbital de 150rpm

O comportamento das curvas em relação ao consumo das fontes de glicose e nitrogênio por *C. elegans, R. orizae, M. javanicus* e *M. rouxii* durante o crescimento (Figura 8) mostram um decréscimo sucessivo nas concentrações no decorrer das 96 horas de incubação, caracterizando a utilização dos substratos pelos micro-organismos. Ao final do processo fermentativo, observa-se a presença de glicose remanescente em média de 2,8 g/L, significando um excesso de fonte de carbono, enquanto o nitrogênio foi consumido quase totalmente (0,073g/L). A presença de glicose e nitrogênio remanescentes após 96 horas de cultivo, provavelmente, é devido a compostos nitrogenados resultantes do metabolismo secundário.

O comportamento do pH no decorrer do período de 96 horas de cultivo demonstra oscilação, na faixa de 6 a 3,5. O pH diminuiu durante a fase "exponencial", provavelmente, devido à formação de ácido pirúvico decorrente da alta concentração de glicose (11,4g/L) e de amido (40,9g/L) no meio de cultura. A queda do pH nas primeiras 24 h de cultivo, permanecendo em torno de pH 5-4 durante as 96 h de cultivo, pode ser explicado devido à alta troca metabólica com os substratos do meio e liberação de íons da célula fúngica.

A figura 9 apresenta os rendimentos de quitina e quitosana extraídas a partir da biomassa dos fungos crescidos em meio Jacatupé durante 96 horas de cultivo. Observa-se maior produção dos polissacarídeos, em miligramas por grama de micélio seco, com 48 horas de cultivo para quitosana e com 72 horas para quitina. A produção de quitosana estabilizou-se após 48 horas de cultivo, com exceção do *M. javanicus*, no qual se observou um declínio na produção de quitosana após 48 horas de cultivo. A produção de quitina aumenta até 72 horas, e logo após decai. Maior rendimento de quitosana em 48 horas de cultivo sugere que durante a fase inicial de crescimento do fungo a quitina deve estar menos cristalina e mais susceptível à ação da quitina deacetilase e que a ação da enzima prevalece em pH 4,5 (Figura 9), o que corresponde ao pH ótimo da enzima quitina deacetilase para Zygomycetes.

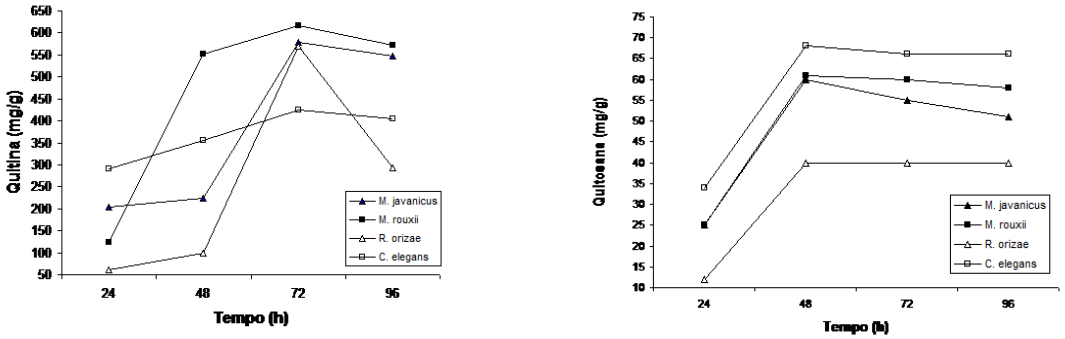


Figura 9: Produção de quitina (A) e de quitosana (B) em mg por grama de biomassa seca de *Cunninghamella elegans* (UCP 542), *Mucor rouxxi* (UCP 064), *Mucor javanicus* (UCP 049) e *Rhizopus orizae* (UCP 402) no meio Jacatupé durante 96 horas de cultivo a 28°C sob agitação orbital de 150rpm, em intervalos de 24 horas

As análises dos espectros de infravermelho (Figura 10) referentes à quitosana obtidas das biomassas de fungos crescidas em meio Jacatupé e modificadas quimicamente por desacetilação e despolimerização tiveram como regiões mais significativas dos espectros, aquelas que revelam bandas amida em 1665, 1555 e 1313 cm^{-1} as quais mostram dicroísmo perpendicular, atribuído à interação de acoplamento com C=O, à deformação de N– H no plano CONH e a ligação CN com deslocamento de CH_2, respectivamente.

As principais bandas características para a quitosana foram as evidenciadas em 1284, 1386 e 1513. A desacetilação e os processos de regeneração, causam perturbação no retículo cristalino inicial da quitina, induzindo a quitosana a um reordenamento das ligações de hidrogênio. Isso pode ser observado pela banda larga centrada entre 3483cm^{-1} e 3305cm^{-1}, na região da deformação axial do OH, a qual aparece sobreposta à banda de deformação axial do NH, indicando a formação de ligação de hidrogênio intermolecular, e pelo deslocamento da banda para freqüência mais alta, indicando um aumento na ordem estrutural.

Na tabela 18 são apresentados os valores de grau médio de desacetilação (%*GA*) e os valores da massa molar média viscosimétrica (M_V) para as amostras de quitosana extraída da massa micelial de *C. elegans* (UCP 542), *M. rouxxi* (UCP 064), *M. javanicus* (UCP 049) e *R. orizae* (UCP 402) crescida em meio Jacatupé, antes e após as modificações químicas por desacetilação e despolimerização.

Tabela 18. Valores de grau de desacetilação (*GD*) e massa molar média viscosimétrica (*Mv*) das amostras de quitosana extraídas das biomassas de Mucorales crescidas em meio Jacatupé

Amostra	**Grau de desacetilação (%)**		**Mv $_x$ 10^4 (g/mol)**	
	Qce	**Qce6H**	**Qce**	**QceD**
C. elegans	85	95	32,5	2,72
M. rouxxi	81	90	31,3	2,19
M. javanicus	83	94	31,7	2,25
R. orizae	80	92	30,9	2,17

O grau de desacetilação é um parâmetro importante em relação às propriedades físico-químicas da quitosana, pois é diretamente proporcional à propriedade catiônica desse polímero. As quitosanas obtidas da biomassa dos fungos apresentaram grau de desacetilação variando de 80 a 85% GD. As massas molares médias viscosimétricas da quitina e quitosana relatadas no presente trabalho encontram-se na faixa de 2,17 x 10^4 a 3,25 x 10^4 g/mol.

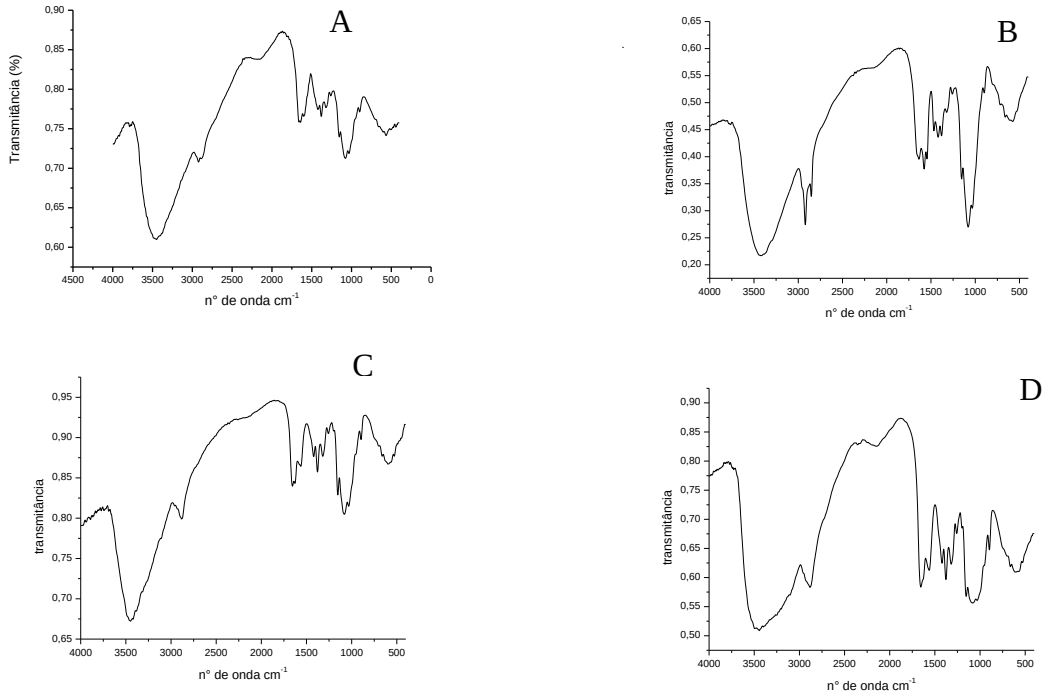


Figura 10. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) das amostras de quitosana extraídas das biomassas de *Cunninghamella elegans* (A), *Mucor rouxxi* (B), *Mucor javanicus* (C) e *Rhizopus orizae* (D) crescidas em meio Jacatupé

As propriedades da quitosana estão intimamente relacionadas ao grau de desacetilação e peso molecular, sendo imprescindível à determinação dos mesmos.

Desse modo, o conhecimento preciso do teor de grupos N-desacetilados (GD.) e, consequentemente, de grupos NH_2 é importante, de maneira a caracterizar qualquer processo de desacetilação da quitina, assim como qualquer outra modificação química.

6.2 Biocompatibilidade das soluções de quitosana

Com relação à biocompatibilidade pelo teste da membrana corioalontoide do ovo, após administração de 200µl de cada solução de quitosana na membrana corioalantoide e transcorridos 5 minutos de observação, constatou-se que as amostras de quitosana testadas não proporcionaram hemorragia sanguínea, coagulação ou lise dos vasos, bem como sinais de inflamação, edema ou neovascularização. Os mesmos resultados foram observados em 5 repetições, como observado na Tabela 19.

Tabela 19. Avaliação do potencial de irritação da quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* (Qce), Quitosana desacetilada a 95% (Qce6H), Quitosana despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce)

n	**Hemorragia**				**Coagulação**				**Lise**			
	Qce	Qce6H	QceD	ClQce	Qce	Qce6H	QceD	ClQce	Qce	Qce6H	QceD	ClQce
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Segundo a classificação de Lupke (1985) e Kalweit *et al.*. (1987, 1990) a quitosana pode ser considerada não irritante, uma vez que não proporcionou hemorragia, coagulação e nem lise na membrana corioalantoide do ovo em um período de observação de 5 minutos, como verificado na Tabela 20.

Estes resultados segundo Steiling *et al.*. 1999 pode demonstrar a biocompatibilidade da quitosana e de seus derivados. A membrana corioalantoide é uma típica membrana de ovos fertilizados de aves, representando o órgão embrionário responsável pelas trocas gasosas enquanto o embrião se desenvolve no interior do ovo (STEILING *et al.* 1999). A forma como essa membrana responde à aplicação tópica de substâncias em sua superfície corresponde a um importante parâmetro para avaliar a atividade, biocompatibilidade e toxicidade de drogas (VARGAS *et al.*. 2007).

Tabela 20. Avaliação da biocompatibilidade da quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* (Qce), Quitosana desacetilada a 95% (Qce6H), Quitosana despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce)

n	Sinais de inflamação				Edema				Neovascularização			
	Qce	Qce6H	QceD	ClQce	Qce	Qce6H	QceD	ClQce	Qce	Qce6H	QceD	ClQce
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

O modelo da membrana corioalantoide do ovo pode ser utilizado como alternativa para o estudo de angiogenesi e resposta inflamatória a biomateriais (ZWADLO-KLARWASSER *et al.* 2001). Similarmente, na área de cosméticos sendo usado para avaliar propriedades irritantes das formulações dos cosméticos e seus ingredientes (STEILING *et al.* 1999).

Durante os últimos anos vem sendo desenvolvido uma variedade de métodos *in vitro* para predizer o potencial de irritação ocular (MUIR *et al.* 1983). O interesse na aplicação de métodos alternativos é bastante diversificado e nesse contexto, encontra-se o teste da membrana corioalantoide do ovo, despontando como uma possibilidade de alternativa para o teste de irritação ocular no olho de Draize.

6.3 Atividade antimicrobiana

Como demonstrado na Tabela 21, as amostras de quitosana extraídas da biomassa de *C. elegans* e seus derivados apresentaram atividade antimicrobiana para todas as cepas de bactérias e as concentrações bactericidas/fungicidas mínimas (CMB/CMF). Na tabela 11, também foi verificado que o peso molecular (QceD) e a solubilidade da quitosana (ClQce) influenciaram mais efetivamente na atividade antimicrobiana da quitosana, quando comparado com os diferentes graus de desacetilação (Qce e Qce6H).

Observou-se que a quitosana e seus derivados foram mais efetivos para as amostras de bactérias e leveduras do que para os fungos filamentosos, uma vez que foram necessárias concentrações mais elevadas para inibir o crescimento e ocasionar a morte celular dos fungos filamentosos.

Com relação às cepas bacterianas a *S. enterica* apresentou maior resistência à quitosana e a seus derivados. Entre as cepas de leveduras estudadas, as de *S. cerevisiae* e *C. glabrata* foram as mais resistentes, contudo, constatou-se que as 4 leveduras apresentaram as mesmas CMI e CMF para o cloridrato de quitosana, respectivamente de 0,3125mg/ml e de 1,25mg/ml.

A atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados para os fungos filamentosos demonstrou maior resistência em ordem decrescente para as amostras de Aspergillus, Penicilium, Fusarium, Colletotrichum, Botrytis e Rhizopus.

Tabela 21. Atividade antimicrobiana da quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* (Qce), Quitosana desacetilada a 95% (Qce6H), Quitosana despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce) para patógenos pré e pós-colheita isolados de frutas, grãos e flores tropicais da Limeira

Micro-organismos	**Concentração Mínima Inibitória (CMI) mg/ml**				**Concentração Mínima Fungicida/Bactericida (CMF/CMB) mg/ml**			
	Qce	**Qce6H**	**QceD**	**ClQce**	**Qce**	**Qce6H**	**QceD**	**ClQce**
BACTÉRIAS								
L, monocytogenes	1,25	1,25	0,625	0,3125	2,5	2,5	1,25	0,3125
P. aeruginosa,	2,5	1,25	0,625	0,3125	10,0	5,0	1,25	0,3125
S. entérica	5,0	5,0	2,5	1,25	10,0	10,0	5,0	2,5
Y. enterocolitica	1,25	1,25	0,625	0,3125	2,5	2,5	1,25	0,3125
S. aureus	2,5	2,5	1,25	0,625	5,0	5,0	2,5	0,625
E. coli	2,5	1,25	0,625	0,3125	5,0	2,5	1,25	0,625
LEVEDURAS								
S. cerevisiae	2,5	2,5	1,25	0,3125	5,0	5,0	2,5	1,25
C. guillermondi	1,25	1,25	0,625	0,3125	2,5	2,5	1,25	1,25
C. glabrata	2,5	2,5	1,25	0,3125	5,0	5,0	2,5	1,25
C. krussi	1,25	1,25	0,625	0,3125	2,5	2,5	1,25	1,25
FUNGOS FILAMENTOSOS								
A. niger	5,0	5,0	5,0	0,625	10,0	10,0	5,0	1,25
A. flavus	5,0	5,0	2,5	0,625	10,0	10,0	5,0	1,25
A. parasiticus	5,0	5,0	5,0	0,625	10,0	10,0	5,0	1,25
A. fumigatus	5,0	5,0	2,5	0,625	10,0	10,0	5,0	1,25
P. expansum	5,0	5,0	2,5	0,625	10,0	10,0	5,0	1,25
P. fumigatus	5,0	5,0	2,5	0,3125	10,0	10,0	5,0	1,25
P. citrinum	5,0	5,0	2,5	0,3125	5,0	5,0	2,5	0,625
P. funiculosum	5,0	5,0	5,0	0,625	10,0	10,0	5,0	1,25
P. pinophilum	5,0	5,0	2,5	0,3125	5,0	5,0	2,5	0,625
F. moniliforme,	5,0	5,0	2,5	0,3125	5,0	5,0	2,5	0,625
R. stolonifer	2,5	2,5	0,625	0,152	5,0	5,0	2,5	0,6125
B. cinérea	2,5	2,5	1,25	0,3125	5,0	5,0	2,5	0,625
C. musae	2,5	2,5	1,25	0,625	5,0	5,0	2,5	1,25
C. gloeosporioides	5,0	5,0	2,5	1,25	10,0	10,0	5,0	2,5

6.4 Crescimento radial dos fungos filamentosos

Mediante os resultados da atividade antimicrobiana da quitosana fúngica e seus derivados foram realizados o crescimento radial dos fungos filamentosos, para as duas amostras de quitosana que apresentaram melhor atividade antimicrobiana. No ensaio de crescimento radial as cepas fúngicas estudadas não cresceram na presença das Concentrações Mínimas Fungicidas (CMF) da quitosana desacetilada e do cloridrato de quitosana (Figura 10). O crescimento radial foi medido quando no experimento controle, na ausência de quitosana, o fungo cresceu em toda a placa de Petri (90 mm).

Observa-se na Tabela 22 que houve uma diminuição do crescimento radial de todos os fungos testados com as quitosanas desacetilada e o cloridrato de quitosana, em relação ao controle (90 mm), nas concentrações abaixo da Mínima Inibitória e Inibição Significativa, do crescimento fúngico nas concentrações Mínima Inibitória.

Tabela 22. Crescimento radial dos fungos filamentosos na presença de quitosana obtida da biomassa de *Cunninghamella elegans* despolimerizada com peso molar 2,17 x 10^4 g/mol (QceD) e cloridrato de quitosana (ClQce) nas concentrações abaixo da Mínima Inibitória e na concentração Mínima Inibitória (CMI)

FUNGOS	Abaixo da CMI (mm)		CMI (mm)	
FILAMENTOSOS	QceD	ClQce	QceD	ClQce
A. niger	50	45	29	12
A. flavus	67	55	23	10
A. parasiticus	75	65	20	7
A. fumigatus	73	45	24	11
P. expansum	75	50	17	5
P. fumigatus	78	53	15	5
P. citrinum	80	65	10	2
P. funiculosum	63	46	10	2
P. pinophilum	70	53	12	2
F. moniliforme,	72	63	15	5
R. stolonifer	78	71	10	2
B. cinerea	50	45	13	5
C. musae	53	42	17	5
C. gloeosporioides	60	60	15	5

No grupo controle cresceu em toda a placa de Petri (90 mm) entre 4 e 7 dias a 28°C.

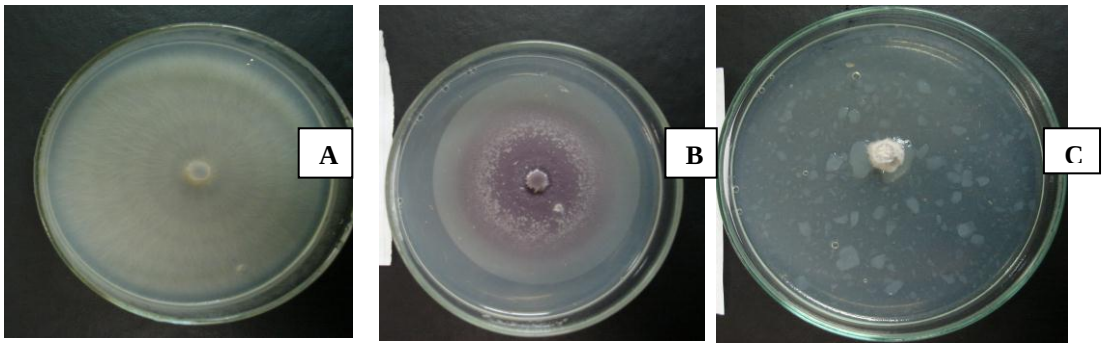


Figura 11. Crescimento radial de *Aspergillus flavus* na ausência de quitosana (A), na presença de quitosana desacetilada em concentração abaixo da Mínima Inibitória (B) e na concentração Mínima Inibitória (C).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. (1998) Antifungal activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifólia, and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1739-1745,.

ADDOR, R.W. Insecticides. In: GODFREY, CR.A. (Ed). (1995) Agrochemiealfrom natural products. New York: Marcel Dekker,. p. 1-62.

ALI, M.; HORIUCHI, T.; MIYAGAWA, S. (1997), Nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean plants (*Glycine max* Merr.) in soil supplemented with chitin and chitosan. **Jpn. J. Crop Sci**., v. 66, n^{o} 1, p. 100-107.

ALVES, S.M.F. (2006). Condições de trabalho e percepção de riscos associados ao uso de agrotóxicos na cultura de tomate de mesa em Goiás. Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás, 93 p.

AMORIM RVS, SOUZA W, FUKUSHIMA K & CAMPOS-TAKAKI GM (2000) Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. Braz. J. Microb. 32, 20-23.

AMORIM RVS, CAMPOS-TAKAKI GM & LEDINGHAM WM (2005) Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. J. Indust. Microb. Biotech. 31, 19-23.

AMORIM RVS, PEDROSA R P, FUKUSHIMA K, MARTÍNEZ CR, LEDINGHAM WM & CAMPOS-TAKAKI G M (2006) Alternative Carbon Sources from Sugar Cane Process for Submerged Cultivation of Cunninghamella bertholletiae to Produce Chitosan. Food Technol. Biotechnol. 44, 519–523.

ANDEF (Associação Nacional de Defensivos Agrícolas). (2004). Manual de uso correto de equipamento de proteção individual. Acesso em 17/10/2009. Disponível em http://www.andef.com.br/epi.

ANDEF (2005). Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil: análise de seu impacto sobre o ambiente e a saúde humana. Disponível em: http://andef.com.br/util_defensivos/capitulo01.htm. Acesso em 15.02 de 2009

ANDEF. (2010) Associação Nacional de Defesa Vegetal. Manual de uso correto de Equipamentos de Proteção Individual; Manual de uso correto e seguro de produtos fitossanitários / agrotóxicos; Destinação final de embalagens vazias de agrotóxicos.Disponível em:<http://www.andef.com.br>. Acesso em: 30 agosto de

ANDEF. (2010) Associação Nacional de Defesa Vegetal. Por que precisamos de produtos fitossanitários? Seção Agricultura. Disponível em: <http://www.andef.com.br/2003/agri01.asp> . Acesso em: 26 agosto de 2009.

ANDRADE VS, NETO BB, SOUZA W & CAMPOS-TAKAKI G M (2000) A factorial desing analysis of chitin production by Cunninghamella elegans. Can. J. Microbiol. 46, 1042-1045.

ANDRADE VS, NETO BB, FUKUSHIMA K, CAMPOS-TAKAKI G M (2003) Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by Mucor circinelloides (Mucor javanicus IFO 4570)- A factorial study. Rev. Iberoam, Micol. 20, 149-153.

ANJOS FSC (2005) Filmes e beads à base de quitosana: incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de química fundamental. 93p.

ANTEAG, (2008) Relatório das associações rurais da região de Gravatá – PE O trabalho na agricultura familiar.

ANUÁRIO MINERAL BRASILEIRO, (2000). Brasília: DNPM, v.29. 401p.

ARAÚJO A.J.; ROSÁRIO M.L.S.; ROLDAN R.; ET AL., (2000). organizadores. "Meio Ambiente, Saúde e Trabalho", CUT-RJ, Comissão de Meio Ambiente. 1ª ed. Rio de Janeiro; 2000. Acesso em 12/08/2010. Disponível em: http://www.sindipetro.org.br/extra/cartilha-cut/index.htm

ASGHARI-ZAKARIA, R.; MALEKI-ZANJANI, B.; SEDGHI, E .(2009), Effect of *in vitro* chitosan applications on growth and minitubers yield of *Solanum tuberosum* L. Plant Soil Environ**.**, v. 55, n^{o} 6, p. 252-256.

AVADI, M.R.; SADEGHI, A.M.M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K.H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M.J.; RAFIEE-TEHRANI, M. (2004). Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. European Polymer Journal, 40, 1355-1361,

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; M. COSTA, A. C. F. (2007), Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 23, p. 27-34.

BADACH et al,.(2000) Organochlorine pesticides concentration in the drinkng water from regions of extensive agriculture in poland. AAEM; 7:25-8

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. (2008), Potential of the biopolymer chiosan with different molecular weights to control postharvest Gray mold of tomato fuit. Postharvest Biol. Technol. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.05.018.

BASSETTO, E. (2006), Quantificação de danos ao longo da cadeia produtiva de pêssegos e avaliação de métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, ESALQ, USP.

BITTELLI, M.; FLURY, M.; CAMPBELL, G. S.; NICHOLS, E. J. (2001), Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and** Forest Meteorology, v. 107, p. 167-175

BORDERÍAS, A. J.; SÁNCHEZ-ALONZO, I.; PÉREZ-MATEOS, M. (2005). New applications of fibers in foods: Addition to fishery products. Trends in Food Science and Technology, 16, 458-465.

BRASIL, ABIQUIM (Associação Brasileira da Indústria Química). Acesso em 20/11/2009. Disponível em www.abiquim.org.br

BRASIL, ANVISA (2005). O papel da ANVISA na avaliação e controle dos agrotóxicos. Acesso em 22/09/2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br

BRASIL, ANVISA (2008). Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Consultado em 03/07/2008.

BRASIL, ANVISA (2010). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório Anual 4/06/2001 – 30/06/2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.

BRASIL, DECRETO Nº 24.114, DE 14 DE ABRIL DE 1934. Aprova o regulamento de defesa sanitária vegetal. In: Gelmini GA, Novo JPS. Defensivos agrícolas: informações básicas e legislação. Campinas: Fundação Cargill; 1987. p. 416-23.

BRASIL, DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências [documento on-line]. Diário Oficial da União; 8 jan 2002. Disponível em URL: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/

BRASIL, DECRETO nº 991, de 24 de novembro de 1993.Altera o Decreto nº 98.816, de 11/01/1990. In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília(DF): Ministério da Agricultura e do Abastecimento;1998. p. 57-9.

BRASIL, FUNDACETRO (1998) Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos: segurança e saúde no trabalho, n. 3. São Paulo: Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Ministério do Trabalho,.

BRASIL, IBGE (1977). Geografia doBrasil. Região Nordeste. Rio de Janeiro: SERGRAF,. Disponível em 1 CD.

BRASIL, IBGE (2009). Mapas Base dos municípios do Estado de Pernambuco. Escalas variadas. In édito.

BRASIL, IBGE, (2009). Assistência Médica Sanitária. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

BRASIL, IBGE, (2010) Primeiros Resultados do Censo.

BRASIL, IBGE. (2010) Levantamento sistemático da produção agrícola - LSPA. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: . Acesso em: 08 jun. 2010.

BRASIL, LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília (DF): Ministério da Agricultura e do Abastecimento; 1998. p. 7-13.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (SNVS). (1998) Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9/12/91". In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília (DF): Ministério da Agricultura e do Abastecimento; p. 153-77

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (SNVS). Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9/12/91". In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília (DF): Ministério da Agricultura e do Abastecimento; 1998. p. 153-77.

BRASIL, MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. Secretaria de Minas e Metalurgia; CPRM – Serviço Geológico do Brasil [CD ROM] Geologia, tectônica e recursos minerais do Brasil, Sistema de Informações Geográficas SIG. Mapas na escala 1:2.500.000. Brasília: CPRM, 2001. Disponível em 04 CD's

BRASIL, SEBRAE-PE. (2003) Projeto Setorial Integrado de Promoção das Exportações de Flores e Folhagens de Corte de Pernambuco – PSI. Recife,.

BRASIL, SUCEN (2009), Superintendência de Controle de Endemias. Normas de uso de praguicidas da Sucen. Sorocaba, SUCEN, Serviço Regional.

BUENO, W. C. (2004) Veneno no prato, açúcar na pauta: a comunicação a serviço do lobby dos agrotóxicos. Conferência Brasileira de Comunicação e Saúde-2004, IV, 2004. Disponível em:http://www.scielosp.org. Acesso em Dezembro de 2009

BUOSI, D.; FELFILI, J. M. (2004) Recuperação de Áreas contaminadas por Pesticidas Organoclorados na Cidade dos Meninos, Município de Duque de Caxias, RJ", *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.28, n.3, p. 465-470.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. (2007), Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na presença de uva Itália contra *Botrytis cinerea*. Summa Phytopathol., v. 33, n. 3, p. 215-221

CAMPANA-FILHO S P, BRITTO D, CURTI E, ABREU F R, CARDOSO M B, BATTISTI MV, SIM P C, GOY R C, SIGNINI R & LAVALL R L (2007) Extração, estrutura e propriedades de alfa- e beta-quitina. Química Nova, 30, 644-650.

CALDAS L.Q.A. (2000) Intoxicações exogénas por insecticidas. Centro de Controle de Intoxicações de Niterói.

CAMPANILLI, M. (2004) "Estudo permite identificar POPs em mamíferos marinhos". Disponível em: http://www.estadão.com.br/ext/ciencia/oceanos/sinais/sinais5.htm. Acessada em 17/02/2010.

CAMPOS-TAKAKI GM (2005) The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: Dutta, PK. (ed.). Chitin and chitosan opportunities and challenges. India, SSM: International Publication.,

CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2005) The versatility of copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P.K. (Ed) Chitin and chitosan opportunities & Challenges. India, SSM: International Publication, pp.69-64,.

CANELLA KMNC, GARCIA RB (2001) Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. Quim. Nova 24, 13-17.

CAO Z & SUN Y N (2007) Halamine-based chitosan: Preparation, characterization, and antimicrobial function. J Biomed Mater Res. 1.,

CARLTON, F.B.; SIMPSON, W.M. & HADDAD, L.M (1998). The Organophosphate and Other Insecticides. In: Haddad, L.M., Shannon, M.W., Winchester, J.F. Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose, Philadelphia, Pensylvania, USA. WB Saunders Company, 3a ed. 1998, p. 836-850.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. (1998). Golden Age of Insecticide research: Past, Present, or Future? Annu. Rev. Entomol. v.43, p.1–16.

CETESB, (2002). http://www.cetesb.sp.gov. Acessada em 12/01/2009.

CHATTERJEE S, ADHYA M, GUHA AK & CHATTERJEE BP (2005) Chitosan from Mucor rouxii: production and physico-chemical characterization. Process Biochem 40, 395-400.

CHOI BK, KIM KY, YOO YJ, OH SJ, CHOI JH & KIM CY (2001) In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against Actinobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans. Int J Antimicrob Agents, 18, 553-557.

CHOI, W.Y.; PARK, H.J.; AHN, D.J.; LEE, J.; LEE, C.Y.(2010) Wettability of chitosan coating solution on Fiji apple skin. Journal of Food Science, 67, 2668–2672.

CHUNG, Y.-C.; SU, Y. -A.; CHEN, C. –C.; JIA, G.; WANG, H. -L.; WU, J. C. G.; LIN, J. G. (2004) Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. Acta Pharmacol Sin, 25, 932-936,.

CLARK, R.B. (2001) Marine Pollution. 5ª edition. Oxford University Press. 172p

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, (2004) A. Edible antimicrobial films base don chitosan matrix. Journal of Food Science, 67, 1162-1169.

COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. (2006) Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. Química Nova, 29, 776-785.

COSTABEBER, I, (1999) Tratamiento de muestras humanas para el análisis de resíduos organoclorados. In: X Encontro Nacional de Química Analítica, Resumos, p.TA16. Santa Maria-RS: Universidade Federal de Santa Maria.

COSTALES, D.; NÁPOLES, M. C.; FALCÓN, A. (2005), Efecto de derivados de quitosana em la simbiosis *Bradyrhizobium*-soya. Cultivos Tropicales, v. 26, n^{o} 1, p. 83-87.

COUMOL, X.; DIRY, M.; BAROUKI, R, (2002) PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. Biochem. Pharmacol., v. 64, n. 10, p. 1513-1519.

CRUZ, S; LINO, C. & SILVEIRA, M.I. (2003) Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal. Science of the Total Environment, v.317 p.23-35.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. (2003) The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Crop Protection, 22, 39-44.

DEJOURS, C., ABDOUCHELY, E. & JAYET, C. (1994). Psicodinâmica do trabalho. Atlas, São Paulo.

DEL GRANDE, M. & REZENDE, M.O.O. (2003) Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da bacia do Rio Piracicaba/SP-Brasil. Química Nova, v.26, p.678-686.

DELGADO, I.F; BARRETO, H.H.C; ALLELUIA, I.B; BAGGIO, C.A. & PAUMGARTTEN, F.J.R. (2002) Serum levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls among inhabitants of Greater Metropolitan Rio de Janeiro, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, v.18, p.519-524.

DESAKI Y, MIYA A, VENKATESH B, TSUYUMU S, YAMANE H, KAKU H MINAMI E & SHIBUYA N (2006), Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. Plant Cell Physiol. 47, 1530-1540.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. (2008), Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. Pesq. Agropec. Bras., v. 43, nº9, p. 1121-1128.

DOARES, S. H.; SYROVETS, T.; WEILER, E. W.; RYAN, C. A. (1995), Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. Proc. Natl. Acad. . Sci. USA, v. 92, p. 4095-4098.

DOTTO, G. L.; GREVINELI, A. C.; OLIVEIRA, A.; PONS, G.; PINTO, L. A. A. (2008), Uso de quitosana como filme microbiológico para o aumento da vida útil de mamões papaya. Conhecimento sem fronteiras, XVII Congresso de Iniciação Científica, X Encontro de Pós-Graduação.

DU, D., DING, J., CAI, J. & ZHANG, A.(2007) Colloids and Surfaces B: Biointerfaces v.58, p.145.

ELLENHORN, M.J (1997) Ellenhorn's Medical Toxicology - Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. 2nd Ed. Willian & Wilkins Co. Baltimore, USA, , 2047p.

FALCÓN, A. B.; RAMÍREZ, M. A.; MÁRQUEZ, R.; HERNÁNDEZ, M. (2002), Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora paraitica* interaction. Cultivos Tropicales, nº1, v. 23, p. 61-66.

FALK J. W, CARVALHO L. A, SILVA L. R, PINHEIRO S.(2002) Suicídio e Doença Mental em Venâncio Aires/rs: conseqüência do uso de agrotóxicos organofosforados: relatório preliminar de pesquisa Disponível em URL: <http://galileu.globo.com/edic/133/agro2.doc>.

FERREIRA, W. L. B. (1999) Inseticidas de uso domiciliar e controle de vetores de doenças. In: MARICONI, F. A. M. (Ed.) Insetos e outros invasores de residências. Piracicaba: FEALQ, v. 6,. p. 403-452.

FILHO, J.P.A. (2002). Uso de agrotóxicos no Brasil – Controle Social e Interesses Corporativos. Annablume, São Paulo.

FRANCO, O. L.; F. R. MELO; M. C. M. SILVA & M. F. GROSSI DE SÁ. (1999). Resistência de plantas a insetos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 10: 36–40.

FRANCO LO, STAMFORD TCM, STAMFORD NP & CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2005) Cunninghamella elegans (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. Analyt. 3, 40-44.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M, (2005) Cunninghamella elegans (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. Revista Analytica, 3, 40-44.

GARCIA, E. G. (2001). Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. 1. ed. São Paulo: Ed. Fundacentro.

GARCIA, E.G & ALVES FILHO,J.P. (2005) Aspectos de prevenção e controle de acidentes no trabalho com agrotóxicos. São Paulo. Fundacentro. 52 p.

GHAOUTH, A. E.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. (1991), Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82:398-402.

GUAIUME, S.,(2001) Laudo comprova contaminação de moradores de Paulínia. Disponível em:http//www.estadão.com.br/agestado/noticias/2001/ago/23/243.htm., 2001.Acessada em 16/02/2009.

GUIVANT, J.S. (1992). Uso de agrotóxicos e os problemas de sua legitimação: um estudo de sociologia ambiental no município de Santo Amaro da Imperatriz – SC. Tese de Doutorado, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Estadual de Campinas, 387 p.

HERNANDÉZ-LAUZARDO, A. N.; BAUTISTA-BAÑOS, M. G.; VELÁZQUEZ-DEL, V; MÉNDEZ-MONTEALVO, M. G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M. M.; BELLO-PÉREZ, L. A. (2008), Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Carbohydrate Polymers 73, p.541-547.

HORNER V, PITTERMANN W & WACHER R (1997) Efficiency of high molecular weight chitosan in skin care applications. In: Domard A, Roberts GAF & Varum KM. Advances in chitin science. Lyon, Jacques Andre Publishers. , p.671-677.

IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; KAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C.G & HINCAL, A.A. (2002) Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. Int. J. Pharm. v.235, p.121-7.

Intergovernmental Fórum on Chemical Safety -IFCS. Acutely toxic pesticides initial input on extent of problem and guidance for risk management [on-line]. Geneva;World Health Organization (2003). Available from: URL:http://who.int/ifcs/Documents/Forum/ForumIV/. http://www.baygon.com Acessada em 17/02/2010

JAYAKUMAR R, REIS RL & MANO JF (2007) Synthesis and characterization of pH-sensitive thiol-containing chitosan beads for controlled drug delivery applications. Drug Deliv. 14, 9-17.

KALWEIT S, GERNER I. SPIELMANN H. (1987) Validation project of alternatives for draizer eye test. Mol Toxic 1:597- 603

KALWEIT S, BESOKE R, GERNE I , SPIELMANN (1990) A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. Toxic in Vitro 4:702 – 706

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. (2003), 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.

KHOUSHAB F; YAMABHAI M. (2010) Chitin Research Revisited. Mar. Drugs v.8, p.1988-2012,

KHUN, O. J. (2007), Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

KHUR, R.J., DOROUGH, H.W. (1977) Carbamate Insecticides Chemistry, Biochemistry and Toxicology, CRC Press, Boca Raton,.

KOWALSKI, B.; TERRY, F. J.; HERRERA, L.; PEÑALVER, D. A. (2006), Application of soluble chitosan in vitro and in the greenhouse to increase yiel and seed quality of potato minitubers. Potato Research, v. 49, p. 167-176.

KUMAR MR (2000) A Review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, 1-27.

LAFLAMME, P.; BENHAMOU, N.; BUSSIERES, G. & DESSUREAULT. (1999), Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Can. J. Bot*. 77:1460-1468.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. (2009), Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. Quim. Nova, v. 32, n^{o} 3, p. 672-678.

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU,Y. (2007) Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biology and Technology, 44, 300-306.

LUPKE, N. P. (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem. Toxicol.* 23, 287-291.

MAIA RCC, FRANCO LO, STAMFORD TCM, FUKUSHIMA K, PORTO ALF & CAMPOS-TAKAKI G.M.. (2006) Chitin producted by Cunnunghamella elegans (IFM 46109) and applied to wound healing. J Asian Chitin 2, 11-20.

MARMONIER AA (1987). Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Chap. 4. Antibiotiques,Technique de diffusion en gélose méthode des disques. © SIMEP SA-PARIS, France, pp. 238-244.

MATUO, Y.K; LOPES, J.N.C. & MATUO. (1990) T. Contaminação do leite humano por organoclorados DDT, BHC e Ciclodienos. Jaboticabal: Editora da FUNEP.

MAZARO, S. M.; DESCHAMPS, C.; MIO, L. L. M.; BIASI, L. A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C. K. (2008), Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. Rev. Bras. Frutic., v. 30, n.1, p. 185-190.

MIDIO, A. F.; SILVA, E. S. (1995) Inseticidas: acaricidas organofosforados e carbamatos. São Paulo: Roca,.

MOREIRA J.C.; JACOB S.C.; PERES F.; LIMA J.S.; ARAUJO A.J.; (2002). Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. Ciência e Saúde Coletiva. 7(2):299-311.

MUIR, D.C.G., B.E. TOWNSEND, AND W.L. LOCKHART. (1983). Bioavailability of six organic chernicals to *Chironomus tentans* larvae in sediment and water. Environmental Toxicology and Chemistry. 2:269-281.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. (2004) Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. Biomaterials, v.25, p.3829 –3835,.

NAMBA, T., et al.(1971) Poisoning Due to Organophosphate Insecticides: Acute and Chronic Manifestations. The American Journal of Medicine, 50: 475-492.

NICHOLSON, S.S. (1995)Toxicity of insecticides and skin care products of botanical origin. Veterinary Dermatology. v.6, n.3, p.139-43.

OLIVEIRA, W. & ADEODATO, S.O. (1997) O bairro que respira veneno. Globo Ciência,v.6, p.48-51,.

OLMEZ SS, KORKUSUZ P, BILGILI H & SENEL S (2007) Chitosan and alginate scaffolds for bone tissue regeneration. Pharmazie. 62, 423-31.

OPAS, (1996). Organização Pan-Americana de Saúde. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, Ministério da Saúde.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN -FAO. (1990) Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Roma.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. (1999), Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 6553-6557.

ORTEGA-ORTIZ, H.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; MENDOZA-VILLARREAL, R.; RAMIREZ-RODRÍGUEZ, H.; ROMENUS, K. A. (2007), Enzimatic activity in tomato fruits as a response to chemical elicitors. J. Mex. Chem. Soc., v. 51, n^{o} 3, p. 141-144.

OTTAWAY, J.H. (1982) Bioquímica da poluição. São Paulo: Editora da USP.

PACHECO, N.; LARRALDE-CORONA, C. P.; SEPULVEDA, J.; TROMBOTTO, S.; DOMARD, A.; SHIRAI, K. (2008), Evaluation of chitosans and *Pichia guillermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. International Journal of Biological Macromolecules v. 43, p. 20-26.

PALMA-GUERRERO, J. P.; JANSON, H. P.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V. (2007), Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. Journal of Applied Microbiology 104, p. 541-553.

PARK, J.H., KWON, S., NAM, J.-O., PARK, R.-W., CHUNG, H., SEO, S.B., KIM, I.-S., KWON, I.C., JEONG, S.Y. (2004), Journal of Controlled Release, 95, 579

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (2008), Interação Planta-Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Fundação de Estudos Agários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Biblioteca de Ciêcnias Agrárias Luiz de Queiroz, v. 13, p. 627.

PAWTLOWSKA E (1997) The assessment of influence of chitosan on the dental pulp in rats. In: Domard, A.;, Roberts, GAF.;, Varum, KM. Advances in chitin science. Lyon: Jacques Andre Publishers, p.705-710.

PEDROSO, I.L.P.B. (2006). Meio Ambiente, agroindústria e ocupação dos cerrados: o caso do município do Rio Verde no Sudoeste de Goiás. Revista Saúde Pública. 39 (5).São Paulo.

PERES, F. (1999). É veneno ou é remédio? Os desafios da comunicação rural sobre agrotóxicos. Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública/ Fundação Oswaldo Cruz.

PERES, F.; ROZEMBERG, B.; ALVES, S.R.; MOREIRA, J.C.; OLIVEIRA-SILVA, J.J. (2001). Comunicação relacionada ao uso de agrotóxicos em região agrícola do Estado do Rio de Janeiro. Revista Saúde Pública. 35 (6). São Paulo.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUNOIS, G.S. (2003) É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ,. cap 1.

PERES, F. et al. (2004) Percepção das condições de trabalho em uma tradicional comunidade agrícola em Boa Esperança, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. Cad Saúde Pública, v. 20, n. 4, p. 1.059- 1.068,.

PERES F, et al. (2005) Challenges in the study of human and enviromental contamination by pesticides. Ciência e saúde coletiva, Rio de Janeiro, v. 10, supl., p.27-37.

POCHANAVANICH P & SUNTORNSUK W (2002) Fungal chitosan production and its characterization Let. Appl. Microbiol. 35, 17–-21

RABEA, EI, BADAWY, MET, STEVENS CV, SMAGGHE G, STEURBAUT W, (2003). Biomacromolecules, 4 (6), 1457

RAPPUSSI, M. C. C.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A.; CIA, P. (2009), Chitosan reduces infection by Guignardia citricarpa in postharvest "Valencia" oranges. Brazilian Archives Biology Technology, v. 52, n. 3, p. 513-521.

REIGART, J.R. AND J.R. ROBERTS, (1999). Recognition and management of pesticide poisoning. Fifth ed., Washington, D.C., U.S. EPA., pp: 34-38.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. (2003), Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 123-130.

RHOADES, J., ROLLER, S. (2000) Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. Applied and Environmental Microbiology, 1, 80-86.

RIBEIRO, M.A. MACHADO (1991), 1nfluência do uso de Agrotóxico na Qualidade da Água do Rio São Bartolomeu,Brasília-DF; Dissertação de Mestrado, Química-UnB,.

RINAUDO M (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. Prog Polym 31. 603-632.

RISSATO, S.R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS G.P.; GERENUTTI, M. (2004). Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP)". *Química Nova*, 27 (5), pp. 739-743.

RODRIGUES, A. A. C. (2003), Resistência de caupi a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum:* avaliação de germoplasmas, indução de resistência, caracterização de mecanismos bioquímicos, estruturais e análise da capacidade funcional do xilema. Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

ROMANAZZI, G.; GABLER, F. M.; SMILANICK, J. L. (2006), Preharvest chitosan and postharvest UV irradiation treatments suppress gray mold of table grapes. Plant Disease, v. 90, p. 445-450.

RYAN, K., (2004) Contaminants in Alaska. Disponível em: http://www.state.ak.us./dec/deh/ POPs.htm., 2004. Acessada em 20/02/2009.

SAGOO, S. K.; BOARD, R.; ROLLER, S. (2002) Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts. Letters in Applied Microbiology, 34, 168-172.

SALEH, M; KAMEL, A; RAGAB, A; EL-BAROTY, G & EL-SEBAE, A.K., (1996) Regional distribution of organochlorine inseticide residues in human milk from Egypt. Journal Environmental Science Health, v.B31, p.241-255.

SANTOS, J. E. G. (2003) Agrotóxicos: segurança das operações desenvolvidas por trabalhadores rurais e aplicadores na realização do controle fitossanitário das culturas de café (coffea arábicia), laranja (citrus máxima (burn) merril), abacaxi

(ananás comosus l. Merril), tomate(licopersicum esculentum mill) e cana-de-açúcar (sacharum officinarum) no centro-oeste paulista. Bauru. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Bauru, para obtenção do título de livre-docente. Universidade Estadual Paulista.

SANTOS, J. E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, EDWARD R.; FILHO, S.C.; CAVALHEIRO, E.TG. (2003) Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. Polímero: Ciência e Tecnologia, 13, 4, 242-249,.

SENENT, J. (1979) A poluição. Rio de Janeiro: Salvat,

SEZER AD, HATIPOGLU F, CEVHER E, OGURTAN Z, BAS AL & AKBUGA J (2007) Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. Pharm Sci Tech. 24, 39.

SHUKLA, V.K; RASTOGI, A.N; ADUKIA, T.K; RAIZADA, R.B; REDDY, D.C.S. & SINGH, S. (2001) Organochlorine pesticides in carcinoma of the gallbladder: a casecontrol study. European Journal of Cancer Prevention, v.10, p.153-156,.

SIEGFRIED B. D (2000).Web 2009 http://entomology.unl.edu/toxicology/ 2000

SIGNINI, R (2002) Estudo das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana. Tese (Doutorado em Físico-Química). – Instituto de Química de São Carlos- USP- São Paulo.

SILVA AC (2007) Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de Rhizopus arrhizus nos meios milhocina e sintético para mucorales. Dissertação (Mestrado) Universidade Católica de Pernambuco – Desenvolvimento de processos ambientais. 93 p.

SILVA, M.C.F; STAMFORD, T.C.M.; FRANCO, L.O.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2006) Effect of salinity and glucose on chitin and chitosan production by Cunnunghamella elegans. Asian Journal of Chitin, 2, 29-38.

SINGH, T.; VESENTINI, D.; SINGH, A. P.; DANIEL, G. (2008), Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 62, p. 116-124.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. (2007), Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas, v. 1, n. 1, p. 9-18.

SOLOMONS, T.W.G. (1989) Química orgânica 2. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos,.

SOLOMON, C.; POOLE, J.; PALMER, K.T.; PEVELER, R. & COGGON, D. (2007). Acute symptoms following work with pesticides. Occupational Medicine. 57: 505-511.

STAMFORD TCM, STAMFORD TLM, STAMFORD NP, NETO BB & CAMPOS-TAKAKI GM (2007) Growth of Cunninghamella elegans UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. Elect. J. Biotechn. 10, 15.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2007) Growth of Cunninghamella elegans UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. Electronic Journal of Biotechnology. 10, 8.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M., FRANCO, L. O. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente *in* Figueiredo, M. V. B; Burity, H. A.; Stamford, N. P.; Santos, C. E. R. S. (2008), Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 1 ed, Guaíba: Agrolivros, 568 p.

STEILING, H.; MUNZ, B.; WERNER, S.; BRAUCHLE, M. (1999) Different types of ROSscavenging enzimes are expressed during cutaneous wound repair. Exp Cell Res; 247: 484-494.

SYNOWIECKI J & AL-KHATTEB NAAQ (1997) Mycelia of M. rouxii as a source of chitin and chitosan. Food Chem. 60, 605-610.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATTEB, NAA. (2003) Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Critical Review in Food Science and Nutrition, 43, 144-171.

TAN, K.H. (1994) Environmental soil science. New York: United States of America.

THARANATHAN RN & KITTUR FS (2003) Chitin: The Undisputed Biomolecule of Great Potential. Critical Rev. Food Sci. Nutrit. 43, 61- –87.

TOPOS Sistemas Ambientais., Resíduos de praguicidas em águas. Disponível em: http://www.topos.com.br/cordella/prag.htm., 1999. Acessada em 15/08/2009.

TSAI, G. –J., HWANG, S. –P. (2004) in vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. Fisheries Science, 70, 675-681.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1999) Office of pesticide programs biennial report for fiscal year 1998 and 1999. Washington (DC);.

VARGAS, A., ZEISSER-LABOUÈBE, M., LANGE, N., GURNY, R. and DELIE, F., (2007). The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 59, no. 11, p. 1162-1176.

VEIGA, M.M.; SILVA, D.M.; VEIGA, L.B.E.; FARIA, M.V.DE C. (2006). Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade

rural do Sudeste do Brasil. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(11):2391-2399.

VELÁSQUEZ, C.L. (2003) Revista Iberoamericana de Polímeros, v. 4, p.91.

VIVEK D. S., TORRES, J.A. (2000), Biotechnol. Prog., 16, 1091

WARE G.W. (1983). Pesticides-Teory and application. W. Freeman &Company, New York

WARE, G.W. (2003). The pesticide book. Fresno, W.T. Thompsom: 418.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2001). Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva.

WIEDERMANN, P.M. (1993). Introduction risk perception and communication, Arbeiten Zur Risko Kommunikation. Volume: 38, april.

WONG, S.K. & LEE, W.O. (1997) Survey of organochlorine pesticide residues in milk in Hong Kong (1993-1995). Journal of AOAC International, v.80, p.1332-1335.

WONGPANIT P, TABATA Y & RUJIRAVANIT R. (2007) Miscibility and Biodegradability of Silk Fibroin/Carboxymethyl Chitin Blend Films. Macromol Biosci. 1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), (1990) International Programme on Chemical Safety (IPCS). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 1990-1991 [on-line]. Geneva. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/1990/ [19 Out 2010]

YADAV, A.V.; BHISE, S.B. (2004) Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. Current Science, v. 87, p.1176-1178.

YOSHIZUKA, K., LOU, Z. & INOUE, K. (2007) Reactive & Functional Polymers, v.44, p. 47.

ZHENG, L. –Y.; ZHU, J. –F. (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrates, 54, 527-530.

ZIANI,K.; FERNÁNDEZ-PAN, I.; ROYO M.; MATÉ, JI.(*2009*) Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. Food Hydrocolloids,v.23, n.8, ,p,2309-2314

ZWADLO-KLARWASSER, GÖRLITZ, K., HAFEMANN, B.,KLEE, D., KLOSTERHALFEN. (2001) The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. J. Mater.Sci.; Mater.Med, 12, 195-199.