

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SHEILA PEREIRA KRIGGER**

**SÍNTESE E ESTUDO DAS PROPRIEDADES EM MEIO AQUOSO  
DO SISTEMA QUITOSANA/VANILINA PARA POSSÍVEL  
APLICAÇÃO COMO BIOPESTICIDA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Irene Teresinha Santos Garcia  
Orientadora

Porto Alegre, julho de 2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Krigger, Sheila Pereira

Síntese e estudo das propriedades em meio aquoso do sistema quitosana/vanilina para possível aplicação como biopesticida / Sheila Pereira Krigger. -- 2023.

61 f.

Orientadora: Irene Teresinha Santos Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Biopesticida. 2. Propriedades em meio aquoso. 3. RMN . 4. Liberação controlada. I. Garcia, Irene Teresinha Santos, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por me proporcionarem a estrutura para prosseguir em mais uma etapa da minha formação. Ao meu irmão por arrumar meu notebook. Agradeço também a todos que me receberam suas casas em Porto Alegre pra facilitar minha jornada até a universidade.

Agradeço à minha orientadora pela disponibilidade de me orientar em um projeto com tema novo pra mim. Com certeza aprendemos muito nesse período. Obrigada pelas orientações e também pelas conversas sobre a vida. Foi muito importante ter uma orientadora que entendia meus limites causados pelo Transtorno de Ansiedade Generalizada. Um grande obrigado pra Yasmin, que me ajudou muito, tanto em análises quanto com conversas descontraídas no dia a dia do laboratório. Obrigada também por todos doces e bolos que tu me deste.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio e pela ajuda nesses anos. Também agradeço a compreensão, sei que não estive muito presente nesse período de pesquisa e estudos. Dani, tu foste fundamental no início desse processo e principalmente durante o primeiro ano de pandemia. Só a gente sabe o que passamos com questionamentos de qual o melhor caminho a seguir. Agradeço especialmente à Natália, amiga que fiz durante a graduação, mas que ficou pra vida, e que mesmo seguindo um caminho diferente de mim ainda me deu muito suporte nessa nova etapa acadêmica. Um grande obrigado aos meus afetos, Bianca, Juliana e Bruna, por tornarem esse período mais leve. Mesmo vocês não entendendo nada da minha área foi bom poder desabafar com vocês. E um grande obrigado pra minha psicóloga que foi fundamental em todo o decorrer desse trabalho.

Por fim, agradeço ao grupo BTS pelas letras sensíveis e que me fizeram sentir tão acolhida nesse período tão difícil que foi a pandemia, juntamente com o mestrado. Se não tivesse essa distração, essa leveza, e as pessoas que conheci através do fandom, teria sido um período muito triste e solitário. Muito obrigada!

## Resumo

Vanilina e quitosana são substâncias obtidas a partir de fontes naturais e que apresentam grande potencial no desenvolvimento de biopesticidas. Ambas as substâncias tem efeitos sobre bactérias e formam uma imina através da reação de Schiff. Nosso trabalho visou à formação dessa espécie a fim de que sua liberação pudesse ser controlada pelo pH do meio. Nesse trabalho foi desenvolvida a síntese verde de dois biopesticidas a base de quitosana funcionalizada com vanilina, com duas razões molares entre os grupos reagentes de cada substância: amina, da quitosana, e aldeído, da vanilina. A amostra com razão 1:1 foi chamada de QV1 e com a razão 1:2 chamada de QV2. Os grupos funcionais das amostras sintetizadas foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido. Pela análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido, picos característicos da quitosana e da vanilina foram identificados em ambas amostras, mas sem a presença do pico relativo ao aldeído em 190 ppm, indicando que esse grupo reagiu com a amina formando uma imina, identificada por um novo pico em 166 ppm. A QV1 teve uma conversão dos grupos amina em imina de 18%, determinada através de RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido, enquanto o biopesticida sintetizado com a razão 1:2, com excesso de vanilina, teve uma conversão de 46%. Em solução ácida, a vanilina foi liberada de forma mais lenta na presença do surfactante catiônico CTAB. O surfactante formou agregados, identificados por espalhamento de luz dinâmico (DLS), que dificultam a difusão da vanilina no meio, promovendo uma liberação controlada do ingrediente ativo.

Palavras-chave: liberação controlada, bactericida, sensível ao pH,  $^{13}\text{C}$  RMN, quitosana funcionalizada

## Abstract

Vanillin and chitosan are substances obtained from natural sources and have great potential in the development of biopesticides. Both substances have effects on bacteria and form an imine through the Schiff reaction. Our work aimed at the formation of this species so that its release could be controlled by the pH of the medium. In this work, the green synthesis of two biopesticides based on chitosan functionalized with vanillin was developed, with two molar ratios between the reagent groups of each substance: amine, from chitosan, and aldehyde, from vanillin. The sample with a 1:1 ratio was called QV1 and with a 1:2 ratio called QV2. The functional groups of the synthesized samples were characterized by infrared spectroscopy (FT-IR) and solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR). By  $^{13}\text{C}$  NMR analysis in solid state, characteristic peaks of chitosan and vanillin were identified in both samples, but without the presence of the peak related to aldehyde at 190 ppm, indicating that this group reacted with the amine forming an imine, identified by a new peak at 166 ppm. QV1 had a conversion of amine to imine groups of 18%, determined by  $^{13}\text{C}$  NMR in solid state, while the biopesticide synthesized with a 1:2 ratio, with excess vanillin, had a conversion of 46%. In acid solution, vanillin was released more slowly in the presence of the cationic surfactant CTAB. The surfactant formed aggregates, identified by dynamic light scattering (DLS), which hinder the diffusion of vanillin in the medium, promoting a controlled release of the active ingredient.

Keywords: controlled release, bactericidal, pH sensitive,  $^{13}\text{C}$  NMR, functionalized chitosan

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estruturas químicas da (a)  $\beta$ -cipermetrina, (b) nonilfenol (c) metil laurato, (d) alquil poliglicosídeo e (e) polioxietileno 3-lauril éter.

**Figura 2.** Estrutura química da vanilina.

**Figura 3.** Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).

**Figura 4.** Hidrólise básica da quitina, formando a quitosana.

**Figura 5.** Reação química entre vanilina e quitosana: formação da base de Schiff.

**Figura 6.** Estrutura do surfactante cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAB).

**Figura 7.** Estrutura do mero acetilado (a) e desacetilado (b) da quitosana. Os números representam os carbonos das moléculas.

**Figura 8.** RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ . Os números indicam os carbonos a que esses hidrogênios estão ligados. (A) corresponde ao mero acetilado e (D) ao mero desacetilado.

**Figura 9.** Regressão linear da viscosidade/concentração das soluções de quitosana versus a concentração das soluções de quitosana a  $30^\circ\text{C}$ .

**Figura 10.** CP-MAS RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido das amostras QV1 e QV2. Os números indicam os carbonos a que esses hidrogênios estão ligados. (A) corresponde ao mero acetilado e (D) ao mero desacetilado e (V) à vanilina.

**Figura 11.** Espectros de infravermelho em estado sólido da: quitosana (a), vanilina (b), QV1 (c) e QV2 (d).

**Figura 12.** RMN de  $^1\text{H}$  das amostras (a) QV1 e (b) QV2 em solução de  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ . Em vermelho são indicados os sinais provenientes da molécula de vanilina.

**Figura 13.** Espectro de infravermelho em estado sólido da quitosana (a), vanilina (b), QV2(c).

**Figura 14.** Espectros de CP-MAS RMN de  $^{13}\text{C}$  da quitosana e da vanilina.

**Figura 15.** Liberação cumulativa da vanilina presente na amostra QV2, na presença ou não de CTAB, em solução de ácido acético 0,6% (v/v).

**Figura 16.** Distribuição de tamanho das diferentes soluções em DLS a  $25^\circ\text{C}$  em pH 2,4.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Componentes principais presentes nas favas curadas de baunilha *Vanilla planifolia* e *Vanilla tahitensis*.

**Tabela 2.** Dados obtidos através do RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ .

**Tabela 3.** Densidade, tempo de escoamento e viscosidade médios para a quitosana a  $30^\circ\text{C}$ .

**Tabela 4.** Resultados de massa molar da quitosana, obtidos através de cromatografia de permeação em gel, em pH 6, com fase móvel aquosa de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , taxa de vazão de  $0,500 \text{ mL.min}^{-1}$  e colunas em série (SB807,806,803,802HQ).

**Tabela 5.** Área dos picos de  $^1\text{H}$  no RMN a  $70^\circ\text{C}$  das amostras QV1 e QV2 dissolvidas em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ .

**Tabela 6.** Área dos picos de  $^{13}\text{C}$  no RMN em estado sólido das amostras QV1 e QV2.

**Tabela 7.** Massa dos reagentes, massa dos produtos e rendimento para as amostras QV1 e QV2.

**Tabela 8.** Testes de solubilidade para a amostra QV1 com diferentes surfactantes em água a  $24^\circ\text{C}$ .

**Tabela 9.** Testes de solubilidade para a amostra QV2 a  $50^\circ\text{C}$  em pH 2,4 e na presença ou não de CTAB.

**Tabela 10.** Valor de potencial zeta para as soluções de QV2, de CTAB e a da mistura dos dois componentes, em ácido acético 6% (v/v).

**Tabela 11.** Viscosidade das soluções, medida com viscosímetro de Ostwald, e diâmetro hidrodinâmico das espécies em solução, medido através de DLS, a  $25^\circ\text{C}$ .

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

IA: ingrediente ativo

OE: óleo essencial

DL: dose letal

GD: grau de desacetilação

GA: grau de acetilação

$M_w$ : massa molar ponderal

TGA: análise termogravimétrica

FDA: Food and Drug Association

DPL: destilado do licor pirolenhoso

CTAB: brometo de cetil trimetilamônio

CMC: concentração micelar crítica

RMN: ressonância magnética nuclear

$M_v$ : massa molar viscosimétrica

QV1: quitosana/vanilina sintetizada na proporção 1:1 de amina:aldeído

QV2: quitosana/vanilina sintetizada na proporção 1:2 de amina:aldeído

FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

SDS: dodecil sulfato de sódio

DLS: espalhamento de luz dinâmico

$k_B$ : constante de Boltzmann

$R_h$ : raio hidrodinâmico

## SUMÁRIO

1	Introdução	11
2	Objetivo	12
3	Revisão da literatura	12
3.1	Nanotecnologia na agricultura	12
3.1.1	<i>Ingredientes ativos</i>	12
3.1.2	<i>Carreadores</i>	14
3.2	Vanilina e quitosana como biopesticidas	15
3.2.1	<i>Vanilina</i>	15
3.2.2	<i>Quitosana</i>	17
3.2.3	<i>Interações entre vanilina e quitosana</i>	21
3.3	Surfactante brometo de cetil trimetilamônio (CTAB)	22
4	Parte experimental	24
4.1	Materiais	24
4.2	Grau de desacetilação da quitosana	24
4.3	Cálculo da massa molar viscosimétrica e massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC) da quitosana	24
4.4	Cálculo da quantidade grupos amina	25
4.5	Reação entre vanilina e quitosana	26
4.6	Análise estrutural em estado sólido	26
4.7	Análise estrutural em solução	27
4.8	Ensaio de liberação da Vanilina	27
4.9	Solubilidade e interação com o surfactante	28
4.10	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	28
4.11	Potencial Zeta das soluções de quitosana-vanilina com e sem surfactante	29
5	Resultados e discussão	29
5.1	Grau de desacetilação da quitosana	29
5.2	Massa molar viscosimétrica e massa molar por GPC da quitosana	31
5.3	Cálculo da quantidade de grupos amina disponíveis	34
5.4	Análise estrutural em estado sólido	34
5.4.1	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>13</sup>C em estado sólido</i>	34

<i>5.4.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) em estado sólido</i>	35
5.5 Determinação do grau de conversão	39
5.6 Rendimento da reação entre vanilina e quitosana	43
5.7 Efeito do surfactante na solubilidade da quitosana-vanilina	45
5.8 Liberação da vanilina	48
6 Conclusões e próximos passos	51
Referências	53
Anexos	62

## 1 Introdução

A agricultura tem o desafio de alimentar a crescente população mundial, que atualmente conta com cerca de 8 bilhões de pessoas<sup>1</sup>. Para isso, são necessários defensivos agrícolas que auxiliam no controle de pragas e doenças, bem como fertilizantes para garantir o crescimento saudável das plantas, uma vez que a agricultura orgânica ainda não consegue atender toda essa elevada demanda por alimentos<sup>2</sup>. O mercado de produtos orgânicos vem crescendo, e mostra que o consumidor está mais atento ao modo como sua comida é cultivada e ao impacto que este método de cultivo tem no meio ambiente e em sua própria saúde<sup>3</sup>.

Os agroquímicos utilizados no controle de pragas são amplamente conhecidos por causarem danos ao meio ambiente e aos seres humanos, devido à sua toxicidade, e por criarem organismos resistentes<sup>4</sup>. Além disso, 90% dos pesticidas utilizados são perdidos durante sua aplicação nas plantas, devido à degradação, fotólise, lixiviação e escoamento, fazendo com que apenas 0,1% do pesticida aplicado entre em contato com o organismo alvo<sup>5</sup>.

Para resolver esses problemas, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para produzir defensivos agrícolas (como pesticidas e herbicidas), bem como fertilizantes, que causem menos impacto à saúde dos seres humanos e à natureza. Uma área com crescente interesse é a dos biopesticidas<sup>6</sup>, podendo estes serem derivados de plantas, micróbios ou insetos<sup>2</sup>. Suas vantagens são menor toxicidade aos seres humanos e menor influência na biodiversidade do local de plantio. Além disso, pesquisas sobre a utilização de nanotecnologia na agricultura estão ganhando o interesse do meio científico<sup>7,8</sup>. A nanotecnologia pode atuar em diversas áreas, como por exemplo na proteção da planta (nanopesticidas), crescimento da planta (nanofertilizantes), enriquecimento do solo (nanomateriais), entre outros<sup>9</sup>.

Dentre os materiais promissores para a síntese de biopesticidas temos a vanilina e a quitosana. Ambos provêm de fontes naturais, sendo a vanilina extraída da fava de baunilha, e a quitosana, principalmente, da casca de crustáceos. A vanilina apresenta o grupo aldeído em sua estrutura, grupo esse que pode reagir com os grupos amina da quitosana formando uma base de Schiff, através de uma reação em equilíbrio de formação de imina, que é sensível ao pH. As duas moléculas podem atuar como agentes

bactericidas separadamente, mas juntas apresentam um potencial ainda mais elevado de ação nos organismos alvo, uma vez que a vanilina é muito volátil e estando ligada à quitosana teria sua liberação de forma mais controlada.

A quitosana funcionalizada com vanilina já foi utilizada em medicamentos<sup>10</sup>, tecidos<sup>11</sup>, em alimentos<sup>12,13</sup> (principalmente), mas ainda não foi estudada como biopesticida em plantas, e são poucos os dados caracterizando uma solução aquosa desse composto. Os métodos de síntese reportados até então envolvem solventes orgânicos, emulsões em parafina, uso de agentes redutores (acarretando na perda da ligação sensível ao pH) e altas temperaturas. Métodos mais simples, com o uso apenas de água acidificada e etanol foram reportados apenas para quitosanas de baixo peso molecular.

## **2 Objetivo**

Nesse trabalho buscamos uma síntese sem o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, emulsificantes com potencial tóxico e altas temperaturas. A revisão da literatura mostrou que a caracterização da espécie formada, bem como a quantificação da extensão da conversão dos grupos amina da quitosana em grupos imina, ou não são reportadas ou são feitas de forma divergente entre os autores<sup>10,12,14</sup>. Uma análise criteriosa e completa desses fatores foi proposta neste trabalho, bem como um estudo da liberação da vanilina em meio aquoso acidificado. Também foi investigada a ação de um surfactante para auxiliar na sua liberação controlada.

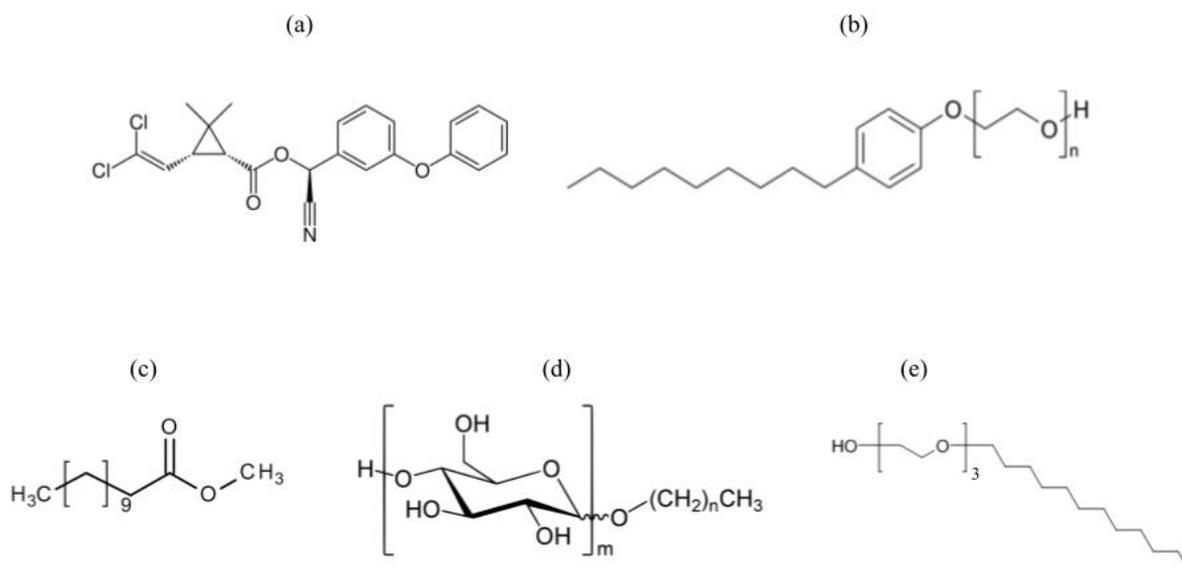
## **3 Revisão da literatura**

### **3.1 Nanotecnologia na agricultura**

#### *3.1.1 Ingredientes ativos*

A maioria dos pesticidas são extremamente tóxicos e a redução da quantidade aplicada nas plantas torna-se fundamental. Como exemplo, temos a  $\beta$ -cipermetrina, pesticida do grupo dos piretróides, com estrutura química representada na Figura 1 (a), que é altamente tóxico e, apesar de credenciado para uso em diversas culturas (algodão, café, feijão, milho, soja, entre outras), deixa resíduos nos alimentos. Nesse sentido, nanoemulsões podem auxiliar na redução da quantidade empregada desses pesticidas<sup>15,16</sup>. Além disso, com as nanoemulsões é possível que pesticidas hidrofóbicos sejam emulsionados em água com o auxílio de uma fase óleo e um (ou mais)

surfactante, uma vez que a parte hidrofóbica deste último interage com a fase óleo que contém o pesticida e a parte hidrofílica interage com a água. Assim, é solucionado o problema de baixa solubilidade em água de diversos ingredientes ativos (IAs), e por consequência diminui o uso de solventes orgânicos na formulação desses IAs. Mas, formulações comerciais de pesticidas utilizam fase óleo e emulsificantes que também apresentam toxicidade, como tolueno e alquilfenol etoxilatos (por exemplo, nonilfenol etoxilado, apresentado na Figura 1 (b)), respectivamente.



**Figura 1.** Estruturas químicas da (a)  $\beta$ -cipermetrina, (b) nonilfenol (c) metil laurato, (d) alquil poliglicosídeo e (e) polioxietileno 3-lauril éter.

Para resolver esses dois problemas, Du e colaboradores otimizaram e caracterizaram a emulsão óleo-em-água de metil laurato (fase óleo, Figura 1 (c)), utilizando a mistura de dois surfactantes, o alquil poliglicosídeo e o polioxietileno 3-lauril éter<sup>17</sup>(Figura 1 (d) e (e)). Foram otimizados os parâmetros de proporção entre os dois surfactantes e fração em massa da fase óleo, através de medidas do ângulo de contato dinâmico. Após escolhidas as melhores condições, a  $\beta$ -cipermetrina, que é quase insolúvel em água, foi incorporada aos sistemas para demonstrar o potencial de aplicação da emulsão como carreadora de pesticidas. A adição do pesticida não alterou significativamente o tamanho e a estabilidade das nanoemulsões. As nanoemulsões também foram diluídas e, mesmo após a diluição, os sistemas se mantiveram monofásicos, apesar de mostrar um aumento no tamanho das gotas. Em comparação

com as nanoemulsões comerciais de  $\beta$ -cipermetrina, as nanoemulsões estudadas obtidas pelos autores mostraram excelente capacidade de molhabilidade e espalhamento em superfície hidrofóbica, mesmo quando diluídas.

Mesmo com esses esforços, ainda se faz necessário o desenvolvimento de formulações de IAs que tenham baixa toxicidade e sejam biodegradáveis. Moléculas conhecidas como biopesticidas, obtidas de fontes naturais como animais, plantas, microrganismos e insetos<sup>18</sup>. Em 2014, os biopesticidas representavam entre 3,6 e 5,4% do mercado de defensivos agrícolas, aproximadamente<sup>19</sup>. Esse baixo percentual se deve aos altos custos de pesquisa, desenvolvimento e comercialização de novas formulações de pesticidas<sup>20</sup>. Entretanto, o meio acadêmico vem pesquisando novas alternativas para controle de pragas e doenças nas plantações.

Os óleos essenciais (OEs) extraídos de plantas tem se mostrado promissores como fontes de IAs. Dunan e colaboradores avaliaram a toxicidade de óleos essenciais no controle de afídeos<sup>21</sup>. Os afídeos (ou pulgões) são uma das maiores ameaças às plantações, e seu controle é feito com inseticidas nocivos para os humanos e para o meio ambiente. Os autores avaliaram a entomotoxicidade (capacidade de matar ou incapacitar insetos) da fumigação dos OEs puros de funcho e de anis verde frente ao pulgão *Macrosiphum euphorbiae* em três escalas: na folha de tomate, na planta inteira e em estufa. A  $DL_{50}$  (dose para matar 50% da população de pulgões) foi de 6,6  $\mu\text{L.L}_{\text{ar}}^{-1}$  para o OE de anis verde e 12,2  $\mu\text{L.L}_{\text{ar}}^{-1}$  para o OE de funcho, ambos aplicados na folha de tomate em laboratório. O OE de funcho, porém, induziu fitotoxicidade na folha. Na escala maior, em estufa, a eficiência dos OEs se confirmou e o OE de funcho se mostrou mais eficiente do que em laboratório, se igualando ao OE de anis verde. Mas, ao longo do tempo, ambos os óleos essenciais apresentaram fitotoxicidade para o tomate, mostrando que os efeitos nocivos que os biopesticidas podem apresentar ainda precisam ser contornados com mais estudos.

### 3.1.2 Carreadores

Carreadores de pesticidas têm três principais objetivos, sendo (i) proteger os IAs até sua liberação no alvo desejado, (ii) aumentar a solubilidade e penetração dos IAs nos tecidos alvo da planta, e (iii) modificar ou controlar a liberação dos IAs<sup>2</sup>. Além dessas características, os carreadores também diminuem a toxicidade do IA encapsulado<sup>22</sup>, podendo reduzir ou eliminar os danos que alguns biopesticidas causam em organismos não-alvo<sup>23</sup>.

Apesar dos avanços na pesquisa de formulações de pesticidas com carreadores, ainda são poucos os trabalhos que estudam os riscos que alguns desses carreadores podem apresentar ao meio ambiente e até mesmo à plantaçao após sua açao nos organismos de interesse. Um dos carreadores de pesticidas que teve seu efeito no solo avaliado foi o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Mesmo com a vantagem de apresentar elevado potencial de fotodegradação do pesticida<sup>24</sup>, Simonin e colaboradores verificaram que o TiO<sub>2</sub> causa um impacto negativo na atividade de microrganismos benéficos ao solo<sup>25</sup>. No caso de formulações líquidas há também a desvantagem do uso de solventes orgânicos, que podem causar danos à saúde dos trabalhadores e também ao meio ambiente. Como alternativa, vem crescendo o número de trabalhos que visam o uso de carreadores biocompatíveis e biodegradáveis, como a quitosana<sup>22,26</sup>, derivados de amido<sup>27</sup> e de celulose<sup>28</sup>, gelatina e albumina<sup>29</sup>.

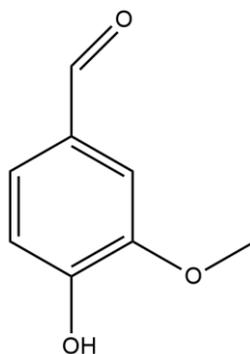
Pascoli e colaboradores desenvolveram um biopesticida onde os IAs estão presentes no óleo extraído das folhas de nim (*Azadirachta indica*), uma árvore comum no sul da Ásia<sup>23</sup>. Dentre esses IAs está a azadiractina, já utilizada em formulações comerciais de biopesticidas. Apesar de ser um biopesticida, a azadiractina pode causar danos para organismos não-alvo e para a microbiota do solo. Para reduzir esses efeitos indesejados, o óleo de nim foi encapsulado em nanopartículas de zeína, uma proteína extraída dos grãos de milho. Com a zeína como carreadora, o biopesticida se mostrou menos genotóxico ao organismo não-alvo estudado, a cebola (*Allium cepa*), do que o óleo puro. Nos ensaios com *Caenorhabditis elegans* (um nematoide), as nanopartículas não tiveram efeito tóxico, enquanto o óleo de nim puro interferiu no bombeamento faríngeo e na expressão da proteína GST-4. Além disso, as nanopartículas carregadas de óleo de nim não interferiram na microbiota do solo que está envolvida no ciclo do nitrogênio. Esse estudo mostra que o uso de biopesticidas combinado com carreadores traz ainda mais benefícios para a agricultura sustentável.

## **3.2 Vanilina e quitosana como biopesticidas**

### *3.2.1 Vanilina*

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um aldeído fenólico presente naturalmente na semente da baunilha. Na Figura 2 é apresentada sua estrutura química, onde podemos identificar as funções orgânicas aldeído, fenol e éter. A baunilha é uma orquídea tropical, originária do México, com mais de 110 espécies identificadas, mas

apenas 3 apresentam interesse comercial: *Vanilla planifolia* Andrews; *Vanilla pompona* Schiede; e *Vanilla tahitensis* JW Moore. Apesar de ser uma planta nativa do México, hoje em dia a baunilha é cultivada em diferentes países como Madagascar, Indonésia, Taiti, entre outras regiões tropicais, uma vez que necessita de temperaturas entre 24 e 30 °C para seu desenvolvimento<sup>30</sup>.



**Figura 2.** Estrutura química da vanilina.

A vanilina pode ser extraída das sementes da fava de baunilha preta moída, que contém entre 2 e 3% (m/m) da molécula, através, por exemplo, da extração de soxhlet (utilizando diferentes solventes)<sup>31</sup>, obtendo-se um sólido branco. Na Tabela 1 são apresentados os componentes presentes nas favas curadas das flores de baunilha *Vanilla planifolia* e *Vanilla tahitensis*<sup>30</sup>. Além da extração, a maior parte da vanilina é obtida através de síntese orgânica, biotransformação e degradação de licores de sulfitos (gerados, por exemplo, no processo de extração da celulose de madeira)<sup>31</sup>. Biotransformação é o nome dado ao processo em que a vanilina é obtida como um metabólito intermediário da degradação de certos materiais naturais (eugenol, lignina, entre outros)<sup>32-34</sup>.

**Tabela 1.** Componentes principais presentes nas favas curadas de baunilha *Vanilla planifolia* e *Vanilla tahitensis*<sup>30</sup>.

Componente	g.Kg <sup>-1</sup> (em base seca)
Vanilina	20
Ácido vanílico	1
<i>p</i> -Hidroxibenzaldeído	2
<i>p</i> -Hidroxibenzil metil éter	0,2
Açúcares	250
Gordura	150
Celulose	150-300

Minerais	60
Água	350

---

A vanilina é amplamente utilizada na indústria alimentícia para adicionar aroma e sabor a alimentos e bebidas, em perfumes e cosméticos, e também na indústria farmacêutica. Mas o uso em alimentos depende do método de extração, uma vez que nem todos utilizam reagentes que são seguros para o consumo humano<sup>31,33</sup>.

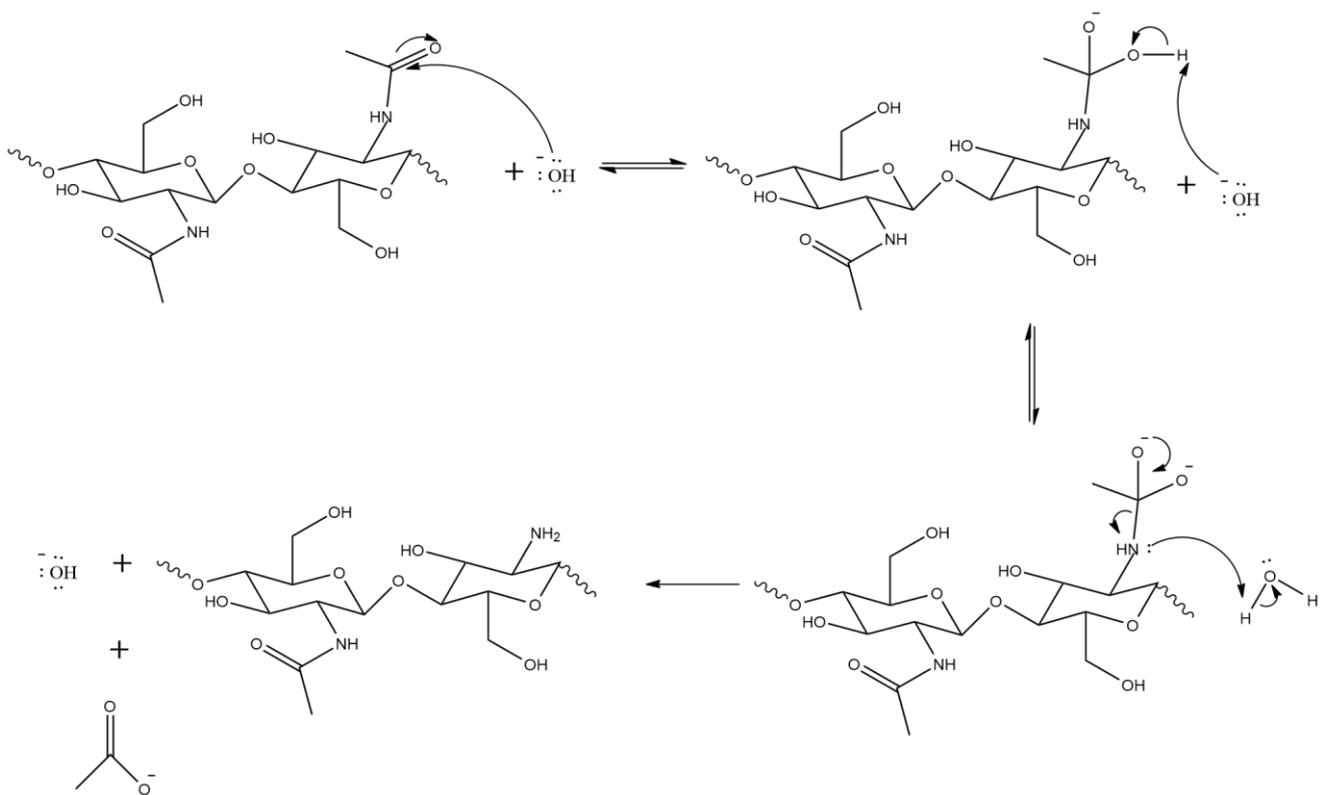
Além desses usos mais populares devido às suas propriedades sensoriais, a vanilina também apresenta propriedades antioxidantes<sup>35,36</sup>, antimutagênicas<sup>37,38</sup> e antimicrobianas<sup>39-43</sup>. Essa última, juntamente com as propriedades organolépticas, faz com que a vanilina seja muito utilizada para prevenir a ação degradante ocasionada por bactérias, fungos e mofo em alimentos, sejam eles processados<sup>44-46</sup> ou minimamente processados (como frutas vendidas já cortadas<sup>40</sup>).

O uso da vanilina como biopesticida na agricultura ainda é pouco reportado no meio científico. Existem alguns trabalhos que avaliam sua ação antifúngica em plantações de uva, mais especificamente nos “ferimentos” decorrentes da poda das videiras. Ao longo de dois anos, Cobos e colaboradores<sup>43</sup>, observaram a diminuição da taxa de mortalidade das plantas tratadas com fungicidas naturais, dentre eles a vanilina, em comparação com as plantas não tratadas. Ainda no setor produtor de uva, García-Ríos e colaboradores, avaliaram o uso de vanilina e óleos essenciais imobilizados em diferentes suportes (sílica, partículas de celulose e membrana de celulose) na prevenção do crescimento de microrganismos deteriorantes no vinho engarrafado<sup>47</sup>. Nesse estudo, foi comprovado que a ligação da molécula com ação antimicrobiana a um suporte aumenta sua eficácia contra os microrganismos indesejados. A imobilização da vanilina evita problemas como a volatilidade e insolubilidade em água, tendo em vista que a vanilina é utilizada geralmente em solução, com etanol ou acetona como solventes.

### 3.2.2 *Quitosana*

A quitosana é a forma desacetilada da quitina. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante do planeta, atrás apenas da celulose. É extraída de resíduos de crustáceos, como o exoesqueleto de caranguejos e camarões, fungos, e também de insetos. Isso torna a quitina e, conseqüentemente, a quitosana polímeros de grande interesse comercial pelo seu baixo custo. Suas estruturas químicas são apresentadas na Figura 3.





**Figura 4.** Hidrólise básica da quitina, formando a quitosana.

Kaya e colaboradores observaram diferenças entre a quitina extraída de larvas e de besouros adultos (*Leptinotarsa decemlineata*). As análises termogravimétricas (TGA) mostraram que a quitina extraída dos besouros adultos é mais estável do que a extraída das larvas. As quitosanas obtidas dessas quitinas apresentaram baixo peso molecular, cerca de 2,7 kDa, para ambas as fontes. Entretanto, os besouros adultos se mostraram uma melhor fonte para obtenção de quitina e quitosana, já que o conteúdo de quitina nesses besouros é maior do que nas larvas, assim como a atividade antioxidante e antimicrobiana da quitosana obtida a partir deles<sup>51</sup>.

A quitosana vem sendo muito utilizada como carreadora ou suporte de diversas substâncias, para os mais variados fins. Sua biocompatibilidade faz com que seja um material muito interessante para engenharia de tecidos<sup>52,53</sup>, podendo ser utilizada para fins biomédicos, como a promoção da regeneração óssea<sup>54</sup>. Sua baixa resistência mecânica faz com que seja necessário realizar modificações químicas de seus grupos funcionais com outras moléculas para um melhor desempenho<sup>11</sup>. A quitosana também é utilizada como carreadora de fármacos no tratamento de diversas doenças, inclusive câncer<sup>49,55-57</sup>. Uma quitosana modificada hidrofobicamente, a glicolquitosana, tem sido utilizada para aumentar a eficiência de encapsulação de drogas insolúveis em água. A

capacidade da quitosana modificada de formar agregados em solução aquosa, com as drogas hidrofóbicas em seu interior, faz seu uso ser muito promissor para encapsulação de substâncias como a doxorubicina<sup>56</sup>.

Além de seus usos na medicina, a quitosana também é de grande interesse na agricultura<sup>58</sup>. A *Food and Drug Association* (FDA), nos Estados Unidos, considera a quitosana biodegradável, não-tóxica e biocompatível. Essas características, além das propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes faz com que a quitosana seja uma ótima opção de biopesticida, que não prejudica o meio ambiente nem os trabalhadores que o manipulam.

A quitosana pode ser utilizada como ingrediente ativo ou como carreadora de outros agroquímicos. Pesquisadores do nosso grupo de pesquisa desenvolveram uma formulação para aplicação em plantas e frutos, patente BR 102012033149-7, em que a quitosana forma um sistema coloidal com o destilado do licor pirolenhoso (DPL), e esse sistema age como fertilizante (quando adicionados minerais à solução) e fitoprotetor. O licor pirolenhoso é uma solução ácida produzida pela condensação da fumaça originada da queima de material vegetal e por si só também apresenta propriedades pesticidas. O sistema coloidal formado com a quitosana tem capacidade de formar filmes que protegem as plantas da radiação UV-B e UV-C, apresentam resistência a água, são termicamente estáveis, apresentam ótima permeabilidade ao vapor de água<sup>59</sup>.

Kumar e colaboradores sintetizaram nanopartículas de quitosana para liberação controlada de hexaconazol<sup>60</sup>. Foi possível ter uma eficiência de encapsulação de 73% do IA, e mostrou uma liberação mais controlada do que a formulação comercial em solo alcalino. Enquanto as nanopartículas de quitosana mantiveram uma liberação controlada do IA por 14 dias, a formulação comercial manteve a liberação por apenas 5 dias. Além disso, a citotoxicidade da nanoformulação em organismos não-alvo foi menor do que a formulação comercial convencional.

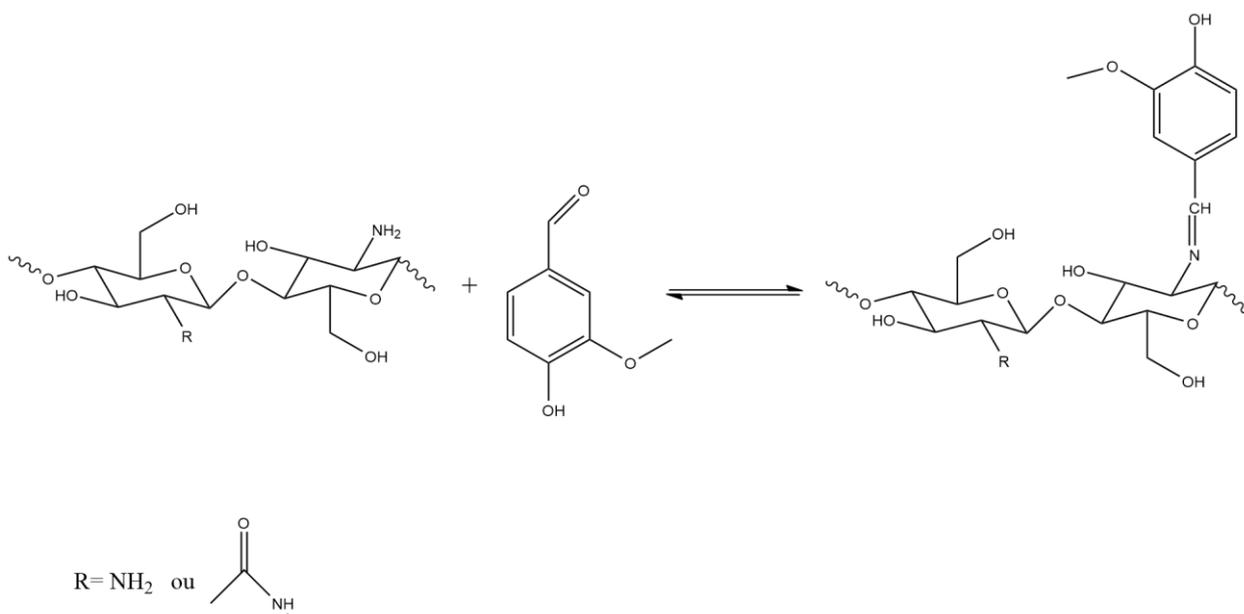
Outro estudo mostrou a eficiência de uma formulação de quitosana com ácido poli- $\gamma$ -glutâmico na encapsulação de avermectina<sup>61</sup>. A liberação controlada foi governada pelo pH e foi mais rápida em pH alcalino. A formulação causou uma mortalidade 29% maior dos nemátodes comparada com o controle (avermectina livre), mostrando a vantagem de encapsular e liberar aos poucos o IA.

Pesquisadores também desenvolveram um biomaterial de alginato/quitosana sensível ao pH, capaz de encapsular ivermectina, liberando esse medicamento após ser ingerido oralmente por peixes<sup>62</sup>. As partículas com ivermectina apresentam carga

superficial negativa no pH da água do aquário (pH ~6,5), e essa carga negativa causa repulsão das membranas bucofaríngeas, que também têm carga negativa, o que reduz perdas ao longo da administração oral. Quando as partículas de alginato/quitosana chegam no estômago dos peixes, que tem pH em torno de 2,5, ocorre uma reversão da carga superficial dessas partículas. Essa carga superficial positiva permite que o biomaterial carregado de ivermectina seja atraído pelas mucosas com carga negativa, resultando na presença prolongada das partículas no estômago. Durante a digestão do alimento, o pH aumenta para cerca de 4,5. Esse fato, combinado com a degradação natural pelo processo de digestão, faz com que o medicamento seja liberado no intestino dos peixes, agindo nos endoparasitas presentes. A ingestão diária das partículas por parte de peixes da espécie *Corydoras schwartzi* durante 15 dias resultou em uma diminuição significativa das infecções por nemátodes, indicando que as partículas de alginato/quitosana são um carreador promissor para liberação controlada de medicamentos.

### 3.2.3 Interações entre vanilina e quitosana

A interação entre vanilina e quitosana é conhecida pois o grupo aldeído da vanilina reage com o grupo amina da quitosana formando uma base de Schiff<sup>13,63–65</sup>, representada na Figura 5. Outra forma de interação ocorre entre o hidrogênio do grupo hidroxila da vanilina, já ligada à quitosana, pode formar ligações de hidrogênio com o grupo hidroxila da molécula de quitosana<sup>66</sup>.



**Figura 5.** Reação química entre vanilina e quitosana: formação da base de Schiff.

Essas ligações tornam o sistema quitosana-vanilina muito atrativo para liberação de vanilina em diversas aplicações, uma vez que a reação é reversível<sup>14</sup> e, dependendo das condições do meio, a ligação entre as duas moléculas pode ser quebrada. Já foram desenvolvidos com esse sistema quitosana-vanilina: a) filmes, para atuarem como embalagem de alimentos<sup>13,14,65,67,68</sup>; b) microesferas, para atuarem como carreadoras de drogas<sup>69-71</sup>; c) microcápsulas, que foram ligadas à tecido de algodão<sup>64,72</sup>; d) nanocápsulas, também para atuarem como carreadoras de drogas<sup>49</sup>; e) e nanomicelas, para liberação de drogas no interior de células cancerígenas pela mudança de pH do meio<sup>10</sup>.

Os filmes e microcápsulas geralmente são preparados misturando soluções de quitosana em ácido acético ou ácido cítrico e de vanilina em etanol ou acetona, seguida da secagem em pratos<sup>13,66</sup> ou *spray dryer*<sup>64</sup>. As microesferas<sup>69,71</sup> e nanopartículas<sup>49</sup> são preparadas pelo método de emulsão, onde a quitosana dissolvida em solução de ácido acético é a fase aquosa, e parafina líquida contendo surfactantes (span 80 e tween 80) é a fase orgânica. Neste caso, a solução de vanilina em solvente orgânico é gotejada no sistema que está sob agitação, formando as microesferas ou nanopartículas, que são posteriormente lavadas e secas.

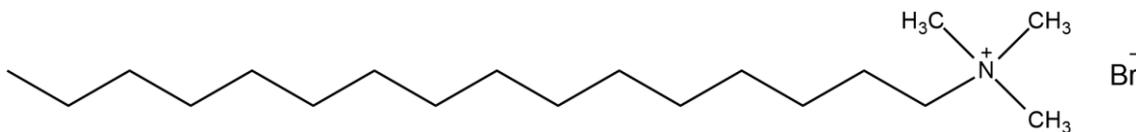
Nos sistemas estudados, a vanilina manteve suas propriedades de agente antibacteriano e antifúngico<sup>43</sup>, mostrando o potencial do sistema quitosana-vanilina em ser empregado para esses fins em diferentes aplicações.

### **3.3 Surfactante brometo de cetil trimetilamônio (CTAB)**

Surfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, possuem um grupo polar (hidrofílico) ligado a uma cadeia hidrocarbônica (hidrofóbica). Quando diluídos em água, tendem a formar agregados, chamados de micelas, quando estão acima de certa temperatura e concentração (concentração micelar crítica, CMC).

São classificados de acordo com a carga que apresentam quando dissociados em água em pH neutro. Os surfactantes não iônicos não formam íons em solução, os aniônicos adquirem carga negativa, os catiônicos adquirem carga positiva e os anfóteros (zwitteriônicos) apresentam tanto carga positiva quanto negativa.

O surfactante brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) é do tipo catiônico, onde a cadeia de 16 carbonos é a parte hidrofóbica e a parte hidrofílica é o grupo trimetilamônio, que possui carga positiva, conforme estrutura apresentada na Figura 6.



**Figura 6.** Estrutura do surfactante cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAB).

Nossa hipótese foi de que este surfactante poderia auxiliar na liberação controlada da vanilina quando as partículas de quitosana/vanilina são adicionadas em solução ácida para posterior aspersão em plantas.

## 4 Parte experimental

### 4.1 Materiais

A água utilizada nesse trabalho foi deionizada, o etanol 95% de grau analítico foi adquirido da empresa Química Moderna e o ácido acético glacial P.A. utilizado foi da marca Merk. Quitosana com grau de desacetilação de 79,6%, extraída de camarões da espécie *Pandalus borealis*, da marca ChitoClear 43000 Primex foi utilizada. Vanilina com 99% de pureza e água deuterada da marca Sigma-Aldrich, CTAB da marca Êxodo Científica e acetato de sódio anidro da marca Lab Synth foram utilizados.

### 4.2 Grau de desacetilação da quitosana

Para determinar o grau de desacetilação, 20 mg de quitosana foram solubilizados em 2 mL de D<sub>2</sub>O acidificado com uma gota de HCl, e 0,7 mL dessa solução foi inserida em um tubo de vidro com 5mm de diâmetro para posterior análise de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H. O equipamento utilizado foi um Bruker Ascend Avance III-HD de 400 MHz, com campo magnético de 9,39 Tesla e o tempo espera entre cada aquisição (d1) foi de 1 segundo. O grau de desacetilação foi calculado através da área dos picos de RMN de <sup>1</sup>H, conforme descrito na literatura<sup>73</sup> e que será melhor discutido nos resultados e discussão.

### 4.3 Cálculo da massa molar viscosimétrica e massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC) da quitosana

A massa molar da quitosana utilizada nesse trabalho foi calculada pelo método viscosimétrico e por GPC. Para o primeiro, três soluções de diferentes concentrações de quitosana em solução aquosa de ácido acético 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> tiveram seu tempo de escoamento determinado em um viscosímetro de Ostwald a 30 °C. A densidade de cada solução foi determinada medindo, em uma balança analítica, a massa de 1 mL de líquido, pipetado com uma pipeta automática. A viscosidade relativa de cada solução foi calculada comparando os dados anteriores com os da água, através da equação abaixo.

$$\frac{\eta_{s1}}{\eta_{s2}} = \frac{t_1 \times \rho_1}{t_2 \times \rho_2} \quad (1)$$

onde  $\eta_{s1}$  é a viscosidade da solução (mPa),  $\eta_{s2}$  é a viscosidade da água,  $t_1$  é o tempo de escoamento da solução (s),  $t_2$  é o tempo de escoamento da água,  $\rho_1$  é a densidade da solução (g.mL<sup>-1</sup>) e  $\rho_2$  é a densidade da água.

A viscosidade intrínseca, correspondente à uma diluição infinita, foi obtida através da equação de Huggins<sup>74</sup> (Eq. 2), que relaciona a viscosidade com a concentração de soluções poliméricas.

$$\frac{\eta_s}{c} = [\eta]_H + k_H \times [\eta]_H^2 \times c \quad (2)$$

onde  $\eta_s$  é a viscosidade específica da solução (mPa),  $c$  é a concentração (g.mL<sup>-1</sup>),  $[\eta]_H$  é a viscosidade intrínseca de Huggins, e  $k_H$  é o coeficiente de Huggins. Plotando a viscosidade relativa ( $\eta_s/c$ ) pela concentração de cada solução obtemos a viscosidade intrínseca da quitosana.

De posse desse dado, é possível calcular a massa molar viscosimétrica através da equação de Mark-Houwink (Eq. 3).

$$[\eta] = kM_v^\alpha \quad (3)$$

onde  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca e  $k$  e  $\alpha$  são constantes que dependem do solvente, da temperatura e da força iônica da solução. No caso da quitosana, essas constantes também dependem do grau de desacetilação.

Na cromatografia de permeação em gel o equipamento utilizado foi um cromatógrafo de exclusão de tamanho Viscotek constituído de um módulo de GPCmax VE-2001 (bomba, desgaseificador e auto-sampler) equipado com detector de índice de refração. A fase móvel foi NaNO<sub>3</sub> aquoso 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e foi utilizado o conjunto de colunas SB807,806,803,802HQ com 8 mm de diâmetro interno e 300 mm de comprimento, cada uma, posicionadas em série nessa mesma ordem. A quitosana foi dissolvida em ácido acético 0,6% (v/v) numa concentração de 5 mg por mL, e o pH foi elevado até 6 pela adição de NaOH sólido. O volume de amostra injetado no equipamento foi 100 µL, a taxa do fluxo da fase móvel foi 0,500 mL por minuto e a temperatura na coluna e no detector foi 35 °C.

#### 4.4 Cálculo da quantidade grupos amina

O cálculo do número de mols do grupo amina por massa de quitosana foi feito segundo a fórmula abaixo, onde  $GD$  (%) é o grau de desacetilação, determinado conforme a seção 6.2,  $161$  é a massa do mero desacetilado (g.mol<sup>-1</sup>),  $x$  é o número de mols do mero e, conseqüentemente, do grupo amina e  $m$  é a massa de quitosana. Mero é a unidade de repetição do polímero<sup>75</sup>. É utilizada a massa do mero desacetilado pois é esse o mero que contém o grupo amina, um grupo por mero.

$$x = \frac{GD \times m}{161 \times 100} \quad (4)$$

#### **4.5 Reação entre vanilina e quitosana**

Foram sintetizados dois sistemas com diferentes razões molares dos grupos funcionais de interesse dos reagentes, amina (-NH<sub>2</sub>), da quitosana, e aldeído (-CHO), da vanilina, sendo denominados de acordo com a proporção de amina para aldeído em 1:1 (QV1) e 1:2 (QV2). Em ambos os casos, foram pesados 5 g de quitosana com grau de desacetilação (GD) de 79,6% e essa massa foi dissolvida em 500 mL de solução aquosa de ácido acético 0,6% (v/v). O sistema ficou sob agitação magnética por 2 horas para completa dissolução da quitosana.

Sabendo o número de mols de grupos amina presentes nos 5 g de quitosana, foram calculadas as quantidades de vanilina necessárias para obter as razões molares desejadas. Para a síntese do sistema QV1 usou-se 3,7 g de vanilina dissolvidos em 20 mL de etanol. Já para a síntese do sistema QV2 foram 7,4 g de vanilina dissolvidos em 40 mL de etanol. A solução de vanilina foi então adicionada à solução de quitosana gota a gota e o sistema reacional ficou sob agitação magnética por 24h à temperatura ambiente (20 °C) para a formação do grupo imina, conforme reação esquematizada na Figura 5.

Após as 24h de reação, a quitosana-vanilina foi precipitada mudando o pH de 3 para 8 pela adição de uma solução de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Também foram adicionados 350 mL de etanol para dissolução da vanilina que não reagiu. A mistura ficou sob refrigeração por cerca de 18 horas para favorecer a precipitação do produto. O precipitado foi filtrado em funil de Büchner com papel filtro de faixa azul (filtração lenta para precipitados finos), e lavado com etanol para remover do produto qualquer resíduo de vanilina livre. Em seguida, o sólido foi mantido em dessecador até peso constante e posteriormente foi macerado em gral de porcelana até a obtenção de um pó.

#### **4.6 Análise estrutural em estado sólido**

As amostras sintetizadas, em estado sólido, bem como os reagentes, foram analisadas quanto ao núcleo de  $^{13}\text{C}$  em um equipamento de ressonância magnética nuclear Agilent 500 MHz, com campo magnético de 11,74 Tesla através da técnica de CP-MAS (*cross polarization - magic angle spinning*) com  $d_1$  de 1 segundo. Para a análise de espectroscopia na região do infravermelho, as amostras e os reagentes foram misturados com KBr e dessa mistura foi feita uma pastilha. As pastilhas foram analisadas em um Espectrofotômetro no Infravermelho (FTIR) Prestige-21 (Shimadzu), com varredura de 400 a 4500  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 scans cumulativos. Na análise de espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-IR), os espectros foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Alpha 2 com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 96 aquisições, para diminuir a razão sinal-ruído.

#### **4.7 Análise estrutural em solução**

Soluções das amostras QV1 e QV2 foram preparadas com 20 mg do sólido em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  (2 mL de  $\text{D}_2\text{O}$  + 1 gota de HCl) e analisadas quanto ao núcleo de  $^1\text{H}$  em um equipamento de ressonância magnética nuclear Bruker Avance de 400 MHz, com campo magnético de 9,39 Tesla.

#### **4.8 Ensaio de liberação da Vanilina**

Amostras QV2 foram analisadas quanto à liberação da vanilina na ausência e na presença de CTAB. Quinhentos miligramas de QV2 foram dissolvidos em 50 mL de ácido acético 0,6% (v/v) em água (pH = 2,4), contidos no interior de uma membrana de diálise feita de celulose, que retém moléculas com massa molar maior que 14000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . No sistema contendo o CTAB, o surfactante foi dissolvido na solução de ácido acético 0,6% (v/v), na concentração de 3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , acima da sua CMC, que é 0,9  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Essa solução foi inserida na membrana de diálise e em seguida a massa de 500 mg de QV2 foi adicionada à solução.

O recipiente de diálise foi inserido em uma solução 50% etanol (460 mL), com agitação magnética. O uso da membrana de diálise foi necessário para evitar interferências da quitosana<sup>76</sup> no sinal de absorção da vanilina no UV-Vis. Dessa forma, apenas a vanilina livre passaria através da membrana, migrando para a solução de etanol, enquanto a quitosana permaneceu no interior da membrana. Alíquotas da solução externa ao invólucro de celulose foram retiradas desde o tempo zero da dissolução da amostra até 97h após seu início e analisadas quanto à sua absorção em 310 nm, pico característico da vanilina, em um espectrofotômetro de luz UV-Vis KASVI. A concentração foi determinada através de uma curva padrão de vanilina em etanol.

#### **4.9 Solubilidade e interação com o surfactante**

Para os testes de solubilidade, diferentes quantidades das amostras QV1 e QV2 foram adicionadas em cada sistema solvente. Os solventes utilizados foram: água e mistura de água com etanol (50% v/v). Nos testes com a presença de surfactante, CTAB ou SDS foram adicionados ao solvente nas concentrações de 0,91 mmol.L<sup>-1</sup> e 8,1 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para os ajustes de pH, foram adicionados ácido acético ou solução 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH no sistema solvente. Os testes ocorreram com agitação magnética constante, à temperatura ambiente e a 50 °C, conforme indicado posteriormente nos resultados (5.7).

#### **4.10 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)**

As medidas de espalhamento de luz foram feitas em um aparelho Zetasizer Nano (Malvern Panalytical), em uma cubeta descartável de poliestireno, a 25 °C, a um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente. O tempo de equilíbrio da temperatura foi de 120 segundos e foram feitas 3 medidas de cada amostra, cada uma com 10 aquisições de 5 segundos. A viscosidade de cada solução foi determinada em viscosímetro de Ostwald, da mesma forma descrita na seção 6.3. O dado de viscosidade é importante porque essa técnica se baseia na difusão das partículas em solução, ao longo do tempo, e o raio hidrodinâmico (e posteriormente o diâmetro hidrodinâmico) são calculados a partir da equação de Stokes-Einstein que é:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta R_h} \quad (5)$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão,  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $R_h$  é o raio hidrodinâmico.

#### 4.11 Potencial Zeta das soluções de quitosana-vanilina com e sem surfactante

O potencial zeta das soluções moleculares de CTAB, de QV2 e da mistura das duas substâncias em solução ácida de ácido acético foi medido em um equipamento Zeta Plus Brookhaven Instruments (com  $\lambda = 658$  nm) a um ângulo de  $15^\circ$ .

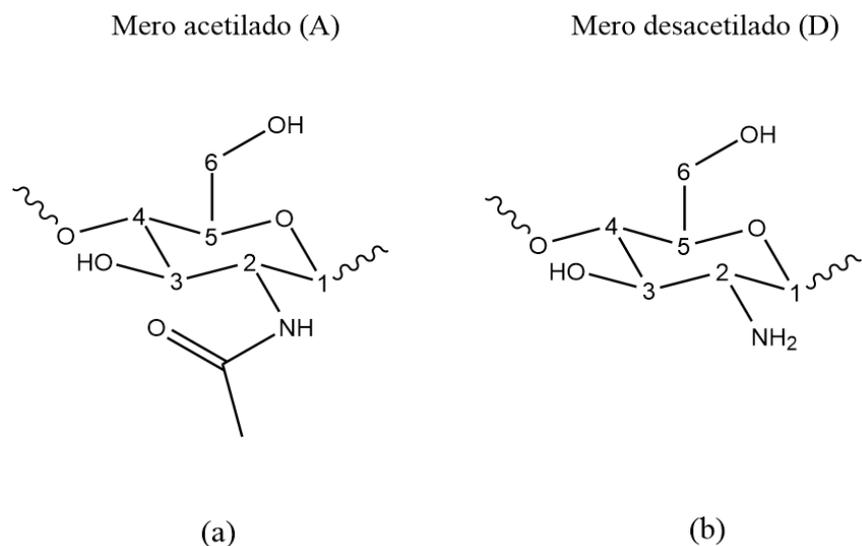
## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana foi calculado utilizando a fórmula abaixo<sup>73</sup>.

$$GD(\%) = \left[ 1 - \left( \frac{HAc}{3} / \frac{H_{2-6}}{6} \right) \times 100 \right] \quad (6)$$

onde GD é o grau de desacetilação, HAc é a área do pico correspondente aos 3 hidrogênios do grupo acetila e H2-6 corresponde às áreas dos picos H2 (A), H2 (D), H3, H4, H5, H6 e H6', cujos respectivos carbonos estão devidamente identificados na Figura 7.

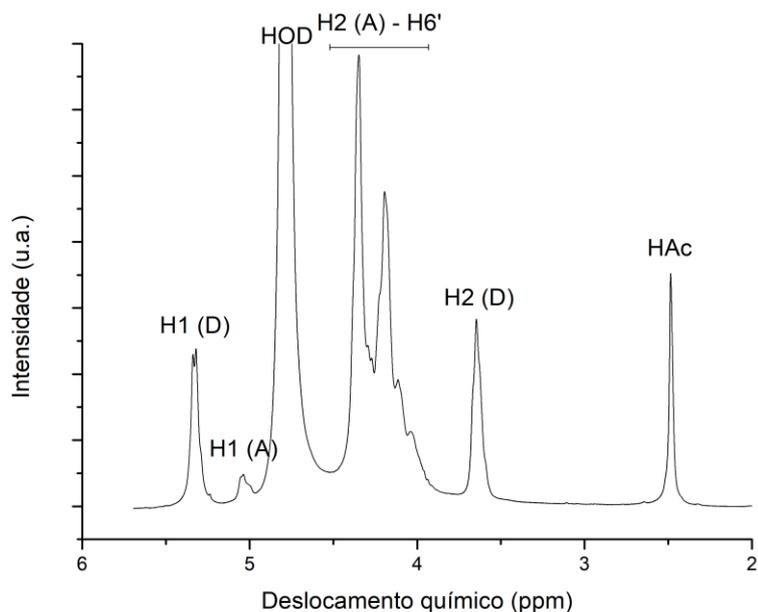


**Figura 7.** Estrutura do mero acetilado (a) e desacetilado (b) da quitosana. Os números representam os carbonos das moléculas.

Na Figura 8 está o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido e na Tabela 2 estão as áreas normalizadas dos picos. Assim, o GD calculado para a quitosana foi de 79,6%, ou seja, 79,6% dos meros dessa quitosana possuem o grupo  $\text{NH}_2$ , passível de reação com a vanilina.

**Tabela 2.** Dados obtidos através do RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ .

Hidrogênio	Deslocamento químico (ppm)	Área normalizada
HAc	2,5	1
H2 (D)	3,6	1,85
H2 (A) a H6'	4,0 a 4,4	8,0



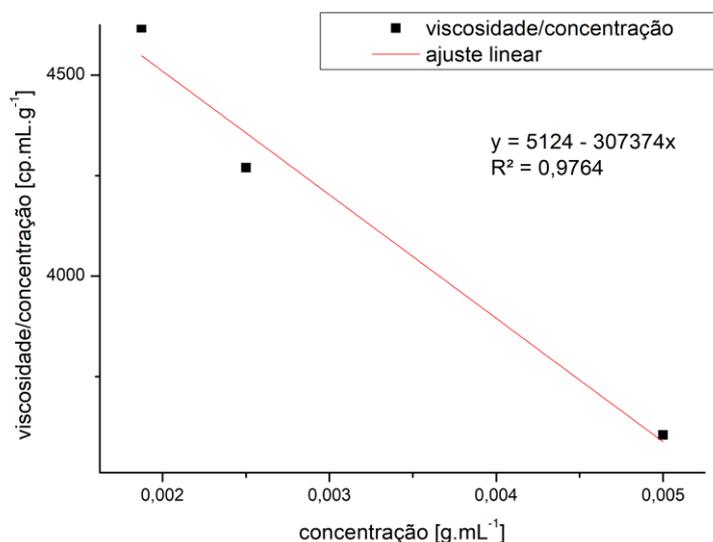
**Figura 8.** RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  a  $70\text{ }^\circ\text{C}$ . Os números indicam os carbonos a que esses hidrogênios estão ligados. (A) corresponde ao mero acetilado e (D) ao mero desacetilado.

### 5.2 Massa molar viscosimétrica e massa molar por GPC da quitosana

Na Tabela 3 estão apresentados os dados médios de densidade, tempo de escoamento e viscosidade (calculada a partir da equação 1) de cada uma das três soluções de quitosana em diferentes concentrações. Plotando esses valores conforme a equação 2 (Figura 9), e sendo a viscosidade do solvente igual a  $0,1028\text{ cp}$ , encontramos a viscosidade intrínseca da quitosana, que é  $5124\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ .

**Tabela 3.** Densidade, tempo de escoamento e viscosidade médios para a quitosana a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

Concentração ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Densidade ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Tempo de escoamento (s)	Viscosidade (cp)	Viscosidade específica
$1,875 \times 10^{-3}$	0,9897	81,07	0,9933	8,66
$2,5 \times 10^{-3}$	1,0109	95,95	1,2008	10,68
$5 \times 10^{-3}$	1,0289	153,62	1,9568	18,02



**Figura 9.** Regressão linear da viscosidade/concentração das soluções de quitosana versus a concentração das soluções de quitosana a 30 °C.

Inserindo a viscosidade intrínseca encontrada no intercepto da regressão linear na equação 3, obtemos a massa molar viscosimétrica da quitosana ( $M_v$ ). As constantes  $\alpha$  e  $k$  da equação de Mark-Houwink utilizadas foram calculadas a partir das equações 5 e 6, desenvolvidas por Wang e colaboradores<sup>77</sup>, que levam em conta que essas constantes mudam com o GD da quitosana. O coeficiente  $k$ , da equação de Mark-Houwink foi calculado para a quitosana com  $GD = 79,6$  foi  $6,7 \times 10^{-4} \text{ mL.g}^{-1}$  e o  $\alpha$  foi 1,008. Assim a  $M_v$  calculada foi de  $6,7 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ .

$$k (\text{mL.g}^{-1}) = 1,64 \times 10^{-30} \times GD^{14} \quad (6)$$

$$\alpha = -1,02 \times 10^{-2} \times GD + 1,82 \quad (7)$$

Porém, esse valor de massa molar difere em uma ordem de grandeza do valor obtido por GPC. Na análise de GPC foram encontrados 4 picos com diferentes volumes de retenção. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados de massa molar da quitosana, obtidos através de cromatografia de permeação em gel, em pH 6, com fase móvel aquosa de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , taxa de vazão de  $0,500 \text{ mL.min}^{-1}$  e colunas em série (SB807,806,803,802HQ).

Volume de retenção (mL)	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn
28,992	200794	235960	1,175

30,475	52819	56483	1,069
32,792	6392	9399	1,470
36,500	893	913	1,022

Vemos que o valor de massa molar numeral ( $M_n$ ) é menor que o valor de massa molar ponderal ( $M_w$ ), como esperado. Isso mostra que o polímero é polidisperso, e a extensão dessa polidispersidade é dada pelo valor de  $M_w/M_n$ , sendo mais polidisperso quanto maior for essa relação. Já o valor de  $M_v$  deveria estar entre esses outros dois valores, mais próximo de  $M_w$ . Como dito anteriormente, o valor obtido foi na ordem de grandeza de  $10^6$ , enquanto os valores de  $M_n$  e  $M_w$  estão na ordem de  $10^5$ . Isso indica que o valor de viscosidade intrínseca obtido pela extrapolação do ajuste linear de  $\eta_s/c$  pela concentração está incorreto, o que também é indicado pelo baixo  $R^2$  da curva (0,9764).

Sendo assim, para utilizar o valor de massa molar viscosimétrica seria necessária uma nova análise dos tempos de escoamento de soluções de quitosana, com mais pontos (concentrações), a fim de obter um melhor ajuste da reta.

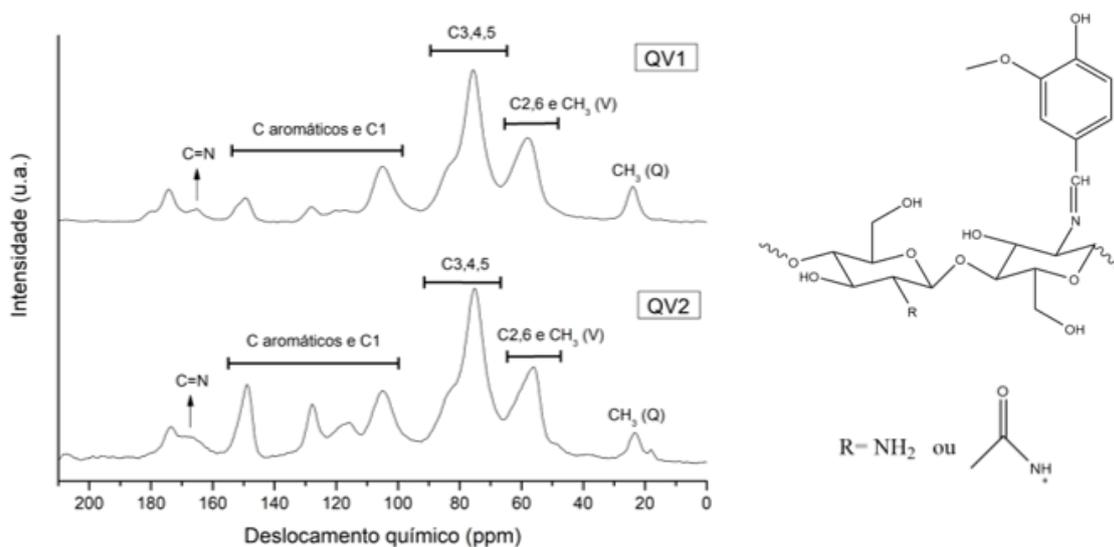
### 5.3 Cálculo da quantidade de grupos amina disponíveis

Sabendo o grau de desacetilação da quitosana utilizada nesse trabalho (79,6%) foi possível calcular a quantidade de grupos amina presentes por massa de quitosana. O valor encontrado foi 4,9 mmol de  $\text{NH}_2$  por grama de quitosana. Esse resultado permitiu controle dos parâmetros de síntese, nas formulações. Foram posteriormente obtidas formulações com diferentes razões entre grupo amina da quitosana e grupo aldeído da vanilina.

### 5.4 Análise estrutural em estado sólido

#### 5.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) de $^{13}\text{C}$ em estado sólido

Os espectros de CP-MAS SS RMN de  $^{13}\text{C}$  das amostras sólidas sintetizadas com 1:1 mol de amina:mol de aldeído (QV1) e 1:2 (QV2), apresentados na Figura 10, mostram picos característicos tanto da quitosana quanto da vanilina, além de um novo pico correspondente à nova ligação  $\text{C}=\text{N}$ .



**Figura 10.** CP-MAS RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido das amostras QV1 e QV2. Os números indicam os carbonos a que esses hidrogênios estão ligados. (A) corresponde ao mero acetilado e (D) ao mero desacetilado e (V) à vanilina.

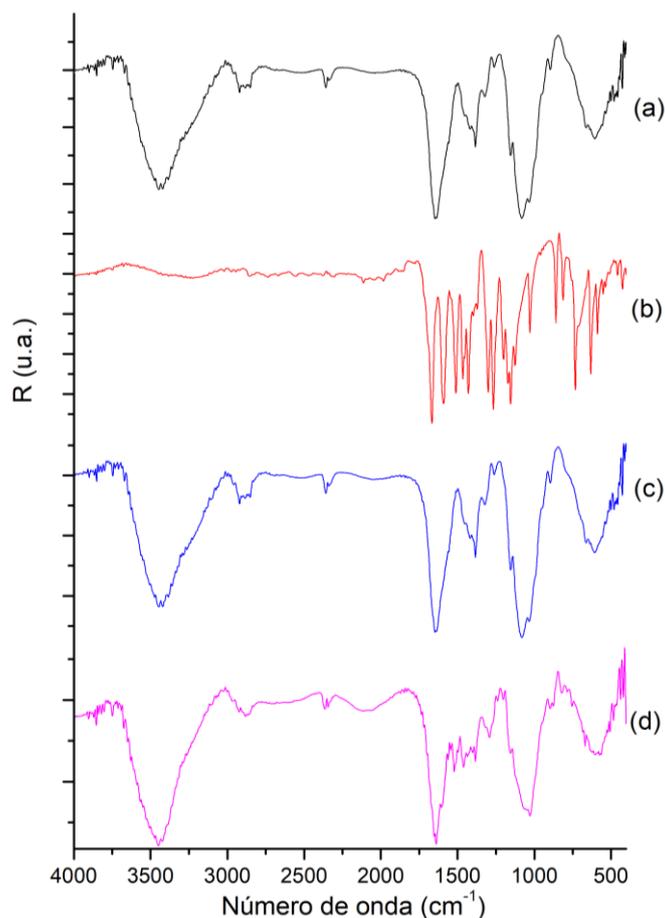
Entre 20 ppm e 110 ppm temos os picos de carbonos alifáticos da quitosana, conforme reportado anteriormente na literatura. Em torno de 23 ppm, por exemplo, temos o pico de CH<sub>3</sub> da acetila (mero acetilado) e em 105 ppm o pico correspondente ao C1 do anel. O pico em 75 ppm corresponde aos carbonos C3 e C5 e o pico em 83 ppm ao C4. O sinal do carbono da carbonila do mero acetilado aparece em torno de 174 ppm<sup>68,78</sup>.

Em aproximadamente 115 ppm aparece o pico do carbono aromático ligado ao grupo fenol, enquanto em 127 ppm temos o carbono aromático ligado ao grupo aldeído. Em 150 ppm aparece a sobreposição dos picos dos carbonos aromáticos ligados a oxigênios (grupo fenol e grupo éter). O carbono do grupo aldeído deveria aparecer em 190 ppm, mas, como esperado pela reação de formação de base de Schiff, esse pico não está presente nas amostras<sup>79</sup>.

Na região entre 50 e 65 ppm temos a sobreposição de picos característicos da quitosana e da vanilina, sendo eles correspondentes ao CH<sub>3</sub> do grupo éter, e ao C2 e C6 da quitosana<sup>78,79</sup>. Stroescu e colaboradores atribuíram o pico em 168 ppm na sua amostra de quitosana modificada com vanilina ao carbono da imina<sup>68</sup>. As amostras QV1 e QV2 apresentam picos em torno de 166 ppm que podem ser atribuídos ao C=N da base de Schiff formada, indicando o sucesso da reação.

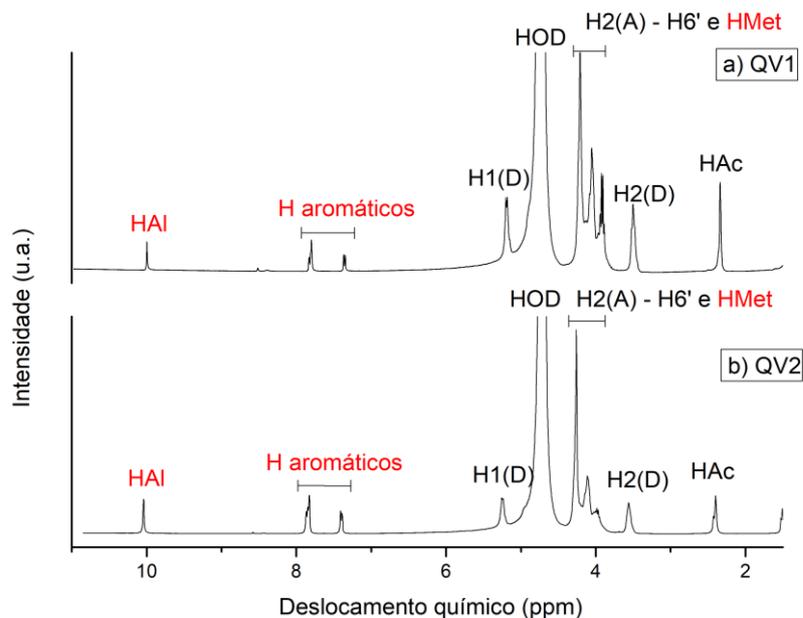
#### *5.4.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) em estado sólido*

O resultado completo da análise de espectroscopia na região do infravermelho para os reagentes e os produtos são mostrados na Figura 11.



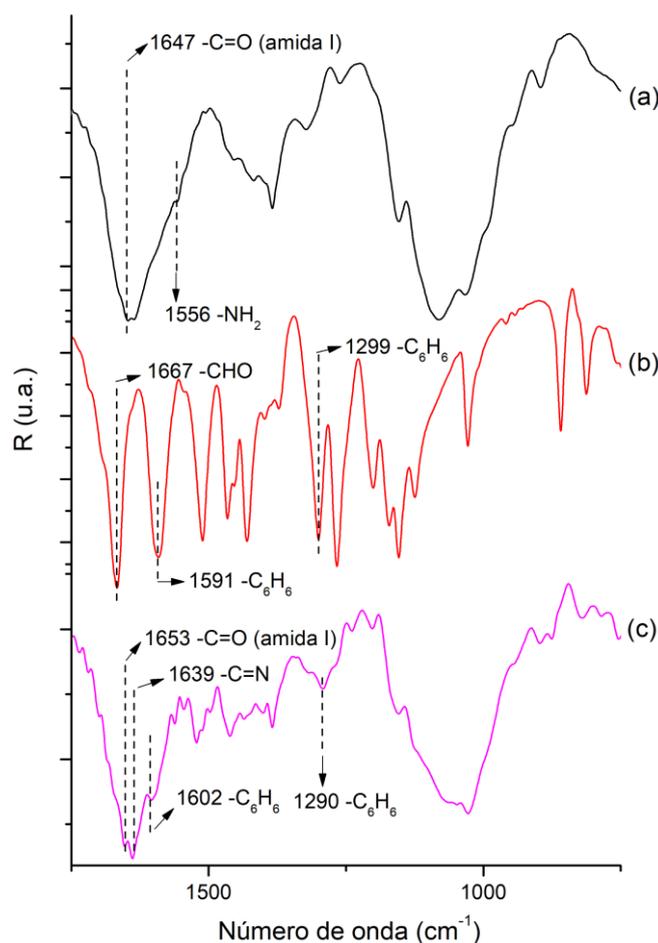
**Figura 11.** Espectros de infravermelho em estado sólido da: quitosana (a), vanilina (b), QV1 (c) e QV2 (d).

O sólido QV1 (Figura 11c) apresentou o mesmo espectro de infravermelho que a quitosana (Figura 11a). A não observação da vanilina pode ser devida ao baixo grau de substituição, indicando que o sinal da quitosana mascara a vanilina. Uma evidência da vanilina ligada à quitosana no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido, apresentado anteriormente na Figura 10. Além disso, quando o sólido sintetizado é dissolvido em água deuterada em  $\text{pH} < 7,4$ , a liberação de vanilina pode ser observada através da ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  da amostra em solução ácida (Figura 12a). Em  $\text{pH}$  menor que 7,4, o equilíbrio da reação de formação da base de Schiff é deslocado no sentido dos reagentes, ou seja, a ligação  $\text{C}=\text{N}$  da imina é desfeita<sup>10</sup>. Por isso, é possível identificar o sinal do hidrogênio de aldeído em 10 ppm, bem como os sinais dos hidrogênios do anel aromático da vanilina entre 7,35 e 7,83 ppm<sup>13</sup>.



**Figura 12.** RMN de <sup>1</sup>H das amostras (a) QV1 e (b) QV2 em solução de D<sub>2</sub>O/HCl a 70°C. Em vermelho são indicados os sinais provenientes da molécula de vanilina.

A QV2 em estado sólido apresentou picos de absorção na região infravermelho do espectro eletromagnético provenientes tanto da quitosana quanto da vanilina. Além disso, apresentou também um pico novo em 1639 cm<sup>-1</sup> que indica a formação da ligação C=N. Na Figura 13 é apresentado o espectro na região entre 1750 e 750 cm<sup>-1</sup> para os reagentes e produto.



**Figura 13.** Espectro de infravermelho em estado sólido da quitosana (a), vanilina (b), QV2(c).

Na Figura 13a temos os picos característicos da quitosana, sendo eles o pico em  $1647\text{ cm}^{-1}$  e o pico em  $1556\text{ cm}^{-1}$  que correspondem à banda de amida I e ao estiramento de amina primária, respectivamente<sup>14,80</sup>. Na amostra QV2 (Figura 13 c) o pico da banda de amida I ainda está presente, em  $1653\text{ cm}^{-1}$ , pois esse grupo não participa da reação. Por outro lado, o pico correspondente à amina primária diminuiu de intensidade, indicando que esse grupo reagiu com a vanilina.

Na Figura 13b temos o espectro da vanilina, destacando o pico do aldeído em  $1667\text{ cm}^{-1}$  e picos correspondentes ao anel aromático em  $1591\text{ cm}^{-1}$  e  $1299\text{ cm}^{-1}$ <sup>14,69,71</sup>. Na amostra QV2 o pico do aldeído não está presente, indicando que esse grupo reagiu com a amina primária da quitosana. Além disso, estão presentes na amostra os picos do anel aromático da vanilina, levemente deslocados para  $1602\text{ cm}^{-1}$  e  $1290\text{ cm}^{-1}$ . Outra evidência da formação da base de Schiff é o surgimento de um pico em  $1639\text{ cm}^{-1}$ , relativo à ligação  $\text{C}=\text{N}$ <sup>10,14,69,71</sup>.

Também foi realizada a análise de reflectância total atenuada (ATR) para averiguar se seria possível identificar picos da vanilina na amostra QV1, mas, assim como no FT-IR, a amostra apresentou o mesmo espectro da quitosana. Os espectros da quitosana, vanilina, QV1 e QV2 estão na Figura 1 dos Anexos.

### 5.5 Determinação do grau de conversão

Para o cálculo do grau de conversão foram descartados os métodos que utilizam medidas de absorção da vanilina no espectro UV-Vis<sup>10</sup>, uma vez que a quitosana também absorve na mesma região<sup>76</sup> e causaria interferências. Sendo assim, considerando que através da análise de RMN de <sup>13</sup>C em estado sólido não foi detectada a presença de vanilina livre, é seguro dizer que todo sinal de aldeído presente no espectro de RMN de <sup>1</sup>H em solução (D<sub>2</sub>O/HCl) do produto é da vanilina que estava anteriormente ligada à quitosana pela formação do grupo imina. Com essas considerações feitas, o método desenvolvido foi similar ao de Lavertu *et al*<sup>73</sup>, utilizado para calcular o grau de desacetilação da quitosana. A fórmula adaptada leva em consideração a área dos picos e o grau de desacetilação da quitosana, e é apresentada a seguir:

$$\text{Conversão (\%)} = \left[ H_{Al} / \left( \frac{1}{3} \times H_{Ac} \times \frac{79,6}{20,4} \right) \right] \times 100 \quad (8)$$

onde  $H_{Al}$  é a área do pico do hidrogênio do grupo aldeído,  $H_{Ac}$  são os hidrogênios do grupo acetila, 20,4 é o grau de acetilação (GA, em porcentagem) e 79,6 é o grau de desacetilação. Não foram utilizados os picos de H<sub>2-6</sub> porque o pico correspondente aos hidrogênios da metila presente na vanilina se sobrepõe com eles. Uma vez que a quantidade de grupos acetilados permanece a mesma da quitosana não-modificada, esse pico foi utilizado como padrão para comparação das áreas. Com uma regra de três, é calculada a área que corresponderia à quantidade de grupos amina disponíveis para reagir, considerando o grau de desacetilação. Dividindo a área do hidrogênio do grupo aldeído, formado após a liberação da vanilina no meio ácido, pela área correspondente à amina vemos a extensão da conversão deste último grupo em imina.

**Tabela 5.** Área dos picos de  $^1\text{H}$  no RMN a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  das amostras QV1 e QV2 dissolvidas em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ .

Amostra	Pico	Área normalizada	Conversão
QV1	HAl	1,00	15
	HAc	5,20	
QV2	HAl	1,00	46
	HAc	1,66	

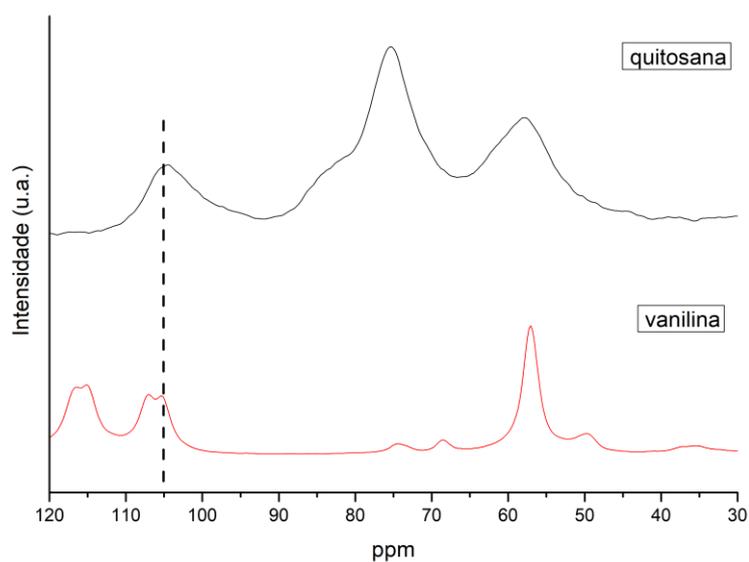
Conforme os dados apresentados na Tabela 5, e levando em consideração o grau de desacetilação da quitosana utilizada (quantidade de grupos passíveis de reagir com a vanilina) temos um rendimento de 15% para a síntese da QV1 e 46% para a QV2. Ou seja, apenas 15% e 46% dos grupos NH<sub>2</sub> disponíveis para reagir realmente formaram o grupo imina através da reação com a vanilina.

Além desse método, o rendimento foi calculado através da área dos picos dos carbonos C=N e C<sub>3,4,5</sub> da quitosana, provenientes da análise de CP-MAS RMN de <sup>13</sup>C em estado sólido (Tabela 6, Figura 10), adaptado de Marin *et al*<sup>14</sup>. A fórmula utilizada foi a seguinte:

$$\text{Conversão (\%)} = \left[ A_{\text{CH=N}} / \left( \frac{1}{3} \times A_{\text{C}_{3,4,5}} \times 0,796 \right) \right] \times 100 \quad (9)$$

onde A<sub>CH=N</sub> é a área do pico do carbono da ligação imina em 166 ppm, A<sub>C<sub>3,4,5</sub></sub> é a área dos carbonos C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> da quitosana em 67-90 ppm e 0,796 é o GD.

Diferentemente de Marin *et al*, não foi utilizado o pico do C1 da quitosana, em 105 ppm, pois esse pico se sobrepõe com picos do anel aromático da vanilina<sup>79</sup>, podendo ocasionar erros. Uma comparação entre os espectros de RMN de <sup>13</sup>C em estado sólido dos dois reagentes é apresentada na Figura 14, indicando a sobreposição. Os resultados da conversão são apresentados na Tabela 6, onde vemos que a conversão para a amostra com razão equimolar dos reagentes é de 18% e para amostra com vanilina em excesso é de 46%.



**Figura 14.** Espectros de CP-MAS RMN de  $^{13}\text{C}$  da quitosana e da vanilina.

**Tabela 6.** Área dos picos de  $^{13}\text{C}$  no RMN em estado sólido das amostras QV1 e QV2.

Amostra	Pico	Deslocamento químico (ppm)	Área normalizada	Conversão
QV1	CH=N	165	1	18
	C3,4,5	51-93	21	
QV2	CH=N	167	1	46
	C3,4,5	50-92	8,2	

Apesar da análise ser feita com polarização cruzada (CP), os parâmetros de análise (tempo de contado e tempo de espera entre cada aquisição) além da escolha dos picos utilizados, faz com que seja possível uma análise quantitativa dos resultados, conforme já relatado na literatura<sup>81-83</sup>. A possibilidade do uso quantitativo dos resultados também é ressaltada pela proximidade dos valores de conversão obtidos com CP-MAS SS RMN <sup>13</sup>C em comparação com os provenientes da análise de RMN de <sup>1</sup>H em solução. Para comparação, o espectro de obtido através da análise de MAS SS RMN de <sup>13</sup>C é apresentado na Figura 2 dos Anexos, mostrando que sem a polarização cruzada o espectro tem picos pouco definidos.

Se considerarmos o pico C1, o valor de conversão segue o mesmo para a amostra QV1, o que pode ser explicado pela baixa quantidade de vanilina incorporada, resultando em uma menor interferência dos picos de carbonos aromáticos na área do C1. Já para a amostra QV2, o valor de conversão seria de 41%, uma vez que a área do pico em 105 ppm fica maior devido à contribuição da vanilina, acarretando em um erro. Sendo assim, quanto maior a quantidade de vanilina incorporada na quitosana através da reação de condensação, maior o erro quando se utiliza o pico do C1 da quitosana.

Dos dois métodos de determinação do grau de conversão desenvolvidos nesse trabalho, o menos dispendioso é o método que utiliza o espectro de RMN de <sup>13</sup>C em estado sólido, onde é necessária apenas uma técnica de análise. Isso porque pelo método em solução, para termos certeza que o sinal de aldeído é apenas da vanilina liberada da quebra da ligação imina, e não de resíduos de vanilina não reagida, se faz necessária uma análise prévia da amostra em estado sólido (por RMN de <sup>13</sup>C ou FT-IR), resultando no uso de pelo menos duas técnicas de análise.

## **5.6 Rendimento da reação entre vanilina e quitosana**

O cálculo do rendimento da reação entre vanilina e quitosana foi feito considerando a diferença entre massa do produto e de quitosana, considerando que toda massa extra seria da vanilina que se ligou à quitosana através da ligação C=N, e que não houve perda de quitosana durante a reação, através da Equação 10.

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{(\text{massa do produto} - \text{massa de quitosana}) \times 100}{\text{massa de vanilina utilizada na reação}} \quad (10)$$

Vale ressaltar que o valor máximo de rendimento para a QV1 é de 100%, uma vez que a razão molar dos grupos funcionais é a mesma da razão estequiométrica, mas que para a QV2 o máximo seria de 50%, já que nesse caso a vanilina foi adicionada em excesso (o dobro de mols). Os resultados são apresentados na Tabela 7. O excesso de vanilina desloca o equilíbrio no sentido da formação do produto substituído.

**Tabela 7.** Massa dos reagentes, massa dos produtos e rendimento para as amostras QV1 e QV2.

Amostra	Massa de quitosana (g)	Massa de vanilina (g)	Massa do produto (g)	Rendimento (%)
QV1	5,0012	3,7056	5,1895	5,1
QV2	5,0088	7,6120	6,2051	15,7

A diferença entre o rendimento e a conversão pode se dar por três fatores: (i) a quitosana tem uma distribuição de massas molares, sendo assim, frações de baixo peso molecular podem ter continuado solúveis no processo de filtração ou mesmo sólidas podem ter passado pelos poros do filtro; (ii) não foram consideradas perdas de produto e de reagentes das etapas da síntese mas podem ter ocorrido durante a transferência entre vidrarias; (iii) a reação de formação da imina ocorre com a perda de uma molécula de água, sendo assim, apesar de ser uma quantidade pequena, essa diferença de massa não foi considerada nos cálculos.

### 5.7 Efeito do surfactante na solubilidade da quitosana-vanilina

Foi possível dissolver 1 g de ambas as amostras, QV1 e QV2, em solução aquosa de ácido acético 0,6% (v/v), tal qual a quitosana, a temperatura ambiente (24 °C). A fim de verificar possíveis mudanças na solubilidade das amostras na presença de surfactantes, foi testada a adição um surfactante catiônico e de um surfactante aniônico em soluções de cada amostra, em diferentes pHs.

Os dois surfactantes escolhidos foram testados primeiramente com a amostra QV1, sendo eles o dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um surfactante aniônico, e o CTAB, que é um surfactante catiônico. Ambos surfactantes estavam acima da sua CMC, que é 8 mmol.L<sup>-1</sup> para o SDS<sup>84</sup> e 0,9 mmol.L<sup>-1</sup> para o CTAB<sup>6</sup>.

Na Tabela 8 podemos ver que em nenhuma condição de pH foi possível dissolver qualquer quantidade da quitosana modificada na presença do surfactante aniônico. Além disso, em pH ácido foi observada a formação de agregados da amostra sólida, o que pode ser explicado pela interação os grupos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> da quitosana em meio ácido com a parte negativa do surfactante, fazendo com que as moléculas se atraiam formando esses agregados. Desta forma, o uso do SDS em formulações do biopesticida foi descartado.

**Tabela 8.** Testes de solubilidade para a amostra QV1 com diferentes surfactantes em água a 24 °C.

Surfactante	Concentração do surfactante (mmol.L <sup>-1</sup> )	pH	Volume da solução (mL)	Massa de QV1 (mg)	Resultado
SDS	8,1	7	100	49,5	não dissolve

SDS	8,1	2,4	100	47,9	agregados
SDS	8,1	11,2	100	7,5	não dissolve
CTAB	0,91	7	100	13,2	não dissolve
CTAB	0,91	2,4	100	971,3	dissolve

Em pH neutro não foi possível dissolver a amostra nem mesmo com o surfactante catiônico. Em pH 2,4, foi possível dissolver até 971,3 mg em 100 mL de solução acidificada com ácido acético. O processo de dissolução, porém, foi muito lento. Para dissolver a massa total de 971,3 mg de amostra foram necessários 8 dias, sob agitação. A mesma massa de amostra QV1 foi então adicionada em uma solução de CTAB 0,91 mmol.L<sup>-1</sup> em meio ácido e aquecida a 50 °C. O aquecimento diminuiu o tempo de dissolução para 7 horas, sob agitação.

Uma vez que a quitosana foi modificada com vanilina, que é solúvel em etanol, uma mistura na proporção de 1:1 de etanol e água foi testada como solvente, sob aquecimento a 50 °C. Não foi possível dissolver a amostra QV1, nem mesmo acidificando o meio ou adicionado CTAB. Isso pode ser explicado pela baixa conversão dos grupos NH<sub>2</sub> em base de Schiff, tendo poucos grupos derivados da vanilina para interagir com o etanol.

Tendo como base os resultados da amostra QV1, com a amostra QV2 os testes foram feitos apenas com CTAB (descartando o SDS), em meio ácido e sob aquecimento (Tabela 9). Vemos que com etanol foi possível dissolver uma pequena massa de QV2 (89,2 mg), uma vez que a quantidade de vanilina é maior nessa amostra, permitindo alguma interação com o etanol. Vemos também que, em água acidificada a presença do surfactante catiônico não aumenta a solubilidade da amostra, sendo em torno de 1 g a cada 100 mL de solvente, similar à solubilidade sem a presença do CTAB.

**Tabela 9.** Testes de solubilidade para a amostra QV2 a 50 °C em pH 2,4 e na presença ou não de CTAB.

Solvente	Concentração		Volume da solução (mL)	Massa de QV2 (mg)	Resultado
	de CTAB (mmol.L <sup>-1</sup> )	pH			
etanol:água (1:1)	22	2,4	100	89,2	dissolve
água	0,91	2,4	100	1050	dissolve

O melhor meio para dissolver as quitosanas modificadas seguiu sendo água acidificada com ácido acético (0,6% v/v), o qual foi utilizado nas etapas seguintes desse trabalho. Entretanto, o CTAB foi o surfactante escolhido para os testes de liberação da vanilina, uma vez que esse surfactante não diminui a solubilidade das amostras.

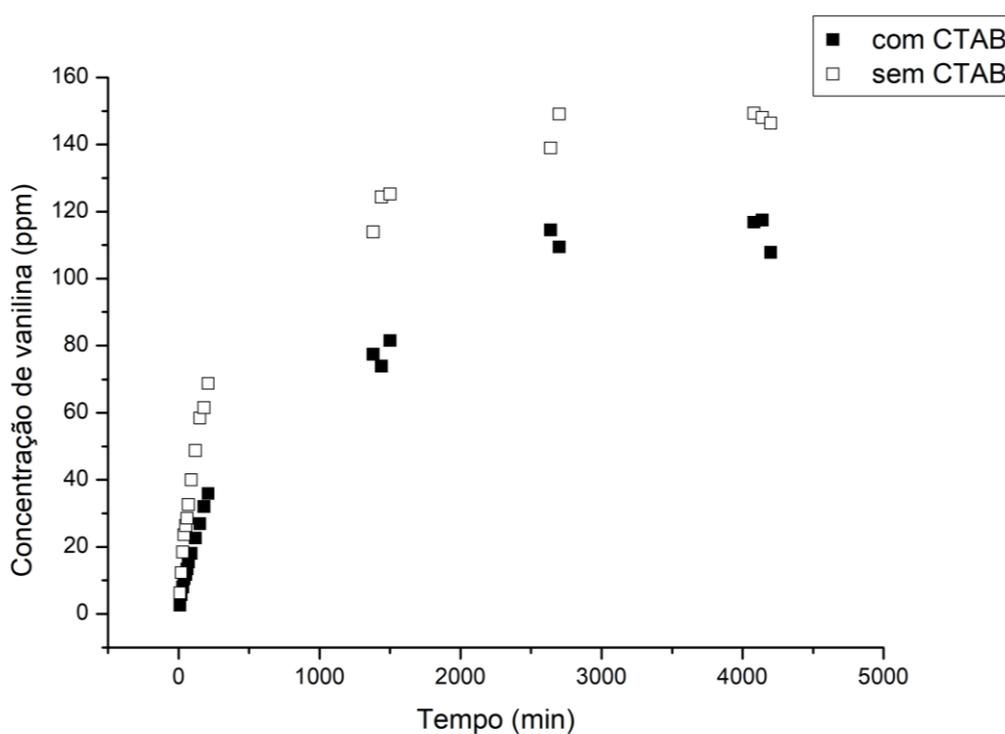
A análise de potencial zeta da solução de QV2 (6 g.L<sup>-1</sup>) com CTAB (3 mmol.L<sup>-1</sup>) em ácido acético (0,6% v/v) mostrou que não houve mudança na carga superficial da amostra QV2 pela adição do surfactante, permanecendo positiva, como indicado na Tabela 10. O baixo valor de potencial zeta, abaixo de 30 mV, indica a instabilidade do sistema coloidal nessas condições de pH (3,6), tanto para a QV2 pura quanto para o surfactante puro. Já na mistura dos dois, o valor aumentou para cerca de 22 mV, indicando um aumento na estabilidade da formulação do pesticida. Ainda se faz necessário um estudo de outras condições de pH e eletrólitos para aumentar a estabilidade da dispersão, chegando ainda mais perto do valor de 30 mV, aumentando sua vida útil em formulações comerciais.

**Tabela 10.** Valor de potencial zeta para as soluções de QV2, de CTAB e a da mistura dos dois componentes, em ácido acético 6% (v/v).

Concentração de QV2 (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração de CTAB (mmol.L <sup>-1</sup> )	Potencial Zeta (mV)
6	-	4,0 ± 0,4
-	3	12,1 ± 0,7
6	3	22 ± 2

## 5.8 Liberação da vanilina

Na Figura 15 é possível comparar o conteúdo de vanilina liberado nos dois casos estudados -com e sem surfactante. Vemos que, desde o início, a quantidade liberada de vanilina no experimento sem o uso de CTAB foi maior do que com o uso do surfactante. Essa tendência se manteve em todo o período estudado, mostrando que o uso do surfactante retarda a liberação da vanilina.

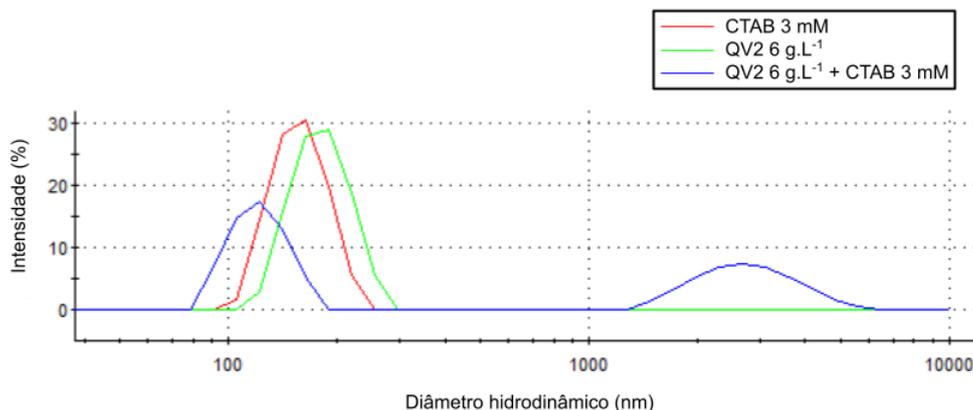


**Figura 15.** Liberação cumulativa da vanilina presente na amostra QV2, na presença ou não de CTAB, em solução de ácido acético 0,6% (v/v).

A fim de determinar qual fenômeno está por trás desse retardo na liberação da vanilina, foi feita a análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Nessa análise foi medido o diâmetro hidrodinâmico das espécies presentes em 3 diferentes sistemas: i) CTAB 3 mmol.L<sup>-1</sup> em meio aquoso, com pH 2,4; ii) amostra QV2 6 g.L<sup>-1</sup> meio aquoso, com pH 2,4; e iii) amostra QV2 6 g.L<sup>-1</sup> meio aquoso, com pH 2,4 + CTAB 3 mmol.L<sup>-1</sup>. Os dados obtidos, bem como a viscosidade das soluções (determinada com viscosímetro de Ostwald, a 25 °C) estão apresentados na Tabela 11. A porcentagem indicada como intensidade se refere intensidade do sinal atribuído a cada pico. Nos dois primeiros sistemas a intensidade é 100% porque foi detectado apenas um pico. No sistema iii foram observados dois picos, com intensidade de sinal de 57,5% no diâmetro hidrodinâmico 123 ± 21, enquanto 42,5% da intensidade do sinal detectado tinha diâmetro de 2843 ± 883. Na Figura 16 vemos o gráfico de distribuição de tamanhos das espécies.

**Tabela 11.** Viscosidade das soluções, medida com viscosímetro de Ostwald, e diâmetro hidrodinâmico das espécies em solução, medido através de DLS, a 25° C.

Sistema	Viscosidade (cP)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	
		Pico 1 (intensidade%)	Pico 2 (intensidade%)
CTAB 3 mmol.L <sup>-1</sup>	0,8992	159 ± 27 (100%)	-
QV2 6 g.L <sup>-1</sup>	10,74	182 ± 32 (100%)	-
QV2 6 g.L <sup>-1</sup> + CTAB 3 mmol.L <sup>-1</sup>	12,40	123 ± 21 (57,5%)	2843 ± 883 (42,5%)



**Figura 16.** Distribuição de tamanho das diferentes soluções em DLS a 25°C em pH 2,4.

No espectro de espalhamento de luz do sistema contendo CTAB (em vermelho), é observado apenas um pico, referente às micelas de surfactante, em  $159 \pm 27$  nm. Na solução de quitosana-vanilina (1:2), em verde, também é observado apenas um pico, em  $182 \pm 32$  nm. Todavia, no espectro do sistema contendo QV2 juntamente com o surfactante (azul), aparecem dois picos: um em  $123 \pm 21$  nm e outro em  $2843 \pm 883$  nm. Não é possível afirmar a qual espécie pertence o primeiro pico, uma vez que os valores deste pico nos três sistemas não possuem diferença significativa. O segundo pico corresponde à uma junção de todas as espécies presentes: quitosana, vanilina, quitosana-vanilina e CTAB. O surfactante faz com que essas espécies interajam de forma diferente de quando estão apenas em meio ácido, fazendo com que a vanilina que é liberada nessas condições tenha mais dificuldade de difundir na solução, diminuindo a quantidade que atravessa a membrana de celulose e é determinada no ensaio de liberação, uma vez que essa membrana retém espécies com  $M_w > 14000$ .

Uma hipótese é que a cauda hidrofóbica do surfactante interage com a estrutura polimérica formando uma micela e a vanilina liberada em meio ácido fica retida nesta região hidrofóbica. Mas vale ressaltar que para determinar exatamente como as espécies estão interagindo em meio aquoso para retardar a liberação da vanilina são necessárias outras análises a realização de espalhamento de luz dinâmico para determinar o raio hidrodinâmico à diluição infinita, espalhamento de raios X em ângulo rasante.

Esse resultado mostra que apesar do CTAB não ter influência sobre a solubilidade da quitosana modificada, em formulações aquosas da amostra, o surfactante pode retardar a liberação da vanilina no meio de interesse, através da formação de micelas. Isso faz com que um biopesticida feito com a QV2 tenha uma ação mais prolongada, liberando o agente antimicrobiano aos poucos na planta.

## **6 Conclusões e próximos passos**

Uma nova síntese, para a formação de uma imina entre a quitosana e a vanilina, sem o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos e sem o uso de altas temperaturas, foi desenvolvida. O sucesso da reação foi observado nas análises de FT-IR e de RMN de  $^{13}\text{C}$  das amostras sólidas, que indicaram a presença de grupos funcionais pertencentes a ambos os reagentes, além da ausência do grupo aldeído da vanilina, grupo que reage com a amina da quitosana, e da aparição de um pico relativo a ligação C=N da imina formada. Na análise de FT-IR da amostra QV1 foram detectados apenas picos pertencentes à quitosana, mas a presença da vanilina foi confirmada através das análises de RMN de  $^1\text{H}$  em solução e de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido.

A conversão dos grupos amina em imina foi calculada através de análises de RMN de  $^1\text{H}$  em solução e de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido, com um método novo, criado nesse trabalho. Através da relação entre o sinal do hidrogênio do aldeído liberado em meio ácido, e dos hidrogênios do grupo acetila da quitosana, grupo esse que não se altera ao longo da síntese, foi determinada uma conversão de 15% para a amostra QV1 e de 46% para a amostra QV2. Através da análise dos carbonos da amostra sólida, também por RMN, a relação entre o pico do carbono C=N da imina e os carbonos C3, C4 e C5 da quitosana, nos dão uma conversão de 18% para QV1 e 46% para a QV2. Esses resultados mostram que é possível calcular a conversão da reação tanto com a amostra em solução ácida quanto em estado sólido. Além disso, a baixa conversão da amostra QV1 pode ser o motivo dos picos da vanilina não aparecerem na análise de FT-IR mostrando que essa técnica não é recomendada para amostras com baixa conversão, sendo mais confiável as análises por RMN.

As amostras não apresentaram diferença de solubilidade em relação à quitosana pura, sendo solúveis em solução aquosa ácida, até 10 g.L<sup>-1</sup>. A adição de um surfactante aniônico, como o SDS, porém, causou a formação de agregados em meio ácido, impossibilitando a dissolução das amostras. Sendo assim, o surfactante utilizado nos testes de liberação da vanilina em meio aquoso foi o CTAB, surfactante catiônico.

A liberação da vanilina em meio ácido foi mais lenta quando foi adicionado o CTAB acima da sua CMC. Uma possibilidade, indicada pela análise da solução em DLS, é a formação de agregados ou micelas entre a cauda do surfactante e a cadeia polimérica da quitosana, dificultando a difusão da vanilina pela solução. Esse resultado mostra que uma formulação desse pesticida de quitosana funcionalizada com vanilina em meio aquoso acidificado seria mais eficiente com a adição de CTAB, que permite uma liberação mais controlada do ingrediente ativo ao longo do tempo.

Ainda é necessária uma investigação das espécies em solução quando o biopesticida é dissolvido em meio ácido na presença de CTAB, para determinar o que realmente está acontecendo para resultar na liberação controlada da vanilina. Também é necessário testar a aplicabilidade dessas formulações em plantas. O biopesticida pode ser aplicado na forma sólida, no solo, ou na forma de solução, pulverizado nas plantas.

## REFERÊNCIAS

- (1) World Population. <https://www.worldometers.info/world-population/>. Acesso em 07/06/2023 às 16:22.
- (2) Kumar, S.; Nehra, M.; Dilbaghi, N.; Marrazza, G.; Hassan, A. A.; Kim, K. H. Nano-Based Smart Pesticide Formulations: Emerging Opportunities for Agriculture. *Journal of Controlled Release*. 2019, pp 131–153. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.012>.
- (3) Reganold, J. P.; Wachter, J. M. Organic Agriculture in the Twenty-First Century. *Nature plants*. 2016, p 15221. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.221>.
- (4) Damos, P.; Colomar, L. A. E.; Ioriatti, C. Integrated Fruit Production and Pest Management in Europe: The Apple Case Study and How Far We Are From the Original Concept? *Insects 2015, Vol. 6, Pages 626-657* **2015**, 6 (3), 626–657. <https://doi.org/10.3390/INSECTS6030626>.
- (5) Kumar, S.; Bhanjana, G.; Sharma, A.; Sidhu, M. C.; Dilbaghi, N. Synthesis, Characterization and on Field Evaluation of Pesticide Loaded Sodium Alginate Nanoparticles. *Carbohydr Polym* **2014**, 101 (1), 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.10.025>.
- (6) Seiber, J. N.; Coats, J.; Duke, S. O.; Gross, A. D. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *J Agric Food Chem* **2014**, 62 (48), 11613–11619. <https://doi.org/10.1021/jf504252n>.
- (7) Usman, M.; Farooq, M.; Wakeel, A.; Nawaz, A.; Cheema, S. A.; Rehman, H. ur; Ashraf, I.; Sanaullah, M. Nanotechnology in Agriculture: Current Status, Challenges and Future Opportunities. *Science of the Total Environment*. 2020, p 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>.
- (8) Singh, R. P.; Handa, R.; Manchanda, G. Nanoparticles in Sustainable Agriculture: An Emerging Opportunity. *Journal of Controlled Release*. 2021, pp 1234–1248. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.051>.
- (9) Shang, Y.; Kamrul Hasan, M.; Ahammed, G. J.; Li, M.; Yin, H.; Zhou, J. Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. *Molecules*. 2019, p 2558. <https://doi.org/10.3390/molecules24142558>.
- (10) Wang, Y.; Khan, A.; Liu, Y.; Feng, J.; Dai, L.; Wang, G.; Alam, N.; Tong, L.; Ni, Y. Chitosan Oligosaccharide-Based Dual PH Responsive Nano-Micelles for Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs. *Carbohydr Polym* **2019**, 223, 115061. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115061>.

- (11) Hu, J.; Wang, Z.; Miszuk, J. M.; Zhu, M.; Lansakara, T. I.; Tivanski, A. V.; Banas, J. A.; Sun, H. Vanillin-Bioglass Cross-Linked 3D Porous Chitosan Scaffolds with Strong Osteopromotive and Antibacterial Abilities for Bone Tissue Engineering. *Carbohydr Polym* **2021**, *271*.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118440>.
- (12) Arnon-Rips, H.; Cohen, Y.; Saidi, L.; Porat, R.; Poverenov, E. Covalent Linkage of Bioactive Volatiles to a Polysaccharide Support as a Potential Approach for Preparing Active Edible Coatings and Delivery Systems for Food Products. *Food Chem* **2021**, *338*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127822>.
- (13) Jagadish, R. S.; Divyashree, K. N.; Viswanath, P.; Srinivas, P.; Raj, B. Preparation of N-Vanillyl Chitosan and 4-Hydroxybenzyl Chitosan and Their Physico-Mechanical, Optical, Barrier, and Antimicrobial Properties. *Carbohydr Polym* **2012**, *87* (1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.024>.
- (14) Marin, L.; Stoica, I.; Mares, M.; Dinu, V.; Simionescu, B. C.; Barboiu, M. Antifungal Vanillin-Imino-Chitosan Biodynameric Films. *J Mater Chem B* **2013**, *1*, 3353–3358. <https://doi.org/10.1039/c3tb20558d>.
- (15) Naseema, A.; Kovooru, L.; Behera, A. K.; Kumar, K. P. P.; Srivastava, P. A Critical Review of Synthesis Procedures, Applications and Future Potential of Nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2021, p 102318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102318>.
- (16) Mustafa, I. F.; Hussein, M. Z. Synthesis and Technology of Nanoemulsion-Based Pesticide Formulation. *Nanomaterials*. 2020, p 1608. <https://doi.org/10.3390/nano10081608>.
- (17) Du, Z.; Wang, C.; Tai, X.; Wang, G.; Liu, X. Optimization and Characterization of Biocompatible Oil-in-Water Nanoemulsion for Pesticide Delivery. *ACS Sustain Chem Eng* **2016**, *4*, 983–991. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01058>.
- (18) Souto, A. L.; Sylvestre, M.; Tölke, E. D.; Tavares, J. F.; Barbosa-Filho, J. M.; Cebrián-Torrejón, G. Plant-Derived Pesticides as an Alternative to Pest Management and Sustainable Agricultural Production: Prospects, Applications and Challenges. *Molecules*. MDPI AG August 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26164835>.
- (19) Marrone, P. G. The Market and Potential for Biopesticides. *ACS Symposium Series* **2014**, *1172*, 245–258. <https://doi.org/10.1021/BK-2014-1172.CH016>.
- (20) Damalas, C. A.; Koutroubas, S. D. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture 2018, Vol. 8, Page 13* **2018**, *8* (1), 13. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE8010013>.

- (21) Dunan, L.; Malanga, T.; Bearez, P.; Benhamou, S.; Monticelli, L. S.; Desneux, N.; Michel, T.; Lavoit, A. V. Biopesticide Evaluation from Lab to Greenhouse Scale of Essential Oils Used against *Macrosiphum Euphorbiae*. *Agriculture (Switzerland)* **2021**, *11* (9). <https://doi.org/10.3390/agriculture11090867>.
- (22) Maruyama, C. R.; Guilger, M.; Pascoli, M.; Bileshy-José, N.; Abhilash, P. C.; Fraceto, L. F.; De Lima, R. Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr. *Scientific Reports 2016 6:1* **2016**, *6* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep19768>.
- (23) Pascoli, M.; Jacques, M. T.; Agarrayua, D. A.; Avila, D. S.; Lima, R.; Fraceto, L. F. Neem Oil Based Nanopesticide as an Environmentally-Friendly Formulation for Applications in Sustainable Agriculture: An Ecotoxicological Perspective. *Science of the Total Environment* **2019**, *677*, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.345>.
- (24) Guan, H. N.; Chi, D. F.; Yu, J.; Zhang, S. Y. Novel Photodegradable Insecticide W/TiO<sub>2</sub>/Avermectin Nanocomposites Obtained by Polyelectrolytes Assembly. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, *83*, 148–154. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2010.11.013>.
- (25) Simonin, M.; Richaume, A.; Guyonnet, J. P.; Dubost, A.; Martins, J. M. F.; Pommier, T. Titanium Dioxide Nanoparticles Strongly Impact Soil Microbial Function by Affecting Archaeal Nitrifiers. *Sci Rep* **2016**, *6*, 33643. <https://doi.org/10.1038/srep33643>.
- (26) Yu, J.; Wang, D.; Geetha, N.; Khawar, K. M.; Jogaiah, S.; Mujtaba, M. Current Trends and Challenges in the Synthesis and Applications of Chitosan-Based Nanocomposites for Plants: A Review. *Carbohydr Polym* **2021**, *261*, 117904. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.117904>.
- (27) Liu, J.; Wang, F. H.; Wang, L. L.; Xiao, S. Y.; Tong, C. Y.; Tang, D. Y.; Liu, X. M. Preparation of Fluorescence Starch-Nanoparticle and Its Application as Plant Transgenic Vehicle. *Journal of Central South University of Technology (English Edition)* **2008**, *15* (6), 768–773. <https://doi.org/10.1007/S11771-008-0142-4/METRICS>.
- (28) Elbahri, Z.; Taverdet, J. L. Optimization of an Herbicide Release from Ethylcellulose Microspheres. *Polymer Bulletin* **2005**, *54* (4–5), 353–363. <https://doi.org/10.1007/S00289-005-0385-2/METRICS>.
- (29) Ghormade, V.; Deshpande, M. V.; Paknikar, K. M. Perspectives for Nano-Biotechnology Enabled Protection and Nutrition of Plants. *Biotechnol Adv* **2011**, *29* (6), 792–803. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.06.007>.

- (30) Rao, S. R.; Ravishankar, G. A. Vanilla Flavour: Production by Conventional and Biotechnological Routes. *J Sci Food Agric* **2000**, *80* (3), 289–304. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200002\)80:3<289::aid-jsfa543>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3<289::aid-jsfa543>3.0.co;2-2).
- (31) Jadhav, D.; B.N., R.; Gogate, P. R.; Rathod, V. K. Extraction of Vanillin from Vanilla Pods: A Comparison Study of Conventional Soxhlet and Ultrasound Assisted Extraction. *J Food Eng* **2009**, *93* (4), 421–426. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2009.02.007>.
- (32) Maeda, M.; Hosoya, T.; Yoshioka, K.; Miyafuji, H.; Ohno, H.; Yamada, T. Vanillin Production from Native Softwood Lignin in the Presence of Tetrabutylammonium Ion. *Journal of Wood Science* **2018**, *64* (6), 810–815. <https://doi.org/10.1007/S10086-018-1766-0/FIGURES/4>.
- (33) Banerjee, G.; Chattopadhyay, P. Vanillin Biotechnology: The Perspectives and Future. *J Sci Food Agric* **2019**, *99* (2), 499–506. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9303>.
- (34) Ashengroph, M.; Amini, J. Bioconversion of Isoeugenol to Vanillin and Vanillic Acid Using the Resting Cells of *Trichosporon Asahii*. *3 Biotech* **2017**, *7* (6). <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0998-9>.
- (35) Al-Baqami, N. M.; Hamza, R. Z. Synergistic Antioxidant Capacities of Vanillin and Chitosan Nanoparticles against Reactive Oxygen Species, Hepatotoxicity, and Genotoxicity Induced by Aging in Male Wistar Rats. *Hum Exp Toxicol* **2021**, *40* (1), 183–202. <https://doi.org/10.1177/0960327120943267>.
- (36) Zhao, D.; Sun, J.; Sun, B.; Zhao, M.; Zheng, F.; Huang, M.; Sun, X.; Li, H. Intracellular Antioxidant Effect of Vanillin, 4-Methylguaiacol and 4-Ethylguaiacol: Three Components in Chinese Baijiu. *RSC Adv* **2017**, *7* (73), 46395–46405. <https://doi.org/10.1039/C7RA09302K>.
- (37) Ohta, T.; Watanabe, M.; Watanabe, K.; Shirasu, Y.; Kada, T. Inhibitory Effects of Flavourings on Mutagenesis Induced by Chemicals in Bacteria. *Food and Chemical Toxicology* **1986**, *24* (1), 51–54. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90264-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90264-4).
- (38) Santos, J. H.; Graf, U.; Reguly, M. L.; Rodrigues De Andrade, H. H. The Synergistic Effects of Vanillin on Recombination Predominate over Its Antimutagenic Action in Relation to MMC-Induced Lesions in Somatic Cells of *Drosophila Melanogaster*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **1999**, *444* (2), 355–365. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00101-1).
- (39) Rakchoy, S.; Suppakul, P.; Jinkarn, T. Antimicrobial Effects of Vanillin Coated Solution for Coating Paperboard Intended for Packaging Bakery Products. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **2009**.

- (40) Rupasinghe, H. P. V.; Boulter-Bitzer, J.; Ahn, T.; Odumeru, J. A. Vanillin Inhibits Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Vitro and Aerobic Microbial Growth in Fresh-Cut Apples. *Food Research International* **2006**, *39* (5), 575–580. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2005.11.005>.
- (41) Cava-Roda, R. M.; Taboada-Rodríguez, A.; Valverde-Franco, M. T.; Marín-Iniesta, F. Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* O157:H7 in Milk. *Food Bioproc Tech* **2012**, *5* (6), 2120–2131. <https://doi.org/10.1007/S11947-010-0484-4/METRICS>.
- (42) Maisch, N. A.; Bereswill, S.; Heimesaat, M. M. Antibacterial Effects of Vanilla Ingredients Provide Novel Treatment Options for Infections with Multidrug-Resistant Bacteria – A Recent Literature Review. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* **2022**, *12* (3), 53–62. <https://doi.org/10.1556/1886.2022.00015>.
- (43) Cobos, R.; Mateos, R. M.; Álvarez-Pérez, J. M.; Olego, M. A.; Sevillano, S.; González-García, S.; Garzón-Jimeno, E.; Coque, J. J. R. Effectiveness of Natural Antifungal Compounds in Controlling Infection by Grapevine Trunk Disease Pathogens through Pruning Wounds. *Appl Environ Microbiol* **2015**, *81* (18), 6474–6483. <https://doi.org/10.1128/AEM.01818-15>.
- (44) Char, C. D.; Guerrero, S. N.; Alzamora, S. M. Mild Thermal Process Combined with Vanillin plus Citral to Help Shorten the Inactivation Time for *Listeria Innocua* in Orange Juice. *Food Bioproc Tech* **2010**, *3* (5), 752–761. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0155-x>.
- (45) Cerrutti, P.; Alzamora, S. M.; Vidales, S. L. Vanillin as an Antimicrobial for Producing Shelf-Stable Strawberry Purée. *J Food Sci* **1997**, *62* (3), 608–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04442.x>.
- (46) Char, C.; Guerrero, S.; Alzamora, S. M. Survival of *Listeria Innocua* in Thermally Processed Orange Juice as Affected by Vanillin Addition. *Food Control* **2009**, *20* (1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.004>.
- (47) García-Ríos, E.; Ruiz-Rico, M.; Guillamón, J. M.; Pérez-Esteve, É.; Barat, J. M. Improved Antimicrobial Activity of Immobilised Essential Oil Components against Representative Spoilage Wine Microorganisms. *Food Control* **2018**, *94*, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.005>.
- (48) Tsaih, M. L.; Chen, R. H. The Effect of Reaction Time and Temperature during Heterogenous Alkali Deacetylation on Degree of Deacetylation and Molecular Weight of Resulting Chitosan. *J Appl Polym Sci* **2003**, *88* (13), 2917–2923. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.11986>.
- (49) Li, P. W.; Wang, G.; Yang, Z. M.; Duan, W.; Peng, Z.; Kong, L. X.; Wang, Q. H. Development of Drug-Loaded Chitosan-Vanillin Nanoparticles and Its

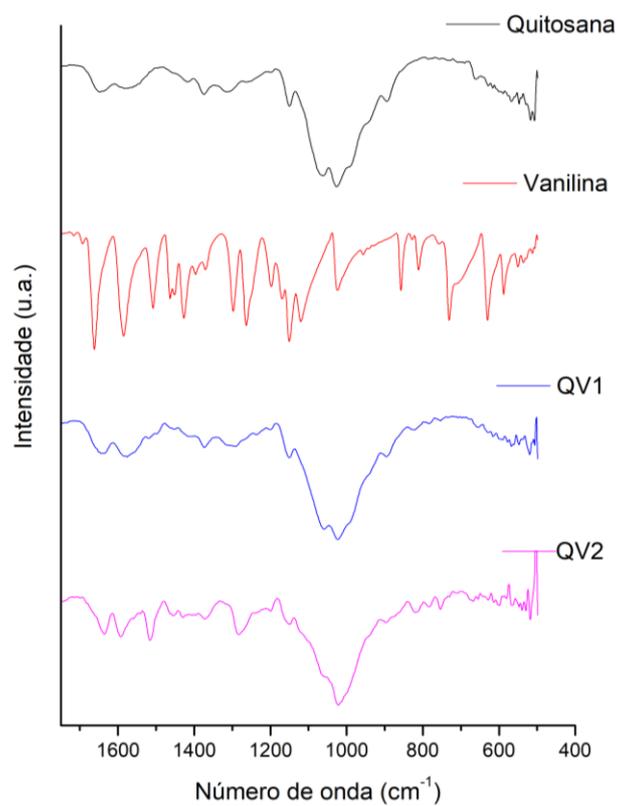
- Cytotoxicity against HT-29 Cells. *Drug Deliv* **2016**, *23* (1), 30–35.  
<https://doi.org/10.3109/10717544.2014.900590>.
- (50) Antonino, R. S. C. M. D. Q.; Fook, B. R. P. L.; Lima, V. A. D. O.; Rached, R. Í. D. F.; Lima, E. P. N.; Lima, R. J. D. S.; Covas, C. A. P.; Fook, M. V. L. Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (*Litopenaeus Vannamei* Boone). *Mar Drugs* **2017**, *15* (5).  
<https://doi.org/10.3390/md15050141>.
- (51) Kaya, M.; Baran, T.; Erdoğan, S.; Menteş, A.; Aşan Özüsallam, M.; Çakmak, Y. S. Physicochemical Comparison of Chitin and Chitosan Obtained from Larvae and Adult Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa Decemlineata*). *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2014**, *45*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.09.004>.
- (52) Rodríguez-Vázquez, M.; Vega-Ruiz, B.; Ramos-Zúñiga, R.; Saldaña-Koppel, D. A.; Quiñones-Olvera, L. F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*.  
<https://doi.org/10.1155/2015/821279>.
- (53) Ahsan, S. M.; Thomas, M.; Reddy, K. K.; Sooraparaju, S. G.; Asthana, A.; Bhatnagar, I. Chitosan as Biomaterial in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Int J Biol Macromol* **2018**, *110*, 97–109.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.140>.
- (54) Liu, H.; Peng, H.; Wu, Y.; Zhang, C.; Cai, Y.; Xu, G.; Li, Q.; Chen, X.; Ji, J.; Zhang, Y.; OuYang, H. W. The Promotion of Bone Regeneration by Nanofibrous Hydroxyapatite/Chitosan Scaffolds by Effects on Integrin-BMP/Smad Signaling Pathway in BMSCs. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4404–4417.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.02.048>.
- (55) Yoon, H. Y.; Son, S.; Lee, S. J.; You, D. G.; Yhee, J. Y.; Park, J. H.; Swierczewska, M.; Lee, S.; Kwon, I. C.; Kim, S. H.; Kim, K.; Pomper, M. G. Glycol Chitosan Nanoparticles as Specialized Cancer Therapeutic Vehicles: Sequential Delivery of Doxorubicin and Bcl-2 siRNA. *Sci Rep* **2014**, *4*.  
<https://doi.org/10.1038/SREP06878>.
- (56) Jae, H. P.; Kwon, S.; Lee, M.; Chung, H.; Kim, J. H.; Kim, Y. S.; Park, R. W.; Kim, I. S.; Sang, B. S.; Kwon, I. C.; Seo, Y. J. Self-Assembled Nanoparticles Based on Glycol Chitosan Bearing Hydrophobic Moieties as Carriers for Doxorubicin: In Vivo Biodistribution and Anti-Tumor Activity. *Biomaterials* **2006**, *27* (1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.05.028>.
- (57) Min, K. H.; Park, K.; Kim, Y. S.; Bae, S. M.; Lee, S.; Jo, H. G.; Park, R. W.; Kim, I. S.; Jeong, S. Y.; Kim, K.; Kwon, I. C. Hydrophobically Modified Glycol Chitosan Nanoparticles-Encapsulated Camptothecin Enhance the Drug Stability and Tumor Targeting in Cancer Therapy. *J Control Release* **2008**, *127* (3), 208–218. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2008.01.013>.

- (58) Maluin, F. N.; Hussein, M. Z. Chitosan-Based Agronanochemicals as a Sustainable Alternative in Crop Protection. *Molecules*. MDPI AG 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25071611>.
- (59) da Silva Porto, F. G.; Campos, Â. D.; Garcia, I. T. S. Distilled Pyrolygneous Liquor Obtained from Eucalyptus Grandis and Chitosan: Physicochemical Properties of the Solution and Films. *Environmental Science and Pollution Research* **2019**, *26* (1), 672–683. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-3590-X/FIGURES/14>.
- (60) Chauhan, N.; Dilbaghi, N.; Gopal, M.; Kumar, R.; Kim, K. H.; Kumar, S. Development of Chitosan Nanocapsules for the Controlled Release of Hexaconazole. *Int J Biol Macromol* **2017**, *97*, 616–624. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.12.059>.
- (61) Liang, W.; Yu, A.; Wang, G.; Zheng, F.; Jia, J.; Xu, H. Chitosan-Based Nanoparticles of Avermectin to Control Pine Wood Nematodes. *Int J Biol Macromol* **2018**, *112*, 258–263. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.01.174>.
- (62) Mathews, P. D.; Fernandes Patta, A. C. M.; Gonçalves, J. V.; Gama, G. D. S.; Garcia, I. T. S.; Mertins, O. Targeted Drug Delivery and Treatment of Endoparasites with Biocompatible Particles of PH-Responsive Structure. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (2), 499–510. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01630>.
- (63) Stroescu, M.; Stoica-Guzun, A.; Isopencu, G.; Jinga, S. I.; Parvulescu, O.; Dobre, T.; Vasilescu, M. Chitosan-Vanillin Composites with Antimicrobial Properties. *Food Hydrocoll* **2015**, *48*, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.008>.
- (64) Yang, Z.; Zeng, Z.; Xiao, Z.; Ji, H. Preparation and Controllable Release of Chitosan/Vanillin Microcapsules and Their Application to Cotton Fabric. *Flavour Fragr J* **2014**, *29*, 114–120. <https://doi.org/10.1002/ffj.3186>.
- (65) Zhang, Z. H.; Han, Z.; Zeng, X. A.; Xiong, X. Y.; Liu, Y. J. Enhancing Mechanical Properties of Chitosan Films via Modification with Vanillin. *Int J Biol Macromol* **2015**, *81*, 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.042>.
- (66) Zhang, Z. H.; Han, Z.; Zeng, X. A.; Xiong, X. Y.; Liu, Y. J. Enhancing Mechanical Properties of Chitosan Films via Modification with Vanillin. *Int J Biol Macromol* **2015**, *81*, 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.042>.
- (67) Arnon-Rips, H.; Cohen, Y.; Saidi, L.; Porat, R.; Poverenov, E. Covalent Linkage of Bioactive Volatiles to a Polysaccharide Support as a Potential Approach for

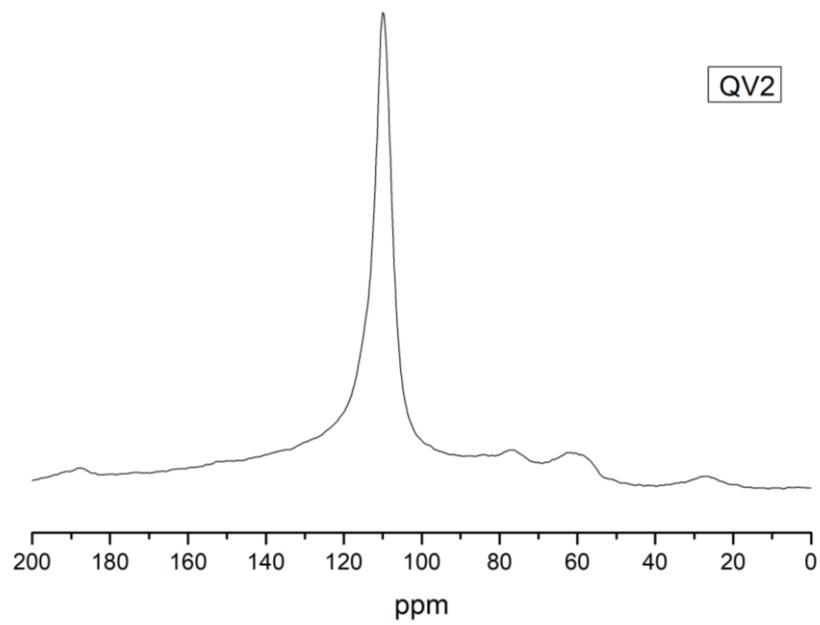
- Preparing Active Edible Coatings and Delivery Systems for Food Products. *Food Chem* **2021**, *338*, 127822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127822>.
- (68) Stroescu, M.; Stoica-Guzun, A.; Isopencu, G.; Jinga, S. I.; Parvulescu, O.; Dobre, T.; Vasilescu, M. Chitosan-Vanillin Composites with Antimicrobial Properties. *Food Hydrocoll* **2015**, *48*, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.008>.
- (69) Zou, Q.; Li, J.; Li, Y. Preparation and Characterization of Vanillin-Crosslinked Chitosan Therapeutic Bioactive Microcarriers. *Int J Biol Macromol* **2015**, *79*, 736–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.037>.
- (70) Peng, H.; Xiong, H.; Li, J.; Xie, M.; Liu, Y.; Bai, C.; Chen, L. Vanillin Cross-Linked Chitosan Microspheres for Controlled Release of Resveratrol. *Food Chem* **2010**, *121*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.085>.
- (71) Walke, S.; Srivastava, G.; Nikalje, M.; Doshi, J.; Kumar, R.; Ravetkar, S.; Doshi, P. Fabrication of Chitosan Microspheres Using Vanillin/TPP Dual Crosslinkers for Protein Antigens Encapsulation. *Carbohydr Polym* **2015**, *128*, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.020>.
- (72) Sharkawy, A.; Fernandes, I. P.; Barreiro, M. F.; Rodrigues, A. E.; Shoeib, T. Aroma-Loaded Microcapsules with Antibacterial Activity for Eco-Friendly Textile Application: Synthesis, Characterization, Release, and Green Grafting. *Ind Eng Chem Res* **2017**, *56*, 5516–5526. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00741>.
- (73) Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A. N.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M. D.; Gupta, A. A Validated <sup>1</sup>H NMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan. *J Pharm Biomed Anal* **2003**, *32* (6), 1149–1158. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00155-9).
- (74) Huggins, M. L. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *J Am Chem Soc* **1942**, *64* (11), 2716–2718. [https://doi.org/10.1021/JA01263A056/ASSET/JA01263A056.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/JA01263A056/ASSET/JA01263A056.FP.PNG_V03).
- (75) Canevarolo, S. V. *Ciência Dos Polímeros: Um Texto Básico Para Tecnólogos e Engenheiros*, 2nd ed.; 2006.
- (76) da Silva Porto, F. G.; dos Santos Vasconcelos, E.; Campos, Â. D.; Carreño, N. L. V.; Garcia, I. T. S. Chitosan in Eucalyptus Grandis Pyroligneous Liquor for Agricultural Application: Physicochemical and Structural Characterization During Storage. *J Polym Environ* **2021**, *29* (5), 1591–1599. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01980-9>.
- (77) Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, W. Determination of the Mark-Houwink Equation for Chitosans with Different Degrees of Deacetylation. *Int J Biol Macromol* **1991**, *13* (5), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90027-R).

- (78) Lefay, C.; Guillaneuf, Y.; Moreira, G.; Thevarajah, J. J.; Castignolles, P.; Ziarelli, F.; Bloch, E.; Major, M.; Charles, L.; Gaborieau, M.; Bertin, D.; Gignes, D. Heterogeneous Modification of Chitosan via Nitroxide-Mediated Polymerization. *Polym Chem* **2013**, *4* (2), 322–328.  
<https://doi.org/10.1039/C2PY20544K>.
- (79) Peña, B.; de Ménorval, L.-C.; Garcia-Valls, R.; Gumí, T. Characterization of Polysulfone and Polysulfone/Vanillin Microcapsules by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy, Solid-State <sup>13</sup>C CP/MAS–NMR Spectroscopy, and N<sub>2</sub> Adsorption–Desorption Analyses. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3* (11), 4420–4430.  
<https://doi.org/10.1021/am201092r>.
- (80) Zajac, A.; Hanuza, J.; Wandas, M.; Dymińska, L. Determination of N-Acetylation Degree in Chitosan Using Raman Spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2015**, *134*, 114–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.071>.
- (81) Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbriè, J.; Versali, M.-F.; Rinaudo, M. Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 749–751. <https://doi.org/10.1021/bm000070y>.
- (82) Duarte, M. L.; Ferreira, M. C.; Marvão, M. R.; Rocha, J. Determination of the Degree of Acetylation of Chitin Materials by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR Spectroscopy. *Int J Biol Macromol* **2001**, *28* (5), 359–363. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(01\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(01)00134-9).
- (83) Dey, K. K.; Ghosh, M. Understanding the Effect of Deacetylation on Chitin by Measuring Chemical Shift Anisotropy Tensor and Spin Lattice Relaxation Time. *Chem Phys Lett* **2020**, *738*, 136782.  
<https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2019.136782>.
- (84) Hammouda, B. Temperature Effect on the Nanostructure of SDS Micelles in Water. *J Res Natl Inst Stand Technol* **2013**, *118*, 151.  
<https://doi.org/10.6028/JRES.118.008>.

## ANEXOS



**Figura 1.** Espectros de ATR-FT-IR da quitosana, vanilina, QV1 e QV2 em estado sólido.



**Figura 2.** Espectros de MAS SS RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra QV2.