

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO
FORMADO ATRAVÉS DA REAÇÃO ENTRE O
DICLORETO DE DIFENILESTANHO E ÁCIDO
CÍTRICO E SUA ATIVIDADE FUNGICIDA**

MARCELE GABRIEL CANNATA

2008

MARCELE GABRIEL CANNATA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO FORMADO
ATRAVÉS DA REAÇÃO ENTRE O DICLORETO DE
DIFENILESTANHO E ÁCIDO CÍTRICO E SUA ATIVIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica,
para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof.Dr. Walclée de Carvalho Melo

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Cannata, Marcele Gabriel.

Síntese e caracterização do complexo formado através da reação entre o dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico e sua atividade fungicida /

Marcele Gabriel Cannata. -- Lavras : UFLA, 2008.

51 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Walclée de Carvalho Melo.

Bibliografia.

1. Organoestânico. 2. Fungicida. 3. Ácido cítrico. 4. Dicloreto de difenilestanho. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 630.24

MARCELE GABRIEL CANNATA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO FORMADO
ATRAVÉS DA REAÇÃO ENTRE O DICLORETO DE
DIFENILESTANHO E ÁCIDO CÍTRICO E SUA ATIVIDADE
FUNGICIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica,
para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 7 de março de 2008

Prof. Dr. José Danilo Ayala

UFMG

Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas

UFLA

Prof. Walclée de Carvalho Melo
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado uma nova existência para que eu pudesse cumprir mais essa etapa.

Ao meu pai, Marcos; minha mãe, Sônia; minha irmã, Francine e minha avó Emmi, por terem me dado todo o apoio emocional e financeiro para que o meu objetivo fosse atingido.

Ao meu amor, Valcimar, por toda a paciência, carinho e ajuda nos meus dias mais difíceis e também ao fruto desse amor que está em fase de geração.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade e infra-estruturas disponibilizadas.

Ao Prof. Dr. Walclée de Carvalho Melo, pela orientação e amizade.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

A minha irmã de coração Pamela, por toda a amizade, compreensão e carinho que tem me dado, em todos os momentos da minha vida.

As minhas irmãs de república, Paulize e Fabiana, pela amizade, pelo convívio harmonioso e pela ajuda.

A todos os meus colegas do Departamento de Fitopatologia, em especial a Loise e a Grazi, pela boa vontade em dividir comigo os seus conhecimentos.

Ao Marcos Vinícius e ao Alexandre, pela contribuição direta durante o trabalho.

Aos professores Teodorico, Mário, Ruy e Ludwig, pelos conhecimentos transmitidos em suas disciplinas.

À professora Celeste, pela paciência e disponibilidade para fazer as análises estatísticas.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Ruth, Eliane, Bruno, Edinho e Mirian, pelos ensinamentos sobre fungos.

Ao professor Paulo Estevão, por ter disponibilizado o Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Aos professores Matheus e José Danilo, por terem composto a banca examinadora de defesa e pelas contribuições dadas a este trabalho.

Às secretárias, Miriam e Lílian, pela boa convivência e por todas as informações e ajuda durante esse período.

A todos os meus colegas do Departamento de Química.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Estanho	3
2.2 Teoria de coordenação de Alfred Werner	3
2.3 Organometálicos	4
2.4 Organoestânicos.....	5
2.4.1 Propriedades.....	5
2.4.2 Toxicidade dos compostos organoestânicos e o meio ambiente.....	7
2.5 Ácido cítrico	9
2.5.1 Descrição e principais utilizações.....	9
2.5.2 Obtenção	11
2.5.3 Fitoextração	12
2.6 Fungos.....	12
2.6.1 Características.....	12
2.6.2 Fungicidas.....	13
2.6.2.1 Conceito.....	13
2.6.2.2 Características de um bom fungicida	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Reagentes.....	15
3.2 Síntese do complexo organoestânico carboxilado	15
3.3 Equipamentos utilizados na caracterização do complexo.....	16

3.3.1 Ponto de fusão.....	16
3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	17
3.3.3 Análise elementar de CHN	17
3.3.4 Teste de solubilidade	17
3.4 Testes de atividade biológica.....	17
3.4.1 Crescimento micelial dos fungos <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>phaseoli</i> , <i>Colletotrichum truncatum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cylindrocladium</i> , <i>Phythium</i> , <i>Ramularia</i> e <i>Rhizopus</i>	17
3.5 Análise estatística	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Caracterização do complexo	20
4.1.1 Análise do ponto de fusão.....	20
4.1.2 Análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho	20
4.1.3 Testes de solubilidade e CNH.....	26
4.2 Testes de atividades biológicas.....	26
4.2.1 Crescimento micelial do fungo <i>Alternaria alternata</i>	26
4.2.2 Crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum truncatum</i>	29
4.2.3 Crescimento micelial do fungo <i>Cylindrocladium</i>	31
4.2.4 Crescimento micelial do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .sp. <i>phaseoli</i>	33
4.2.5 Crescimento micelial do fungo <i>Phythium</i>	35
4.2.6 Crescimento micelial do fungo <i>Ramularia</i>	37
4.2.7 Crescimento micelial do fungo <i>Rhizopus</i>	39
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Fórmula estrutural do dicloreto de difenilestanho..... 6
FIGURA 2	Fórmula estrutural do ácido cítrico..... 10
FIGURA 3	Esquema de montagem do refluxo utilizado na síntese do complexo..... 16
FIGURA 4	Espectro de absorção na região do infravermelho do dicloreto de difenilestanho..... 21
FIGURA 5	Espectro de absorção na região do infravermelho do dicloreto de difenilestanho na região de 1000 a 400 cm ⁻¹ 22
FIGURA 6	Espectro de absorção na região do infravermelho do ácido cítrico..... 22
FIGURA 7	Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo sintetizado..... 23
FIGURA 8	Médias de crescimento micelial relacionada à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo <i>Alternária alternata</i> 28
FIGURA 9	<i>Alternaria alternata</i> após 9 dias de incubação (TA – testemunha; DD – Dicloreto de difenilestanho; AC – Ácido cítrico; CP – Complexo)..... 29
FIGURA 10	Médias de crescimento micelial relacionada à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo <i>Colletotrichum truncatum</i> 30
FIGURA 11	<i>Colletotrichum truncatum</i> após 12 dias de incubação (TA – testemunha; DD – Dicloreto de difenilestanho; AC – Ácido cítrico; CP – Complexo)..... 31
FIGURA 12	Médias de crescimento micelial relacionada à influência de

	diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo <i>Cylindrocladium</i>	32
FIGURA 13	<i>Cylindrocladium</i> após 9 dias de incubação (TA – testemunha; DD – Dicloreto de difenilestanho; AC – Ácido cítrico; CP – Complexo).....	33
FIGURA 14	Médias de crescimento micelial relacionada à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo <i>Fusarium oxysporum.sp.phaseoli</i>	34
FIGURA 15	<i>Fusarium oxysporum.sp.phaseoli</i> após 6 dias de incubação (TA – testemunha; DD – Dicloreto de difenilestanho; AC – Ácido cítrico; CP – Complexo).....	35
FIGURA 16	Médias de crescimento micelial relacionada à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo <i>Phythium</i>	36
FIGURA 17	<i>Phythium</i> após 3 dias de incubação (TA – testemunha; DD – Dicloreto de difenilestanho; AC – Ácido cítrico; CP – Complexo).....	37
FIGURA 18	Médias de crescimento micelial relacionada à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo <i>Ramularia</i>	38
FIGURA 19	<i>Ramularia</i> após 9 dias de incubação (TA – testemunha; DD – Dicloreto de difenilestanho; AC – Ácido cítrico; CP – Complexo).....	39
FIGURA 20	Médias de crescimento micelial relacionada à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo <i>Rhyzopus</i>	40

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Reagentes utilizados na síntese do complexo.....	15
TABELA 2 Reagentes utilizados na preparação do meio de cultura.....	15
TABELA 3 Pontos de fusão do complexo e dos reagentes utilizados na síntese.....	20
TABELA 4 Dados (cm^{-1}) dos espectros de absorção na região do infravermelho do dicloreto de difenilestanho, ácido cítrico e do complexo.....	24
TABELA 5 Resultados da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio.....	27

RESUMO

CANNATA, Marcele Gabriel. **Síntese e caracterização do complexo formado através da reação entre o dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico e sua atividade fungicida**. 2008. 51 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

Os compostos de estanho, especialmente os derivados organometálicos, têm sido utilizados para vários fins, desde biocidas até medicamentos para o tratamento do câncer. A aplicação destes compostos em agentes patogênicos que afetam a agricultura vem aumentando gradativamente, devido ao fato de serem mais efetivos e de, ao se degradarem, produzirem compostos atóxicos para o meio ambiente. Portanto, existe a necessidade de se pesquisar novos compostos para o combate destes agentes. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) sintetizar um complexo formado a partir da reação entre dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico; 2) caracterizar este complexo por espectroscopia de absorção na região do infravermelho e análise do seu ponto de fusão e 3) realizar testes *in vitro* aplicando os reagentes e o complexo sintetizado em culturas dos fungos *Fusarium oxysporum* sp. *phaseoli*, *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria alternata*, *Cylindrocladium*, *Phythium*, *Ramularia* e *Rhizopus* e verificar a influência no desenvolvimento dos mesmos. Com os resultados obtidos, verificou-se que o complexo é mais estável termicamente que o dicloreto de difenilestanho e o ácido cítrico e possuiu bandas de absorção na região do infravermelho diferentes dos reagentes de partida, o que torna provável a formação do complexo. No tocante ao teste biológico, o complexo se mostrou com pouca atividade contra os fungos, apresentando médias de crescimento e índice de velocidade de crescimento micelial próximas à da testemunha, com exceção da dose de 1000 mg L⁻¹. Isto também foi observado para o ácido cítrico. Entretanto, no tratamento realizado com o dicloreto de difenilestanho, em sua maioria, as doses de 100 e 1000 mg L⁻¹ se mostraram eficientes para a inibição do crescimento dos fungos, com exceção do *Rhizopus*, na dose de 100 mg L⁻¹, que teve um potencial de inibição maior que o dicloreto de difenilestanho.

¹ Orientador: Prof. Dr. Walclée de Carvalho Melo – UFLA (Orientador).

ABSTRACT

CANNATA, Marcele Gabriel. **Synthesis and characterization of the complex formed through the reaction between diphenyltin dichloride and citric acid and its fungicidal activity.** 2008. 51p Dissertation (Master's degree in Agroquímica) - Federal University of Lavras, Lavras, MG².

Tin-based compounds, specially the organometallic ones, have been used for a number of purposes, from biocides to medicines, useful in the cancer treatment. Application of such compounds in pathogenic agents has increased gradually, due to their effectiveness and non-toxicity after degradation. Therefore, it is of interest to search for novel actives against those agents. Thus, the goals of this work were: 1) to synthesize a complex from the reaction between diphenyltin dichloride and citric acid; 2) to characterize such complex through using infrared spectroscopy and melting point; 3) to perform *in vitro* tests by applying the reagents and the complex obtained on *Fusarium oxysporum* sp. *phaseoli*, *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria alternata*, *Cylindrocladium*, *Phythium*, *Ramularia e Rhizopus*, as well as to verify their influence on the fungi growth. The results showed that the obtained complex is thermally more stable than diphenyltin and citric acid. Also, the spectroscopic behaviour of the complex differs from the starting materials, which suggests its formation. According to the biological tests, the complex was just a few active against fungi, with growth average and index of speed of micelial growth close to witness, excepting for the 1000 mg L⁻¹ dosage. Similar behaviour was observed for the citric acid. However, an efficient inhibition was obtained for the treatment with diphenyltin dichloride, mostly at the 100 and 1000 mg L⁻¹ dosage (excepting *Rhizopus* at the 100 dosage, which presented potential of inhibition larger than the diphenyltin dichloride).

² Adviser: Prof. Dr. Walclée de Carvalho Melo – UFLA (Adviser).

1 INTRODUÇÃO

Compostos organoestânicos são substâncias que, desde 1960, têm sido utilizadas como biocidas (Ayoko & Bonine, 1995).

Os compostos organoestânicos são utilizados especialmente como estabilizantes de PVC, tintas antiincrustantes em navios e pesticidas na agricultura. Pesquisas mostraram a ação em células humanas portadoras de câncer (Ayoko & Bonine, 1995). Duas características fundamentais determinam essa variedade de aplicações: em primeiro lugar, a grande afinidade do estanho por uma base de Lewis, tal como um átomo de oxigênio, nitrogênio, fósforo ou enxofre e, em segundo, as propriedades biocidas contra bactérias, fungos, insetos, moluscos e pequenos animais. Esta última conferiu aos organoestânicos seu uso em larga escala como fungicida, em diversas culturas do setor agrícola. Alguns destes fungicidas são o resultado da complexação de compostos organoestânicos com ácidos carboxílicos (Omae, 1989). Aliás, os complexos formados destas sínteses são consideravelmente estáveis em condições normais do ambiente, o que torna importante a relação de estudos relacionados a estes compostos que possuam atividade antifúngica.

Outro ponto a ser considerado é que, embora o estanho seja considerado um metal pesado, a vantagem do uso destes compostos como pesticida é a sua degradação em dióxido de estanho (SnO_2), um composto insolúvel em pH fisiológico, que o torna atóxico para o meio ambiente, ao contrário do que ocorre com biocidas cúpricos, mercuriais ou fosfóricos (Araújo, 2002).

Fungos fitopatogênicos são responsáveis por cerca de 90% das doenças em plantas, causando prejuízos à agricultura brasileira, o que leva à necessidade, na maioria dos casos, do uso de fungicidas à base de estanho (Teixeira, 2007).

Portanto, é importante a realização de pesquisa e identificação de produtos e substâncias que exerçam ação biocida contra fungos fitopatógenos.

O presente trabalho teve como objetivos sintetizar o complexo formado a partir da reação entre o dicloreto de difenilestanho e o ácido cítrico e caracterizar o composto obtido por análises de espectroscopia na região do infravermelho e ponto de fusão. Além disso, realizaram-se testes *in vitro* para avaliar o potencial fúngico, aplicando-se o complexo preparado e os reagentes de partida em culturas de diversos fungos, sendo eles *Fusarium oxysporum* sp. *phaseoli*, *Colletotrichum truncatun*, *Alternaria alternata*, *Cylindrocladium*, *Phythium*, *Ramularia* e *Rhizopus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estanho

O estanho é o 48º elemento, em abundância, na crosta terrestre. Seus compostos são conhecidos e utilizados pela humanidade desde a Antigüidade (Filgueiras, 1998).

Compostos de estanho apresentam uma química singular, do ponto de vista do número de coordenação, que pode variar de dois a sete. Seus compostos apresentam várias aplicações tecnológicas, tais como estabilizantes de polímeros, agentes biocidas, catalisadores em diversas reações e como agentes antitumorais (Lima, 1999).

2.2 Teoria de coordenação de Alfred Werner

Em 1905, com apenas 24 anos, Werner escreveu uma obra traduzida como "Uma nova concepção da Química Inorgânica", que fez renascer a química dos elementos metálicos, que deu início à estereoquímica moderna. Por isso, Werner é considerado o pai da química inorgânica (Shibata, 1967).

Em 1913, ano em que recebeu o prêmio de Nobel de química, estava sofrendo já de arteriosclerose.

Ao contrário das outras áreas, na história da Química, a inorgânica somente ganhou definição como tal há pouco mais de um século, como sendo a química voltada para a crescente classe de compostos não-orgânicos. Curiosamente, após o enorme impacto da teoria de coordenação a química inorgânica passou por um período de menor atividade, que se estendeu até por volta de 1940 (Ilde, 1966).

Entretanto, de forma paradoxal, esse foi o período de maior renovação conceitual na história da ciência moderna, marcado pelo surgimento das teorias

quânticas. Apesar da força do modelo estereoquímico de coordenação, introduzido por Werner desde o final do século XIX, a química inorgânica ainda não permitia um tratamento sistemático, a exemplo da química dos compostos orgânicos e muito menos exibía a lógica conceitual encontrada na físico-química.

Dessa forma, os químicos inorgânicos, ao se ocuparem principalmente com a preparação e a caracterização de diferentes compostos, acabaram gerando conhecimentos esparsos, embora importantes, porém, ainda carentes de uma visão lógica ou sistemática mais desenvolvida. Por outro lado, sínteses, preparações e análises são processos interligados e isso, provavelmente, explica o forte cunho analítico associado à área de química inorgânica, até a metade do século passado. Aos poucos, os modelos quânticos de ligação, como os introduzidos por H. Bethe (Teoria do Campo Cristalino), em 1929 e R. S. Mülliken (Teoria dos Orbitais Moleculares), em 1932, foram sendo assimilados pelos químicos inorgânicos. Os químicos aprenderam, com Linus Pauling, como os átomos se expressam por meio das ligações. Além da estereoquímica, o conhecimento das ligações dava um novo impulso ao estudo da química inorgânica (Pauling, 1940).

Nesta série de experiências, complexos de cobalto (III) foram preparados e algumas das propriedades de Werner puderam ser utilizadas e serviram para interpretar as moléculas usando o modelo octaédrico que inclui o óptico, o geométrico e o isomerismo de acoplamento (Greenaway & Lancashire, 1982).

2.3 Organometálicos

Após Werner, todavia, a química inorgânica só veio a ter um novo florescimento de grande magnitude a partir da Segunda Guerra Mundial. Isso pode ser percebido pelo fato de a concessão seguinte de um prêmio Nobel em química inorgânica só ter ocorrido em 1973, para Wilkinson e Fischer, por seu

trabalho pioneiro em organometálicos. Estes pesquisadores desenvolveram pesquisas independentes em poluentes expelidos por automóveis, também chamados *sandwich compounds* (compostos sanduíches), revolucionando a química dos metais de transição (James, 1995).

2.4 Organoestânicos

2.4.1 Propriedades

A partir de 1925, com a primeira patente para um composto organoestânico, a química desta classe de substâncias passou a ser alvo de atenção pelo variado campo de aplicações (Luijten, 1972).

Na área tecnológica, compostos organoestânicos são usados como estabilizantes do PVC (cloreto de polivinila) e de outros polímeros vinílicos, diante da ação da luz e do calor, além de serem empregados em processos de tratamento de água e na preservação de produtos têxteis e de madeira. Eles ainda podem atuar como catalisadores na produção de espumas poliuretânicas, em reações de esterificação ou de transesterificação, na produção de silicones e na polimerização de olefinas (Poller, 1970).

Os derivados organometálicos de Sn(IV) são mais numerosos que os de estanho(II). Isto se deve, principalmente, à sensibilidade de compostos de Sn(II) frente ao ar e umidade. Esta maior sensibilidade está relacionada com a facilidade de o Sn(II) em ser oxidado a Sn(IV) pela ação do O₂ ou hidrolisado na presença de umidade (Lima, 1999). Apresentam também considerável atividade biológica. Alguns desses compostos são muito tóxicos, mesmo em pequenas concentrações. A atividade biológica está relacionada ao número e à natureza dos grupos orgânicos ligados ao átomo central de estanho. A natureza dos grupos aniônicos é de importância secundária, exceto se o íon for muito tóxico. Nesse caso, a atividade biológica do organoestânico pode ser aumentada. O

ânion ligado ao estanho é, geralmente, cloreto, fluoreto, óxido, hidróxido, carboxilato e tiolato (Pellerito & Nagy, 2002).

O efeito biocida dos compostos organoestânicos de fórmula geral R_nSnX_{4-n} está diretamente ligado ao número n e à natureza dos grupos substituintes R e X. Os organoestânicos com n igual a três possuem o maior efeito biológico e são os mais usados comercialmente. Entretanto, compostos nos quais o grupo R é um radical alquila, como metil, propil ou n-butil, não são utilizados como fungicidas ou acaricidas, em parte devido à sua elevada fitotoxicidade e ao fato de apresentarem atividade biológica em mamíferos (Blunden & Evans, 1990).

Compostos derivados de difenilestanho(IV) (Figura 1) são muito utilizados como agentes fungicidas patogênicos e fitopatogênicos (Araújo, 2002; Costa, 2004; Teixeira, 2007).

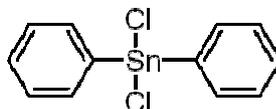


FIGURA 1 Fórmula estrutural do dicloreto de difenilestanho.

A possível causa da toxicidade dos organoestânicos é a alta afinidade do estanho por grupos mercaptanos em enzimas bloqueando, então, o sítio ativo. Além disso, os átomos de enxofre tiólico e os átomos de nitrogênio heterocíclico em hemoglobinas de mamíferos são conhecidos por coordenarem com centros estânicos (Schmiedgen, 1994).

Os compostos podem apresentar aspectos estruturais variados, como números de coordenação variando de quatro a seis, os ligantes carboxilatos

coordenados de forma uni- e bidentada, participação ou não da carboxila na coordenação ao átomo de estanho e formação de complexos com dois sítios estânicos suportados por átomos de cloro em ponte (Barbiere et al., 2003).

Na medicina, os compostos organoestânicos, principalmente os diorganoestânicos, vêm ganhando destaque devido à sua ação em células humanas portadoras de câncer.

Os primeiros registros de estudos sobre as atividades antitumorais dos compostos organoestânicos foram divulgados em 1980 e, desde então, centenas de compostos têm sido testados para a verificação dos seus efeitos sobre sistemas biológicos (Crowe, 1984).

Mais recentemente, Jan e colaboradores (2002) vêm estudando os efeitos de compostos trialkilestânicos em Ca^{2+} em células cancerígenas da próstata. Foi verificado também que compostos de estanho foram eficazes contra leucemia linfocítica, sendo os derivados diorganoestânicos mais ativos que os triorganoestânicos (Dias, 2005).

2.4.2 Toxicidade dos compostos organoestânicos e o meio ambiente

A toxicidade dos compostos organoestânicos varia de acordo com o número e a natureza dos grupos orgânicos e, geralmente, diminui na seguinte ordem: $\text{R}_3\text{SnX} > \text{R}_2\text{SnX}_2 > \text{RSnX}_3$. Os tetraorganoestânicos, R_4Sn , apresentam baixa toxicidade (White et al., 1999). Quando R é uma cadeia alquílica muito curta, todos esses compostos são tóxicos para os mamíferos; a toxicidade máxima ocorre quando R é o grupo etila, C_2H_5 e diminui progressivamente com o aumento da cadeia carbônica (Baird, 2002).

Para o caso dos fungos, a atividade tóxica máxima ocorre quando cada cadeia hidrocarbônica possui quatro carbonos formando uma cadeia não-ramificada, isto é, quando R é o grupo n-butílica, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (Baird, 2002).

A proliferação do uso de organoestânicos, contudo, tem causado problemas ecológicos significativos nos últimos anos. Os mais importantes desses problemas estão relacionados ao uso generalizado desses compostos em cascos de embarcações. Dois tipos principais de películas protetoras foram utilizadas, desde 1967, para prevenir o crescimento de colônias de moluscos. A primeira dessas películas consiste num copolímero de acrilato e metacrilato de tributilestanho, que sofre hidrólise pela água do mar, liberando lentamente a espécie tributilestanho, especialmente tóxica a animais marinhos (International, 1987). À medida que o barco navega, a liberação de camadas sucessivas do polímero torna a superfície "autopolidora", garantindo sempre a liberação de mais material tóxico e mantendo o casco livre da aderência de animais, o que retardaria o deslocamento da embarcação, obrigando ao consumo de mais combustível, ou seja, a incrustação de 10 µm no casco de um navio pode significar um aumento de 0,3% a 1% no consumo de combustível (Champ & Lowestein, 1987). O segundo tipo de película usado nesta situação foi introduzido na década de 1980 e consiste numa espécie triorganoestânica ancorada a um polissiloxano, formando uma estrutura tridimensional rígida, mais resistente que aquela do tipo anterior (International Tin Research Institute, 1987).

A preocupação a respeito do impacto ambiental causado pela utilização de tintas antiincrustantes à base de organoestânicos surgiu no início dos anos 1980, quando ficou claro que os organismos que aderem aos cascos dos navios não eram as únicas vítimas, ou seja, outros animais e plantas eram expostos. Um exemplo foi o desenvolvimento de conchas anormalmente finas em ostras presentes em águas contaminadas com os agentes antiincrustantes.

Além dos efeitos observados nas culturas de ostras, vários estudos demonstraram os efeitos tóxicos dos compostos organoestânicos em outras espécies marinhas, como moluscos, algas e zooplânctons, sob concentrações de

poucos nanogramas por litro. Entre os mais significativos, estão os efeitos do tributilestanho sobre a reprodução de ostras e neogastrópodes e indicam que o composto está entre os mais tóxicos já introduzidos propositalmente no ambiente aquático (Fent, 1996).

Em 1981, o surgimento de órgãos sexuais masculinos em fêmeas de caramujos (*Nassarius obsoletus*) foi relacionado à contaminação por tributilestanho. Esse fenômeno foi chamado de "imposex" ou "pseudo-hermafroditismo". O grau de desenvolvimento do pênis e a frequência do "imposex" foram relacionados aos níveis de tributilestanho e foram mais intensos próximos de portos e marinas. Estudos de campo feitos posteriormente confirmaram a relação entre o "imposex" nos caramujos (*Ilyanassa obsoleta*) e o tributilestanho (Fent, 1996).

Várias pesquisas têm sido feitas com o objetivo de se avaliar os efeitos dos organoestênicos nos organismos vivos. Estudos com algas mostram que o tipo de resposta depende da espécie e da dose do composto, mas essa resposta, geralmente, envolve taxas de crescimento e de fotossíntese reduzidas e até a morte das células (Marsot et al., 1995).

2.5 Ácido cítrico

2.5.1 Descrição e principais utilizações

O ácido cítrico (Figura 2) foi descrito, pela primeira vez, em 1784, pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele que, em 1773, o isolou do suco de limão (Mattey, 1992).

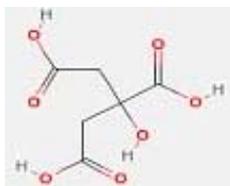


FIGURA 2 Fórmula estrutural do ácido cítrico

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico) é de grande interesse para as indústrias farmacêuticas e alimentícias, pois suas características de sabor agradável, baixa toxicidade e fácil assimilação permitem muitas aplicações (Grewal & Kalra, 1995). Devido a estas características, é amplamente utilizado na indústria alimentícia como acidulante, agente para intensificar o sabor, antioxidante para inibir o ranço em óleos e gorduras, como agente tamponante em geléias e gelatinas, e como estabilizante (Demain, 2000a).

Quimicamente, o ácido cítrico compartilha as características de outros ácidos carboxílicos. Quando aquecido a acima de 175°C, se decompõem, produzindo dióxido de carbono e água.

De acordo com Grahan & Lund (1986), o efeito antibacteriano do ácido cítrico está associado não somente à sua ação acidulante, mas também à sua atividade quelante de íons Ca^{2+} .

Com uma produção anual em torno de 400 mil toneladas e um valor de mercado estimado em 1,4 bilhão de dólares (Demain, 2000b), o ácido cítrico é o segundo maior produto biotecnológico, em termos de volume de produção, perdendo apenas para o etanol (Wilke, 1999).

Aproximadamente 70% do ácido cítrico produzido é utilizado na indústria de alimentos e bebidas para vários fins; 12% é empregado na indústria farmacêutica e 18%, em outras indústrias (Marison, 1988).

É utilizado na indústria de alimentos para estimular o aroma natural de frutas, na fabricação de bebidas (refrigerantes), para prevenir a cristalização da sacarose em balas, para agir como estabilizante em sucos, como emulsificante em sorvetes e para evitar o escurecimento de alguns vinhos brancos. Na indústria farmacêutica, é empregado no preparo de sais efervescentes, como antioxidante, tampão, acidificador, utilizado em xampus e loções. Também pode ser adicionado a produtos de limpeza como detergentes biodegradáveis, limpadores e polidores de aço inoxidável e outros metais (Mattey, 1992), além de outras em que o íon citrato propicia a formação de uma variedade de moléculas complexas que possuem a capacidade de seqüestrar e inativar íons metabólicos. Devido a isso, controla efeitos indesejáveis numa reação, que poderiam ocasionar alterações de cor, aparência, estabilidade, etc., prejudicando o produto final (Cabello, 1991).

2.5.2 Obtenção

Este ácido foi inicialmente produzido em escala comercial, na Itália, em 1860, por meio de extração e da purificação a partir de frutas cítricas. Por muitos anos, a Itália manteve o monopólio da produção de ácido cítrico, cobrando preços elevados. Este monopólio foi quebrado quando o processo microbiológico utilizando o fungo *Aspergillus niger* foi desenvolvido, resultando em queda acentuada nos preços. Hoje em dia, virtualmente, todo o ácido cítrico disponibilizado no mercado é produzido por fermentação (Brock et al., 1994).

Os fungos produzem grande variedade de ácidos orgânicos. Muitos deles são produzidos em larga escala em processos industriais, como ácido cítrico, ácido glucônico e ácido itacônico, entre outros (Bigelis & Arora, 1992).

Existem muitos fungos produtores de ácido cítrico. Entre eles, *Penicillium citrinum*, *Mucor piriformis*, *Ustilina vulgaris*, *Penicillium luteum* e

Aspergillus clavatus. São de interesse industrial as espécies que permitem altos rendimentos de produção de ácido cítrico (Lima et al, 1975).

Atualmente, o ácido cítrico é quase que exclusivamente obtido por meio de processos de biossíntese (fermentação da sacarose), utilizando, como agente biológico, o fungo imperfeito *Aspergillus niger* (Leonel & Cerada, 1995).

2.5.3 Fitoextração

Ácidos orgânicos naturais de baixa massa molecular, como os exsudados pelas raízes das plantas, influenciam a solubilidade de metais pesados e a sua absorção, mediante a formação de complexos metálicos e têm sido estudados pela fitoextração (Turgut et al., 2004; Quartacci et al., 2005). Esses ácidos orgânicos apresentam a vantagem de serem mais rapidamente degradados no solo que os quelantes sintéticos, evitando a contaminação de lençóis freáticos. No entanto, sua eficiência na fitoextração de metais tem sido, geralmente, menor que a obtida pelo uso de quelantes sintéticos.

Os ácidos orgânicos naturais não apresentam resultado significativo para a remoção do Pb e Zn do solo pelas plantas. Apenas o ácido cítrico é eficiente na remoção do Cu do solo, mostrando ser um bom agente quelante para fitoextração (Nascimento et al., 2006).

2.6 Fungos

2.6.1 Características

Os fungos constituem um grupo de organismos em que não ocorre clorofila (são heterótrofos). São, geralmente, filamentosos e multicelulares. O crescimento é, em geral, apical, mas, normalmente, qualquer fragmento hifálico pode dar origem à outra formação micelial, quando destacado e colocado em meio apropriado. As estruturas reprodutivas são diferenciadas das vegetativas, o que constitui a base sistemática dos fungos (Putzke & Putzke, 1998). Alguns

podem ser microscópicos em tamanho, enquanto outros são muito maiores, como os cogumelos e os fungos, que crescem em madeira úmida ou no solo. Formam esporos, que são dispersos por correntes de ar (Pelczar et al., 1996), encontrando-se no solo, na água, nos vegetais, em animais, no homem e em detritos em geral (Trabulsi & Toledo, 1996).

2.6.2 Fungicidas

Dentre os defensivos agrícolas utilizados no controle de doenças, os fungicidas destacam-se como os mais utilizados, provavelmente, devido ao maior número de doenças causadas por fungos em relação aos demais organismos.

2.6.2.1 Conceito

Os fungicidas são definidos como substâncias químicas capazes de prevenir a infecção de tecidos vegetais por fungos fitopatogênicos ou, mesmo, de erradicá-los. Podem também ser empregados no controle de doenças causadas por bactérias e algas.

2.6.2.2 Características de um bom fungicida

Segundo Zambolim (1999), essas características são, geralmente, aplicadas aos protetores de folhagem, classe na qual se encaixam os organoestânicos. São elas:

- a) fungitoxicidade: deve ser tóxico ao patógeno em pequenas concentrações (abaixo de 10 mg L^{-1});
- b) especificidade: alguns fungicidas são específicos, outros são gerais ou de amplo espectro;
- c) deposição e distribuição: deve depositar e distribuir uniformemente na superfície da folhagem, solubilizando-se lentamente;

d) aderência e cobertura: deve aderir à superfície da folhagem e cobri-la para uma perfeita proteção. Quando as folhas possuem pêlos ou cera que repelem a água, deve-se usar um espalhante adesivo;

e) tenacidade: ser resistente às intempéries, como chuvas, ventos, radiação solar, etc.

f) não deve ser fitotóxico: ser tóxico apenas ao fungo e não à planta;

g) não deve ser tóxico ao homem e aos animais;

h) compatibilidade: ser compatível com outros fungicidas, inseticidas ou herbicidas, para maior economia nas aplicações;

i) economicidade: baixo custo ou custo que compense sua aplicação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os reagentes usados na síntese do complexo e na preparação do meio de cultura com suas respectivas fórmulas químicas e fabricantes estão listados nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 Reagentes utilizados na síntese do complexo.

Composto	Fórmula	Fabricante
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	ProQuimios
Dicloreto de difenilestanho	$(C_6H_5)_2SnCl_2$	Aldrich
Acetonitrila	CH_3CN	Merck

TABELA 2 Reagentes utilizados na preparação do meio de cultura.

Composto	Fórmula	Fabricante
Dextrose	$C_6H_{12}O_6$	CAAL
Ágar		Galena
Cloranfenicol (antibiótico quemisetina)	$C_{11}H_{12}N_2O_5Cl_2$	Schering-Plough Veterinária

3.2 Síntese do complexo organoestânico carboxilado

Num balão de fundo redondo de 500 mL foram dissolvidos, durante aquecimento, 499,5mg (2,60 mmol) de ácido cítrico [$C_6H_8O_7$], em 30mL de

acetonitrila e adicionados 894,0mg (2,60 mmol) de dicloreto de difenilestanho $[\text{Sn}(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$. A mistura reacional foi submetida a refluxo, por 24 horas, a 81°-82°C e sob agitação magnética, como está representado na Figura 3. Após o refluxo, a mistura foi deixada em repouso, à temperatura ambiente, até sua completa decantação. O complexo foi separado por meio da retirada do sobrenadante e colocado em estufa, a 60°C, por volta de 30 minutos. O sólido foi guardado em vidros com tampa.

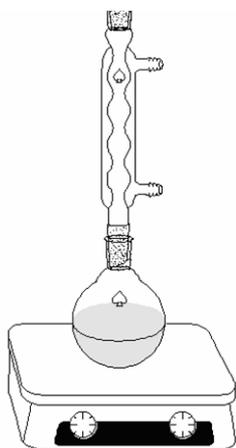


FIGURA 3 Esquema de montagem do refluxo utilizado na síntese do complexo.

3.3 Equipamentos utilizados na caracterização do complexo

3.3.1 Ponto de fusão

Para a determinação do ponto de fusão do complexo formado e dos reagentes, foi utilizado o equipamento Büchi, modelo 535, do Laboratório de Química Orgânica, no Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A caracterização do complexo pela espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada no Centro de Análise e Prospecção Química do DQI/UFLA, empregando-se o espectrômetro FTS 3000 Excalibur Digilab, com transformada de Fourier (resolução 8 cm⁻¹ e 16 scans), utilizando-se a técnica de pastilha com brometo de potássio (KBr).

3.3.3 Análise elementar de CHN

Realizada no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando-se um equipamento Elemental Analyzer, da Perkin Elmer série PE 2400 CHN.

3.3.4 Teste de solubilidade

Foram testados vários solventes, a fim de verificar a solubilidade do complexo para os testes biológicos. Dentre eles estão: metanol, diclorometano, diclorohexano, acetato de etila, água, álcool etílico, acetona, clorofórmio, éter de petróleo, éter etílico, propanol e hexano.

3.4 Testes de atividade biológica

3.4.1 Crescimento micelial dos fungos *Fusarium oxysporum* sp. *phaseoli*, *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria alternata*, *Cylindrocladium*, *Phythium*, *Ramularia* e *Rhizopus*

No Laboratório de Diagnóstico e Controle de Enfermidades do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFLA, foram realizados testes *in vitro* para avaliar o potencial fungicida dos reagentes e do complexo obtido sobre cultura dos fungos.

Os inóculos para a realização dos testes foram obtidos de cultura pura, mantidos em meio BDA (batata, dextrose e ágar), para os fungos *Fusarium*

oxysporum sp. *phaseoli*, *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria alternata*, *Cylindrocladium* e *Ramularia* e CA (cenoura e ágar), para o fungo *Phythium* ou AA (água e ágar), para o fungo *Rhizopus*, à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, para todos os fungos.

Foram utilizadas placas de Petri de, aproximadamente, 9 cm de diâmetro com os produtos a serem testados, dicloreto de difenilestanho, ácido cítrico e o complexo obtido na síntese, nas concentrações de 0 (testemunha), 10, 100, 1.000 mg L^{-1} , em quatro repetições. Cada repetição foi constituída de uma placa de 9 cm de diâmetro, com 25 mL de meio de cultura, na qual foi feito o semeio do fungo, utilizando-se um disco de micélio de 9 mm de diâmetro. Os compostos foram incorporados diretamente no meio de cultura fundente, sem a necessidade de solubilizá-los previamente.

Estas placas foram mantidas em câmara de ambiente, para germinação, durante o período necessário para que as placas fossem preenchidas pelos fungos, à temperatura programada de, aproximadamente, 24°C , com fotoperíodo de 12 horas.

Para se obter os valores de crescimento micelial, traçaram-se duas retas, na placa de Petri, que passavam pelo centro do disco de 9 mm, sendo uma perpendicular à outra. Mediu-se o diâmetro de crescimento da colônia utilizando-se uma régua graduada em milímetros (mm).

Na análise estatística, utilizou-se a média dos diâmetros, para que fossem feitos os cálculos do crescimento micelial.

3.5 Análise estatística

A análise estatística experimental utilizada foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial $(3 \times 4) \times 4$, sendo 3 compostos (ácido cítrico, dicloreto de difenilestanho e complexo), 4 doses (testemunha, 10 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} e 1.000 mg L^{-1}) e 4 repetições.

Os resultados obtidos foram processados no software estatístico Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do complexo

4.1.1 Análise do ponto de fusão

O complexo obtido e os reagentes foram submetidos a aquecimento lento, para a determinação de seus pontos de fusão. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 Pontos de fusão do complexo e dos reagentes utilizados na síntese.

Compostos	Pontos de fusão (°C)
	Experimentais
Dicloreto de difenilestanho	40-42
Ácido cítrico	156-158
Complexo	190d

d = decomposição

Durante o aquecimento, o complexo sofreu decomposição à temperatura de 190°C, o que não possibilitou determinar seu ponto de fusão.

Como o ponto de decomposição do composto obtido foi maior que o ponto de fusão dos reagentes de partida, pode-se apontar uma possível coordenação do ácido cítrico com o dicloreto de difenilestanho.

4.1.2 Análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho obtidos do dicloreto de difenilestanho, do ácido cítrico e do complexo sintetizado são apresentados nas Figuras 4, 5, 6 e 7, respectivamente e na Tabela 4.

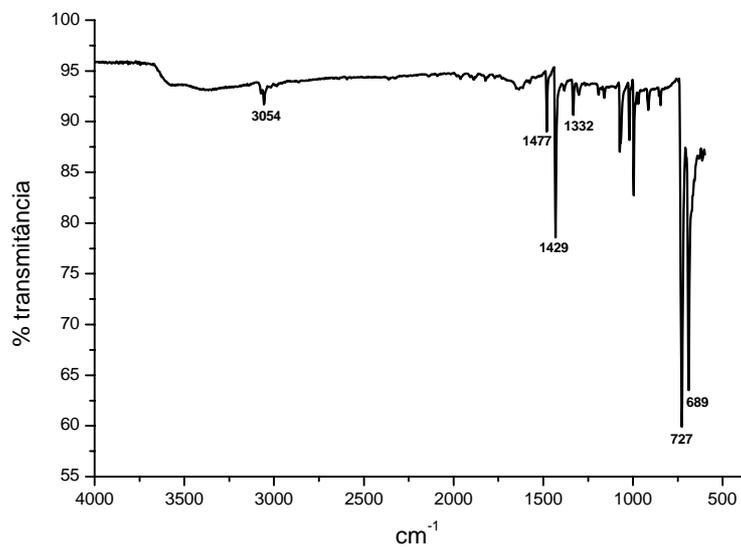


FIGURA 4 Espectro de absorção na região do infravermelho do dicloreto de difenilestanho em ATR.

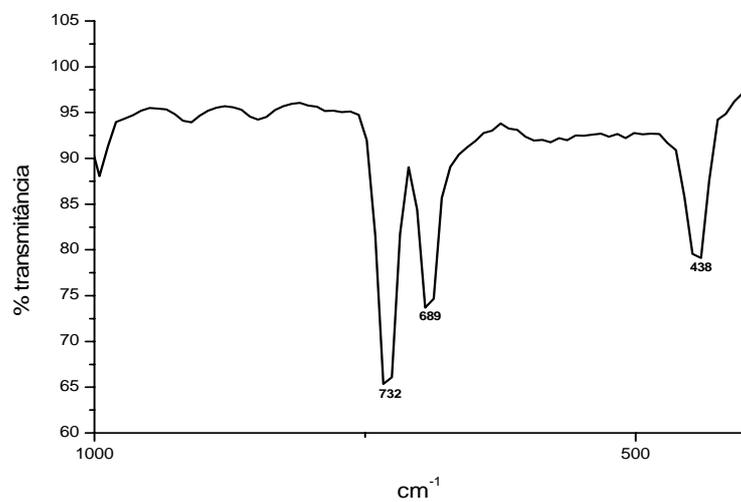


FIGURA 5 Espectro de infravermelho do dicloreto de difenilestanho na região de 1.000 a 400 cm⁻¹, em pastilha de KBr.

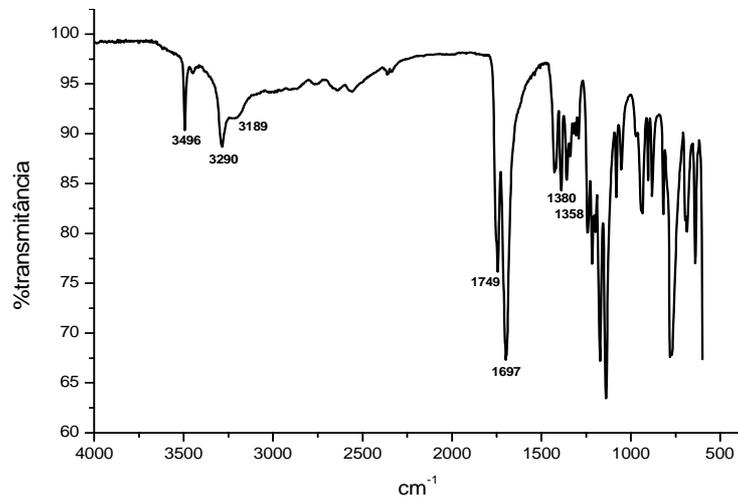


FIGURA 6 Espectro de absorção na região do infravermelho do ácido cítrico em ATR.

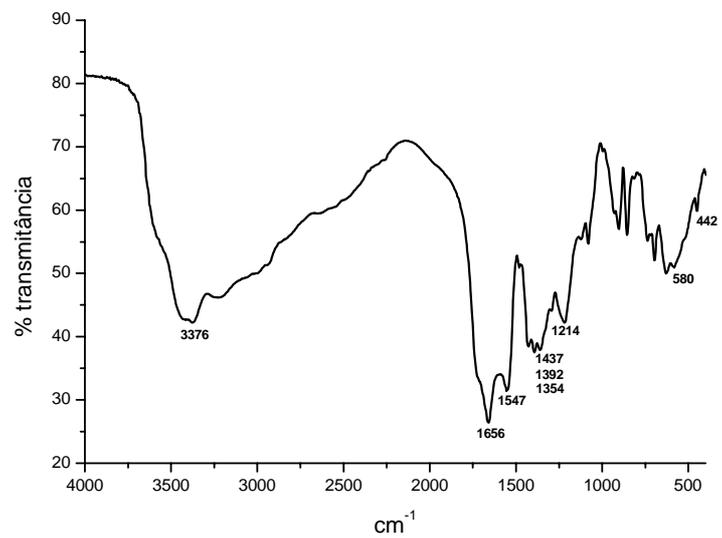


FIGURA 7 Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo sintetizado em pastilhas de KBr.

TABELA 4 Dados (cm^{-1}) dos espectros de absorção na região do infravermelho do dicloreto de difenilestanho, ácido cítrico e do complexo.

	Dicloreto de difenilestanho	Ácido cítrico	Complexo
$\nu\text{C-H}_{(\text{arom.})}$	3054	—	3054*
νOH	—	3496	3376
$\nu\text{C-H}_{(\text{alif.})}$	—	3290	3376*
		3189	
$\nu_a\text{COO}$	—	1749	1656
		1697	1547
$\nu\text{C=C}_{(\text{arom.})}$	1477		1437
	1429	—	1392
	1332		1354
$\nu\text{C=C}_{(\text{arom.})}$			1437
+	—	—	1392
$\nu_s\text{COO}$			1354
$\nu_s\text{COO}$		1380	1437
	—	1358	1392
			1354
$\delta\text{C-H}_{(\text{arom.})}$	727	—	—
	698		
$\nu\text{Sn-O}$		—	580
$\nu\text{Sn-C}$	438	—	442

*Sobreposição da banda ν_{OH} .

De acordo com os espectros de absorção na região do infravermelho, observou-se um deslocamento das bandas referentes ao estiramento da ligação C=O do grupo carboxila, em 1.749 e 1.697 cm^{-1} , na molécula de ácido cítrico (Figura 6), para uma região de número de onda mais baixa, em 1.656 e 1.547 cm^{-1} , no complexo (Figura 7), o que possibilita inferir que houve a coordenação do ácido cítrico por meio do grupo carboxila com o estanho. Este deslocamento para uma região de número de onda mais baixa pode ser explicado pela transferência de densidade de carga do ácido para o estanho, diminuindo, assim, a força de ligação do oxigênio-carbono deste grupo. Ocorre o aparecimento de duas bandas de estiramento assimétrico da ligação C=O (ν_s C=O) do grupo carboxila do ácido cítrico (Figura 6).

Para o complexo, as bandas de estiramento na região de 1.437, 1.392 e 1.354 cm^{-1} correspondem à sobreposição das bandas de estiramento simétrico COO (ν_s COO) do ácido cítrico (1380 e 1358 cm^{-1}) com as bandas de estiramento C=C (ν_s C=C) do dicloreto de difenilestanho (1.477, 1.429 e 1.332 cm^{-1}) (Silverstein et al., 1991).

Essas observações, segundo Bolard (1965), são consideradas uma possível coordenação do grupo carboxílico, do ácido cítrico, ao metal estanho na formação do complexo.

Observa-se um alargamento da banda na região de 3.496 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos da hidroxila alcoólica no ácido livre e da ligação O-H do grupo carboxila em relação ao espectro do ácido cítrico, evidenciando sua participação na coordenação ao estanho, de forma protonada (Larsen & Homeir, 1972).

Analisando o espectro referente ao dicloreto de difenilestanho, observam-se duas bandas intensas em 689 cm^{-1} e 727 cm^{-1} . Elas correspondem à deformação da ligação C-H no anel aromático. Em outra região do espectro, de mais alta frequência, na região de 1.969 a 1.823 cm^{-1} , encontram-se pequenas bandas que se assemelham a ruídos, mas, na verdade, se referem aos *overtones*

das ligações C-H do anel aromático. Esses *overtones* são bandas fracas de combinação e o aspecto dessas bandas nesta região é característico do padrão de substituição do anel, neste caso, um anel monossustituído. No espectro do complexo, os *overtones* não aparecem devido à banda do grupo carboxila em 1.656 cm^{-1} .

No complexo, foi observada uma banda em 580 cm^{-1} , que não aparece nos espectros de absorção na região do infravermelho dos reagentes que formam o complexo. Segundo Ferrano (1971), esta banda se refere ao estiramento simétrico da ligação Sn-O, que confirma a coordenação do estanho ao ácido cítrico. Um detalhe importante é o fato de esta banda se sobrepor às bandas correspondentes às frequências de deformação da ligação C-H. Isso ocorre, provavelmente, pelo efeito quelante do ácido cítrico quando há a coordenação com o estanho.

De acordo com Socrates (1980), bandas na faixa de 3080-3010 correspondem ao C-H aromático. No espectro do dicloreto de difenilestanho, observa-se uma banda de 3.054 cm^{-1} . Esta não aparece no complexo, pois é sobreposta pela banda de estiramento da ligação OH (νOH). Essa mesma banda OH também se sobrepõe à de C-H alifático na faixa de 3.376 cm^{-1} do complexo.

Temos também um deslocamento da ligação Sn-C que, no dicloreto de difenilestanho, está na faixa de 438 cm^{-1} e, no complexo, continua na frequência de 442 cm^{-1} (Willis et al., 1991).

De acordo com Terra et al. (1998), provavelmente, alguns átomos de cloro ainda permanecem coordenados ao complexo preparado, pois o meio ácido, durante a reação, dificulta a substituição total dos cloretos do reagente de partida, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{SnCl}_2$.

4.1.3 Testes de solubilidade e CNH

Os resultados mostraram que, dentre os solventes utilizados, o complexo é insolúvel em todos eles.

Realizou-se a análise de CHN para definir a estequiometria da reação entre o dicloreto de difenilestanho e o ácido cítrico, mas não foram obtidos resultados satisfatórios, os quais estão demonstrados na Tabela 5.

TABELA 5 Resultados da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

	1ª análise	2ª análise	Teórico
% C	14,46	14,36	46,75
% H	2,14	2,02	3,46
% N	0,82	0,86	0

De acordo com os resultados de solubilidade e de CHN, pode-se supor que esteja havendo uma polimerização do complexo, o que dificulta prever sua provável estrutura.

4.2 Testes de atividades biológicas

4.2.1 Crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata*

Na Figura 8 e na Tabela 1A está representada a correlação do experimento realizado com os compostos de partida (dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico) e o complexo sobre o fungo *Alternaria alternata*. Estes dados foram obtidos após um período de incubação de 9 dias, utilizando BDA como meio de cultura (Figura 9).

De acordo com os dados, é possível concluir que as menores médias de crescimento micelial foram aquelas obtidas quando se utilizou o dicloreto de

difenilestanho. Destas, a mais eficaz foi a obtida com a concentração de 1.000 mg L⁻¹.

Para a dose de 10 mg L⁻¹, o dicloreto de difenilestanho e o ácido cítrico são estatisticamente iguais.

Por sua vez, o ácido cítrico e o complexo são equivalentes na dose de 100 mg L⁻¹, sendo o dicloreto o composto mais eficiente.

O ácido cítrico, nas doses de 10 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ e o complexo, nas doses de 10 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ e 1.000 mg L⁻¹, apresentaram crescimento micelial maior que o da testemunha (0 mg L⁻¹).

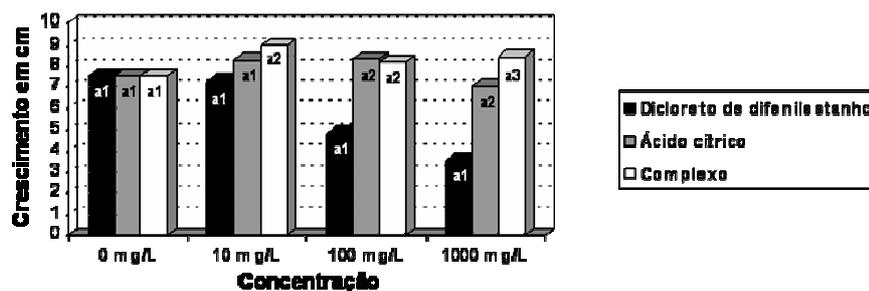
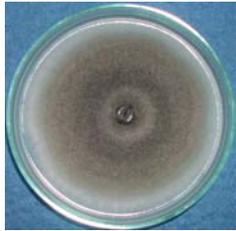
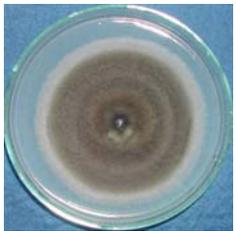


FIGURA 8 Médias de crescimento micelial relacionadas à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo *Alternaria alternata*.

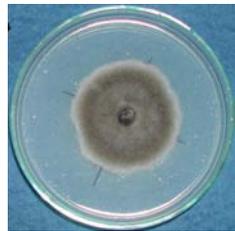
Alternaria alternata



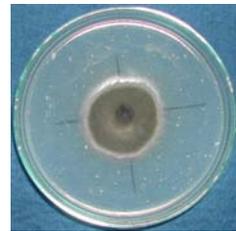
TA



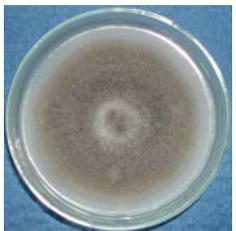
DD 10 mg L⁻¹



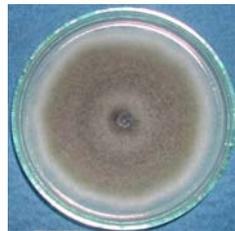
DD 100 mg L⁻¹



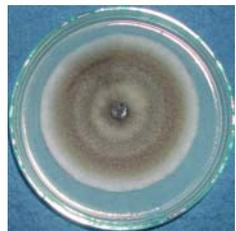
DD 1000 mg L⁻¹



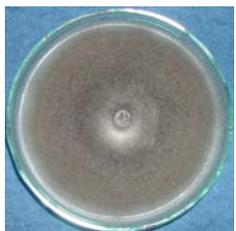
AC 10 mg L⁻¹



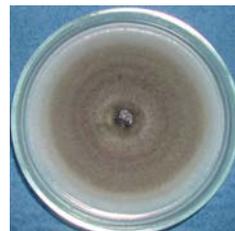
AC 100 mg L⁻¹



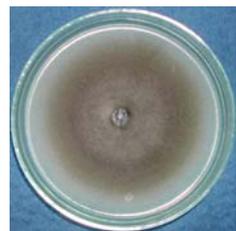
AC 1000 mg L⁻¹



CP 10 mg L⁻¹



CP 100 mg L⁻¹



CP 1000 mg L⁻¹

FIGURA 9 *Alternaria alternata*, após 9 dias de incubação (TA – testemunha; DD – dicloreto de difenilestanho; AC – ácido cítrico; CP – complexo)

4.2.2 Crescimento micelial do fungo *Colletotrichum truncatum*

A parte experimental realizada com o fungo *Colletotrichum truncatum* está exposta na Figura 10 e na Tabela 2A, nas quais os dados referentes aos reagentes de partida e ao complexo podem ser interpretados. Estes dados foram obtidos após um período de incubação de 12 dias, utilizando BDA como meio de cultura (Figura 11).

Os dados da Figura 11 mostram que, nas doses de 100 mg L⁻¹ e 1.000 mg L⁻¹, o dicloreto se mostra muito mais eficaz que o ácido cítrico e o complexo.

Para as doses de 10 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹, o ácido cítrico e o complexo são estatisticamente iguais, portanto, o dicloreto diminuiu mais acentuadamente o crescimento micelial. O complexo se apresenta um pouco melhor que o ácido cítrico na dose de 1.000 mg L⁻¹.

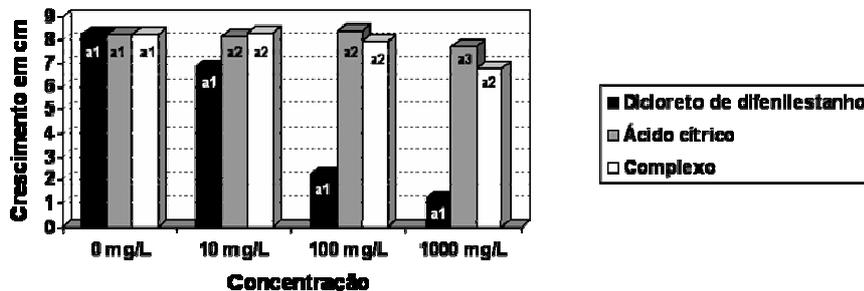
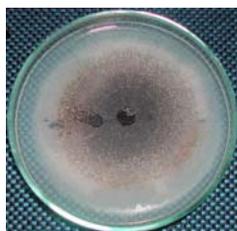
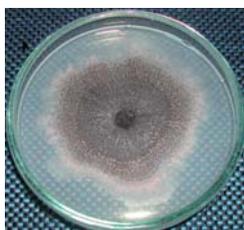


FIGURA 10 Médias de crescimento micelial relacionadas à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo *Colletotrichum truncatum*

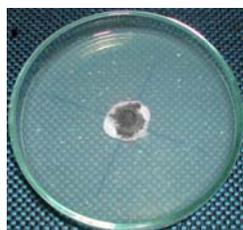
Colletotrichum truncatum



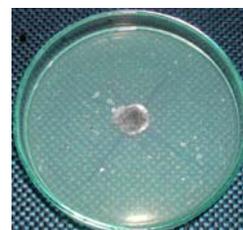
TA



DD 10 mg L⁻¹



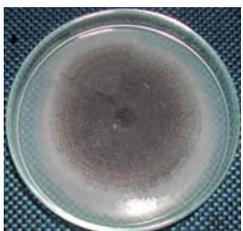
DD 100 mg L⁻¹



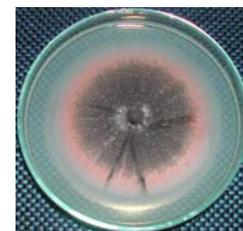
DD 1000 mg L⁻¹



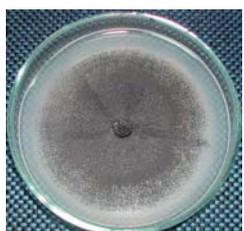
AC 10 mg L⁻¹



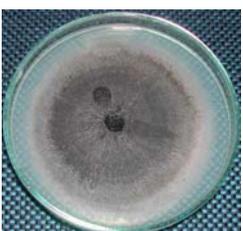
AC 100 mg L⁻¹



AC 1000 mg L⁻¹



CP 10 mg L⁻¹



CP 100 mg L⁻¹



CP 1000 mg L⁻¹

FIGURA 11 *Colletotrichum truncatum*, após 12 dias de incubação (TA – testemunha; DD – dicloreto de difenilestanho; AC – ácido cítrico; CP – complexo).

4.2.3 Crescimento micelial do fungo *Cylindrocladium*

Na Figura 12, fica comprovada a análise estatística da Tabela 3, em que está representada a correlação do experimento realizado com os compostos de partida (dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico) e o complexo sobre o fungo *Cylindrocladium*. Estes dados foram obtidos após um período de incubação de 9 dias, utilizando BDA como meio de cultura (Figura 13).

O que se pode obter como conclusão é que o dicloreto e o complexo na dose de 10 mg L⁻¹ são estatisticamente iguais, tendo o ácido cítrico sido o menos eficaz.

Para a dose de 100 mg L⁻¹, não houve diferenças estatísticas entre os reagentes e o complexo. Este apresentou bastante poder de inibição na dose de 1.000 mg L⁻¹, tendo o dicloreto se apresentado como o menos indicado para esse fungo, nesta dose.

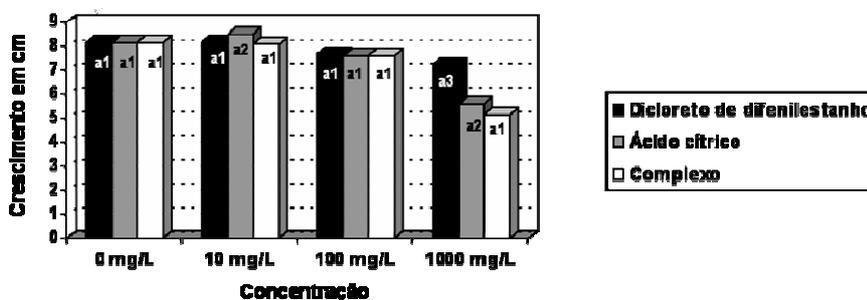


FIGURA 12 Médias de crescimento micelial relacionadas à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo *Cylindrocladium*.

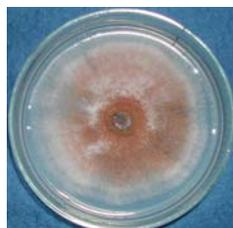
Cylindrocladium



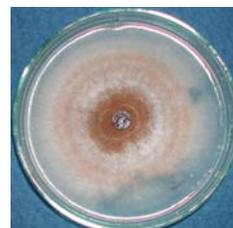
TA



DD 10 mg L⁻¹



DD 100 mg L⁻¹



DD 1000 mg L⁻¹



AC 10 mg L⁻¹



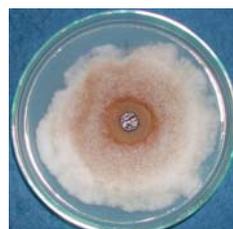
AC 100 mg L⁻¹



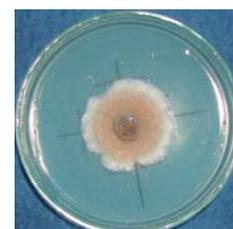
AC 1000 mg L⁻¹



CP 10 mg L⁻¹



CP 100 mg L⁻¹



CP 1000 mg L⁻¹

FIGURA 13 *Cylindrocladium*, após 9 dias de incubação (TA – testemunha; DD – dicloreto de difenilestanho; AC – ácido cítrico; CP – complexo)

4.2.4 Crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum.sp.phaseoli*

O experimento realizado com o fungo *Fusarium oxysporum.f.sp.phaseoli* pode ser interpretado por meio da Tabela 4A e da Figura 14. Foram testados os compostos de partida (dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico) e o complexo sobre o fungo. Estes dados foram obtidos após um período de incubação de 6 dias, utilizando BDA como meio de cultura (Figura 15).

Em relação aos reagentes e ao complexo utilizados no experimento com o fungo *Fusarium*, pode-se dizer que, na dose de 10 mg L⁻¹, ambos não possuem diferenças estatísticas, ficando as médias de crescimento pouco abaixo das médias da testemunha (0 mg L⁻¹).

O dicloreto de difenilestanho teve uma média acentuadamente menor que os demais compostos, nas doses de 100 mg L⁻¹ e 1.000 mg L⁻¹.

O ácido cítrico e o complexo se apresentaram equivalentes na dose de 1.000 mg L⁻¹. Por sua vez, o complexo se mostrou mais eficaz que o ácido na dose de 100 mg L⁻¹.

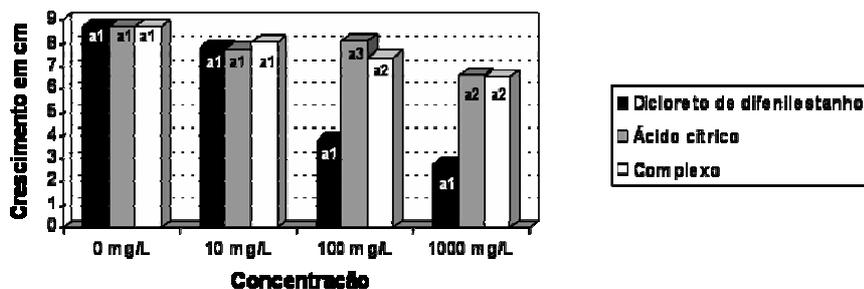
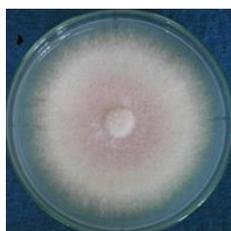


FIGURA 14 Médias de crescimento micelial relacionadas à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo *Fusarium oxysporum.sp.phaseoli*.

Fusarium oxysporum.sp.phaseoli



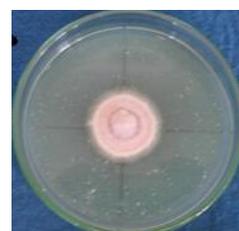
TA



DD 10 mg L⁻¹



DD 100 mg L⁻¹



DD 1000 mg L⁻¹



AC 10 mg L⁻¹



AC 100 mg L⁻¹



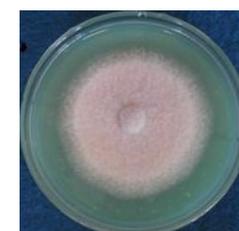
AC 1000 mg L⁻¹



CP 10 mg L⁻¹



CP 100 mg L⁻¹



CP 1000 mg L⁻¹

FIGURA 15 *Fusarium oxysporum.sp.phaseoli* após 6 dias de incubação (TA – testemunha; DD – diclofopato de dimetil estanho; AC – ácido cítrico; CP – complexo).

4.2.5 Crescimento micelial do fungo *Phythium*.

As informações para a análise do *Phythium* encontram-se na Figura 16 e na Tabela 5, nas quais estão representados as análises para os compostos de partida (dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico) e o complexo. Estes dados foram obtidos após um período de incubação de 3 dias, utilizando CA como meio de cultura (Figura 17).

A testemunha (0 mg L⁻¹), a dose de 10 mg L⁻¹ dos reagentes e do complexo e a dose de 100 mg L⁻¹ do ácido cítrico e do complexo quase não apresentaram nenhuma diferença no crescimento micelial do fungo analisado. Ainda sobre a dose de 100 mg L⁻¹, o dicloreto foi o composto que seria escolhido para agir contra o fungo.

A dose de 1.000 mg L⁻¹ foi a melhor. O ácido e o complexo se apresentaram iguais estatisticamente e desempenharam inibição significativa do micélio do fungo. O dicloreto foi excelente inibindo totalmente o crescimento micelial do *Phythium*.

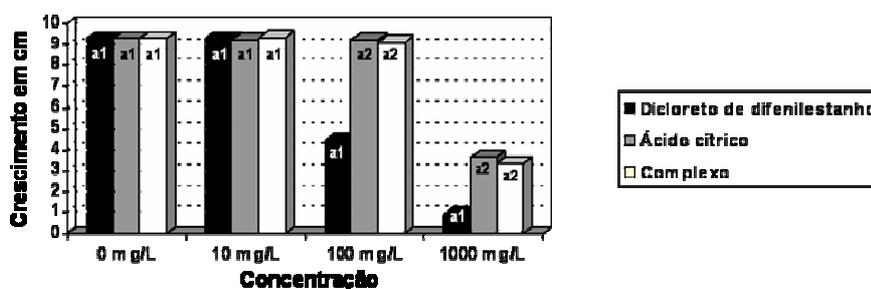
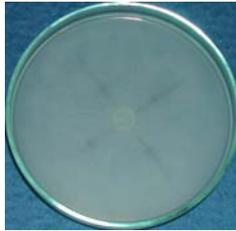
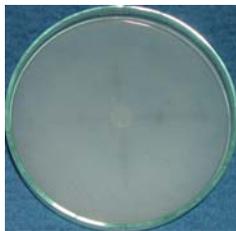


FIGURA 16 Médias de crescimento micelial relacionadas à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo *Phythium*.

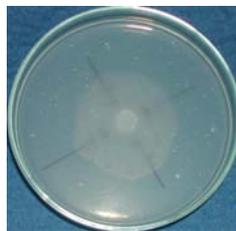
Phythium



TA



DD 10 mg L⁻¹



DD 100 mg L⁻¹



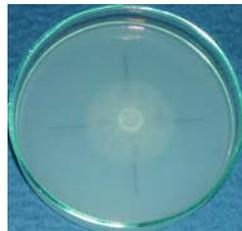
DD 1000 mg L⁻¹



AC 10 mg L⁻¹



AC 100 mg L⁻¹



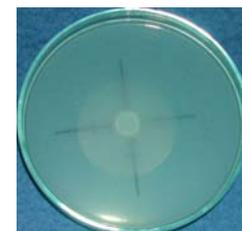
AC 1000 mg L⁻¹



CP 10 mg L⁻¹



CP 100 mg L⁻¹



CP 1000 mg L⁻¹

FIGURA 17 *Phythium*, após 3 dias de incubação (TA – testemunha; DD – dicloreto de difenilestanho; AC – ácido cítrico; CP – complexo)

4.2.6 Crescimento micelial do fungo *Ramularia*.

Na Tabela 6A e na Figura 18 estão relacionados o experimento com os compostos de partida (dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico) e o complexo sobre a *Ramularia*. Estes dados foram obtidos após um período de incubação de 9 dias, utilizando BDA como meio de cultura (Figura 19).

O dicloreto, na dose de 1.000 mg L⁻¹, se mostrou o mais eficiente de todos os tratamentos, ficando o ácido cítrico e o complexo, que se mostraram estatisticamente equivalentes nessa mesma dose, como produtos alternativos.

Para as demais doses, o dicloreto também foi eficaz. Na dose de 10 mg L⁻¹, ele se mostrou estatisticamente igual ao ácido cítrico. Neste mesmo tratamento, o ácido e o complexo também se equivalem.

Na dose de 100 mg L⁻¹, o dicloreto foi o composto que mais dificultou o crescimento micelial, tendo o ácido e o complexo, mais uma vez, se mostrado equivalentes.

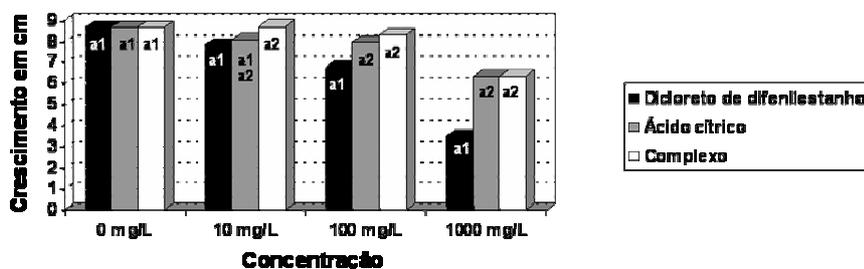
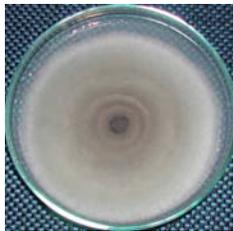


FIGURA 18 Médias de crescimento micelial relacionadas à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo *Ramularia*.

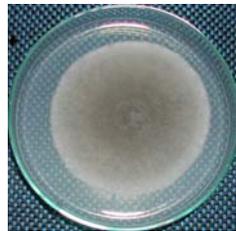
Ramularia



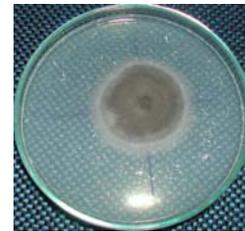
TA



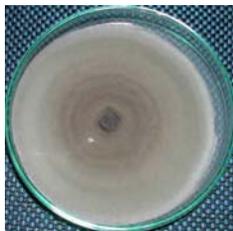
DD 10 mg L⁻¹



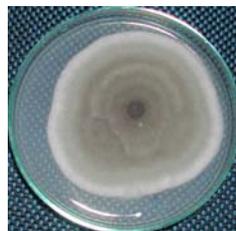
DD 100 mg L⁻¹



DD 1000 mg L⁻¹



AC 10 mg L⁻¹



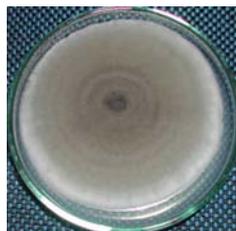
AC 100 mg L⁻¹



AC 1000 mg L⁻¹



CP 10 mg L⁻¹



CP 100 mg L⁻¹



CP 1000 mg L⁻¹

FIGURA 19 *Ramularia*, após 9 dias de incubação (TA – testemunha; DD – dicloreto de difenilestanho; AC – ácido cítrico; CP – complexo).

4.2.7 Crescimento micelial do fungo *Rhizopus*

Na Figura 20 está descrito o experimento realizado com o fungo *Rhizopus*. Os dados estatísticos encontram-se na Tabela 7A, na qual são representadas as análises para os compostos de partida (dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico) e o complexo. Estes dados foram obtidos após um período de incubação de 3 dias, utilizando AA como meio de cultura.

Para o tratamento contra o fungo *Rhizopus*, houve produtos equivalentes estatisticamente, como o dicloreto e o ácido cítrico, na dose de 100 mg L⁻¹ e o dicloreto e o complexo, na dose de 1.000 mg L⁻¹, sendo estes últimos os mais significativos contra o crescimento micelial.

Para a dose de 10 mg L⁻¹, o melhor produto foi o dicloreto e o pior o complexo, o contrário do que aconteceu com a dose de 100 mg L⁻¹, na qual o complexo teve a melhor atividade fungicida.

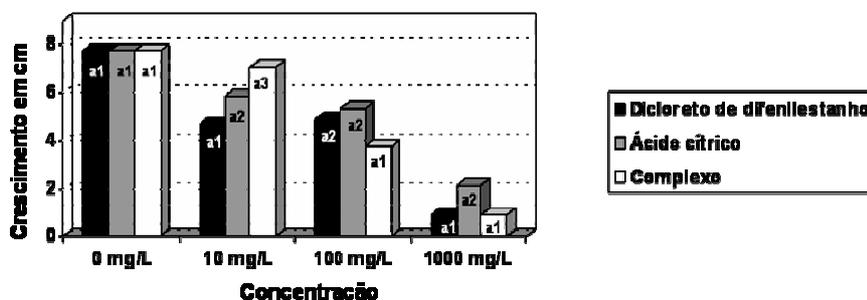


FIGURA 20 Médias de crescimento micelial relacionadas à influência de diferentes doses dos reagentes e do complexo com o fungo *Rhizopus*.

Para este fungo, não foram tiradas fotografias, pois o mesmo tem a característica de ter o micélio bastante fino e quase imperceptível no meio de cultura.

5 CONCLUSÕES

O complexo formado a partir do dicloreto de difenilestanho com o ácido cítrico foi sintetizado e caracterizado por ponto de fusão e por espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

Para a técnica de ponto de fusão, observou-se que o complexo não apresenta uma temperatura em que seja possível determinar esse valor, pois este se decompõe. Mesmo assim, pode-se prever uma possível coordenação do composto devido às diferenças nas características dos compostos de partida.

O complexo sintetizado teve bandas de absorção deslocadas das bandas apresentadas pelo dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico, mostrando, dessa forma, que, possivelmente, houve formação de complexo.

Não se pode prever uma razão estequiométrica para o complexo, pois as análises de CHN e os testes de solubilidade foram insatisfatórios, evidenciando uma possível formação de um polímero.

Em relação aos testes biológicos, o dicloreto de difenilestanho mostrou alto poder de inibição de crescimento de todos os fungos testados. Os tratamentos realizados com o ácido cítrico e o complexo organoestânico apresentaram baixa eficiência na inibição do crescimento dos fungos, exceto para a dose de 1.000 mg L^{-1} que se mostrou pouco mais efetivo. Entretanto, proporcionaram crescimento maior que o dicloreto de difenilestanho.

O melhor resultado para o teste biológico, quanto ao complexo, foi para o fungo *Rhizopus*, na dose de 100 mg L^{-1} que teve um potencial de inibição maior que o dicloreto de difenilestanho.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. T. **Efeitos biocidas de ácidos R(-)- e S(+)- madêlicos e derivados diorganoestânicos sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.** 2002. 45 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- AYOKO, G. A.; BONINE, J. J. **Applied organometallic chemistry.** Canadá. J. Wiley, 1995. v. 17, p. 749.
- BAIRD, C. **Química ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 435.
- BARBIÉRI, R. S.; TERRA, V. R.; DIAS, A. K. C. Compostos organoestânicos trimetálicos. In: CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO, 2., 2003, Belo Horizonte. **Mostra de Trabalhos...** Belo Horizonte: FAPEMIG, 2003. v. 2.
- BIGELIS R.; ARORA K. D. Handbook of applied mycology fungal biotechnology. In: _____. **Organic acids of fungi.** New York: M. Dekker, 1992. v. 4.
- BLUNDEN, S. J.; EVANS, C. J. Organotin compounds. In: HUTZINGER, O. (Ed.). **The handbook of environmental chemistry.** Berlin: Springer-Verlag, 1990. v.3, part E, p.1-44.
- BOLARD, J. Infrared absorptions spectra of simple hydroxy acids. **Journal Chemistry Phys.**, p. 887, 1965.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms.** 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994. p. 385-386.
- CABELLO, C. **Avaliação do substrato manipueira na biossíntese de ácido cítrico monitorada por computador.** Botucatu, 1991. 88p. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- CHAMP, M. A.; LOWESTEIN, F. L. TBT – Dilemma of High – Technology Antifouling Paints. **Ocean**, v.30, p.69, Fall., 1987.

COSTA, V. C. **Síntese e caracterização de compostos organoestânicos carboxilatos e a aplicação desses em culturas de fungos *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *Phaseoli* Kendrick & Snyder.** 2004. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CROWE, A. J.; SMITH, P. J.; CARDIN, C. J.; PARGE, H. E.; SMITH, F. E. Possible pre-dissociation of diorganotin dihalide complexes relationships between antitumor activity and structure. **Cancer Letters**, Clare, n. 1, p. 24-45, 1984.

DEMAIN, A. L. Microbial technology. **Trends in Biotechnology**, v.18, p. 26-31, 2000a.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000b.

DIAS, A. K. C. **Efeito inibitório de compostos organoestânicos sobre fungos isolados de câmaras de maturação.** 2005. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 3. p. 26, 1996.

FERRANO, J. R. **Low frequency vibrations of inorganic and coordination compounds.** New York: Plenum, 1971.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. 45., 2000, São Carlos **Anais....** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.255-258.

FILGUEIRAS, C. A. L. A nova química do estanho. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 176-191, 1998.

GRAHAN, A. F.; LUND, B. M. The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, p. 39-49, 1986.

GREENAWAY, A. M.; LANCASHIRE, R. J. Cobalt(III) Ammines - "Werner" Complexes, **Journal Chemistry Educ**, v. 59, p. 419-420, 1982.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**. v. 13, p. 209-234, 1995.

IHDE, A. J. **The development of modern chemistry**. New York: Harper & Row, 1966.

INTERNATIONAL TIN RESEARCH INSTITUTE. **Tin chemicals** - the formula for success. Uxbridge, UK: ITRS, 1987. (ITRS Publication, 681).

JAMES, L. K. **Nobel Laureates in chemistry, 1901-1992**. Washington: American Chemical Society and The Chemical Heritage Foundation, 1995.

JAN, C. R.; JIANN, B. P.; LIU, Y. C.; CHANG, H. T.; SU, W. R.; CHEN, W. C.; YU, C. C.; HUANG, J. K. Effect of the organotin compound diethylin on Ca^{2+} handling in human prostate cancer cells. **Life Sciences**, Oxford, v. 70, n. 11, p. 1337-1345, fev. 2002.

LARSEN, E. M.; HOMEIR, E. H. Zirconium(IV) and hafnium(IV) complexes of α -hidroxy carboxylates, lactates, mandelates, and isopropylmandelates. Stereo-specificity in eight-coordinate complexes. **Inorg. Chem.** v. 11, p. 2687, 1972.

LEONEL, M.; CERADA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 299-304, maio/ago. 1995.

LIMA, G. M. Síntese e caracterização de compostos organometálicos de estanho (IV). **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 178-181, 1999.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: tecnologia da fermentações**. São Paulo: E. Blucher, 1975. v. 1.

LUIJTEN, J. G. A. Applications and biologicals effects of organotin compounds. In: SAWYER, A. **Organotin compounds**. New York: M. Dekker, 1972. v. 3, p. 921-974.

MARISON I. W. Biotechnology for engineers. **Biological systems in processes**. Chichester: Ellis Horwood Limited, p. 323, 1988.

MARSOT, P.; PELLETIER, É.; ST-LOUIS, R.; Effects of triphenyltin chloride on grown of the marine microalga *Pavlova lutheri* in continuous culture. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 54, p. 389, 1995.

- MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 87-132, 1992.
- NASCIMENTO, C. W. A.; AMARASIRIWARDENA, D.; XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelantes at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. **Environ. Pollut.**, v. 140, p. 114-123, 2006.
- OMAE, I. Organotin Chemistry. **Journal Organometallic Chemistry**, Amsterdam, Elsevier, n. 21, p. 297-321, 1989.
- PAULING, L. **The nature of the chemical bond**. Ithaca: Cornell University, 1940.
- PELCZAR, M. J.; CHANG, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2.
- PELLERITO, L.; NAGY, L. Organotin (IV) complexes formed with biologically active ligando: equilibrium and structural studies, and some biological aspects. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 224, n. 1-2, p.111-150, Jan. 2002.
- POLLER, R. C. **The chemistry of organotin compounds**. London: Logos, 1970. 315 p.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.
- QUARTACCI, M. F., BAKER, A. J. M.; NAVARI-IZZO, F. Nitrilotriacetate and citric acid assisted phytoextraction of cadmium by Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czernj, Brassicaceae). **Chemosphere**, n. 59, p. 1249-1255, 2005.
- SCHMIEDGEN, R.; HUBER, F.; PREUT, H. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 8, p. 397-407, 1994.
- SHIBATA, Y. Some personal recollections of Alfred Werner. **Werner Centennial**, Adv. Chem. Ser., v. 62, p. 1, 1967.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5.ed. Canadá: J. Wiley, 1991. 419 p.

SOCRATES, G. **Infrared characteristic group frequencies**. New York: J. Wiley, 1980.

TEIXEIRA, A. R. **Síntese, caracterização e aplicação antifúngica de um complexo organoestânico-sacarinato**. 2007. 49 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TERRA, V. R.; BARBIÉRE, R. S.; CASTELO BRANCO, P. A.; ABRAS, A. Síntese e caracterização de compostos diorganoestânicos com ácido dl-mandélico. **Eclética Química**, Araraquara, v. 23, p. 17-30, 1998.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 2.ed Sao Paulo: Atheneu, 1996.

TURGUT, C.; PEPE M. K.; CUTRIGHT, T. J. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. **Environ. Pollut.**, n. 131, p. 147-154, 2004.

WHITE, J. S.; TOBIN, J. M.; COONEY, J. J. Organotin compounds and their interactions with microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 541-554, 1999.

WILKE, D. What should and what can biotechnology contribute to chemical bulk production? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 89-100, 1995.

WILLIS, H. A.; VAN DER MAAS, J. H.; MILLER, R. G. J. **Laboratory methods in vibration spectroscopy**. 3.ed. New York: J. Wiley, 1991.

ZAMBOLIM, L. Fungicidas: benefícios e riscos. **Ação ambiental**, Viçosa, MG, n. 5, p. 24-27, 1999.

ANEXOS

ANEXO A

		Página
TABELA 1A	Análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Alternaria alternata</i>	48
TABELA 2A	Análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum truncatum</i>	48
TABELA 3A	Análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Cylindrocladium</i>	49
TABELA 4A	Análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Fusarium oxysporum.sp.phaseoli</i>	49
TABELA 5A	Análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Phythium</i>	50
TABELA 6A	Análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Ramularia</i>	50
TABELA 7A	Análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Rhizopus</i>	51

TABELA 1A Análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Produto	2	56,153229	28,076615	73,842	0,0000
Dose	3	21,251823	7,083941	18,631	0,0000
Produto*dose	6	32,695521	5,449253	14,332	0,0000
Resíduo	36	13,688125	0,380226		
Total	47	123,788698			
Cv %	8,49				
Média Geral	7,2635417				

TABELA 2A Análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum truncatum*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Produto	2	119,787917	59,893958	399,247	0,0000
Dose	3	68,023073	22,674358	151,145	0,0000
Produto*dose	6	78,990833	13,165139	87,757	0,0000
Resíduo	36	5,400625	0,150017		
Total	47	272,202448			
Cv %	5,66				
Média Geral	6,8489583				

TABELA 3A Análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Cylindrocladium*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Produto	2	2,470417	1,235208	43,649	0,0000
Dose	3	39,743958	13,247986	468,150	0,0000
Produto*dose	6	7,531667	1,255278	44,358	0,0000
Resíduo	36	1,018750	0,028299		
Total	47	50,764792			
Cv %	2,25				
Média Geral	7,4770833				

TABELA 4A Análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum.sp.phaseoli*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Produto	2	41,511467	20,755733	183,391	0,0000
Dose	3	81,920200	27,306733	183,391	0,0000
Produto*dose	6	40,525400	6,754233	59,678	0,0000
Resíduo	36	4,074400	0,113178		
Total	47	168,031467			
Cv %	4,76				
Média Geral	7,0683333				

TABELA 5A Análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Phythium*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Produto	2	35,636354	17,818177	103,932	0,0000
Dose	3	355,232656	118,410885	690,680	0,0000
Produto*dose	6	42,249063	7,041510	41,073	0,0000
Resíduo	36	6,171875	0,171441		
Total	47	439,289948			
Cv %	5,76				
Média Geral	7,1927083				

TABELA 6A Análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Ramularia*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Produto	2	15,727812	7,863906	35,286	0,0000
Dose	3	75,743073	25,247691	113,287	0,0000
Produto*dose	6	12,656771	2,109462	9,465	0,0000
Resíduo	36	8,023125	0,222865		
Total	47	112,150781			
Cv %	6,31				
Média Geral	7,4843750				

TABELA 7A Análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Rhizopus*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Produto	2	4,217604	2,108802	11,424	0,0001
Dose	3	258,632656	86,210885	467,013	0,0000
Produto*dose	6	16,706562	2,784427	15,084	0,0000
Resíduo	36	6,645625	0,184601		
Total	47	286,202448			
Cv %	8,80				
Média Geral	4,8822917				