

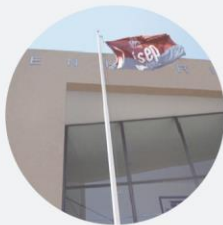


Microencapsulação do isotiocianato de benzilo com beta-ciclodextrinas

TAYNARA BRAGA DE ARAÚJO

novembro de 2022





Microencapsulação do isotiocianato de benzilo com beta-ciclodextrinas

TAYNARA BRAGA DE ARAÚJO

Outubro de 2022

POLITÉCNICO DO PORTO
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

Microencapsulação do isotiocianato de benzilo com β - ciclodextrinas

Taynara Braga de Araújo

Mestrado em Biorrecursos



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
Instituto Superior de Engenharia do Porto

Outubro, 2022

POLITÉCNICO
DO PORTO

Microencapsulação do isotiocianato de benzilo com β -ciclodextrinas

Taynara Braga de Araújo

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biorrecursos.

Orientação Científica: Prof^ª. Dr^ª. Ermelinda Manuela Garrido, emg@isep.ipp.pt

Coorientação Científica: Prof^º. Dr^º. Jorge Garrido, jjg@isep.ipp.pt



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
Instituto Superior de Engenharia do Porto
Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072
Porto

Outubro, 2022

POLITÉCNICO
DO PORTO

AGRADECIMENTOS

A realização e conclusão dessa tese não seria possível sem o apoio e compreensão de algumas pessoas que contribuíram direta e indiretamente para sua confecção.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof^ª. Dr^ª. Manuela Garrido e Prof^º. Dr^º. Jorge Garrido, por toda dedicação, acompanhamento, disponibilidade e simpatia durante todo o processo de produção desta tese de mestrado.

Agradeço também a todos os elementos do CIETI que me acolheram e ajudaram no decorrer dos ensaios laboratoriais, sempre dispostos a sanar minhas dúvidas e auxiliar nas diferentes etapas.

Por fim, não poderia deixar de agradecer a minha família e amigos, por todo apoio e incentivo que tornaram mais fácil a concretização desse trabalho.

RESUMO

A procura e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos resultam da crescente preocupação com o impacto do uso dos agentes disponíveis comercialmente no meio ambiente e da ameaça crescente que os seus efeitos indesejados produzem nos ecossistemas.

Além disso, nos últimos anos, com a propagação do coronavírus SARS-CoV-2 (COVID-19), a utilização de produtos de limpeza e desinfetantes das mãos em forma de géis, toalhetes húmidos ou outros produtos não enxaguáveis aumentou drasticamente e, por consequência, houve a necessidade de reforçar a produção de agentes antimicrobianos, a fim de responder às necessidades adicionais no contexto da atual pandemia.

Neste cenário, os compostos fitoquímicos que possuem diversos efeitos biológicos, são vistos como promissores para a criação de agentes antimicrobianos e fármacos alternativos aos de uso convencional. Estes compostos têm demonstrado ser uma mais-valia oferecendo uma proposta inovadora e com grande potencial para formulação de produtos com capacidades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes, além da sua atividade quimiopreventiva, perante alguns tipos de cancro.

Nesta dissertação efetuou-se uma revisão bibliográfica sobre a obtenção de compostos da família dos isotiocianatos a partir de produtos naturais e por síntese, bem como a apresentação das suas propriedades antimicrobianas e quimiopreventivas.

Foi também realizado o estudo da fotorreatividade e da complexação com β -ciclodextrinas do isotiocianato de benzilo (BITC), um dos compostos da família dos isotiocianatos mais citados em publicações devido à sua atividade anticancerígena perante diferentes tipos de cancro, como o da mama e do pulmão.

O estudo da fotorreatividade foi efetuado com intuito de avaliar a possível fototoxicidade atribuída a este composto, o que pode limitar a sua aplicação industrial. No entanto, de acordo com as análises realizadas, o BITC não é fotorreativo, indicando que a possibilidade de expressar alguma fototoxicidade quando exposto a luz visível é baixa.

O BITC apresenta elevada volatilidade e hidrofobia que pode igualmente inviabilizar a sua ampla utilização. A microencapsulação deste composto, poderá contribuir para o aumento da sua solubilidade em água e impedir que o composto volatilize rapidamente. O estudo de complexação foi realizado usando hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e metil- β -ciclodextrina (M- β -CD), com o objetivo de determinar e comparar as constantes de estabilidade obtidas através do uso de cada uma das ciclodextrinas. Nos dois casos, verificou-se uma relação linear entre o aumento da solubilidade do BITC e o aumento da concentração das ciclodextrinas utilizadas, com declives inferiores a 1, o que indica a formação de complexos na proporção estequiométrica 1:1.

Os resultados alcançados para as constantes de estabilidade foram de $250 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ para HP- β -CD e $565 \pm 10 \text{ M}^{-1}$ para a M- β -CD.

Foi possível verificar um aumento na solubilidade do BITC de oito vezes quando se utilizou a HP- β -CD e de doze vezes com a utilização da M- β -CD como agente encapsulante. Os resultados obtidos indicam que a microencapsulação do isotiocianato de benzilo com CDs poderá contribuir para melhorar o potencial de aplicação desta substância em fármacos e agentes antibacterianos.

Palavras-chave: Fitoquímicos, isotiocianatos, microencapsulação, ciclodextrinas, fotorreatividade.

ABSTRACT

The demand for and development of new antimicrobial agents is a result of growing concern about the impact of the use of commercially available agents on the environment and the increasing threat to ecosystems from their unwanted effects.

Furthermore, in recent years, with the spread of the SARS-CoV-2 coronavirus (COVID-19), the use of hand cleaners and disinfectants in the form of gels, wet wipes or other non-rinse-off products has increased dramatically and, consequently, there has been a need to strengthen the production of antimicrobial agents in order to meet the additional needs in the context of the current pandemic.

In this scenario, phytochemical compounds that possess diverse biological effects, are seen as promising for the creation of alternative antimicrobial agents and drugs to those in conventional use. These compounds have demonstrated to be an added value offering an innovative proposal and with great potential for formulation of products with antibacterial, antifungal and antioxidant capacities, besides its chemopreventive activity, facing some types of cancer.

In this dissertation a bibliographical revision on the obtainment of compounds of the family of the isothiocyanates from natural products and by synthesis was made as well as the presentation of its antimicrobial and chemopreventive properties.

The study of photoreactivity and complexation with β -cyclodextrins of benzyl isothiocyanate (BITC), one of the compounds of the isothiocyanate family most cited in publications due to its anticancer activity against different types of cancer, such as breast and lung cancer, was also performed.

The photoreactivity study was carried out in order to evaluate the possible phototoxicity attributed to this compound, which may limit its industrial application. However, according to the analyses performed, BITC is not photoreactive, indicating that the possibility of expressing some phototoxicity when exposed to visible light is low.

BITC presents high volatility and hydrophobicity that may also make its wide use unfeasible. The microencapsulation of this compound could contribute to the increase of its solubility in water and prevent that the compound volatilizes quickly. The complexation study was performed using hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) and methyl- β -cyclodextrin (M- β -CD), in order to determine and compare the stability constants obtained by using each of the cyclodextrins. In both cases, a linear relationship was found between the increase in the solubility of BITC and the increase in the concentration of the cyclodextrins used, with slopes lower than 1, indicating the formation of complexes in the stoichiometric 1:1 ratio.

The results achieved for the stability constants were $250 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ for HP- β -CD and $565 \pm 10 \text{ M}^{-1}$ for M- β -CD.

An eight times increase in BITC solubility could be verified when HP- β -CD was used and twelve times increase with the use of M- β -CD as encapsulating agent. The results obtained indicate that the microencapsulation of benzyl isothiocyanate with CDs could contribute to improve the potential application of this substance in drugs and antibacterial agents.

Keywords: Phytochemicals, isothiocyanates, microencapsulation, cyclodextrins, photoreactivity.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Objetivos e estrutura da dissertação	1
1.2	Enquadramento e motivação	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Isotiocianatos de origem natural.....	3
2.2	Isotiocianatos em plantas e sua atividade antimicrobiana e medicinal	5
2.3	Isotiocianatos sintéticos.....	14
2.4	Isotiocianatos sintéticos vs. naturais.....	17
2.5	Atividade biológica de isotiocianatos.....	19
2.6	Estudos de aprimoramento dos isotiocianatos.....	21
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Planeamento Experimental.....	31
3.2	Estudo da fotorreatividade do BITC.....	32
3.3	Estudo da complexação do BITC com diferentes ciuclodextrinas.....	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Estudo da Absortividade molar do BITC.....	38
4.2	Ensaio ROS	39
4.3	Estudo da complexação do BITC com diferentes ciclodextrinas.....	40
5.	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A.....	55
	ANEXO B.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 - Exemplos de vegetais crucíferos (Manchali et al., 2012).	3
Figura 2. 2 - Formação de isotiocianatos a partir de glucosinolatos por hidrólise enzimática (Adaptado de Aguiar, 2012).	4
Figura 2. 3 - Classes de isotiocianatos formados por hidrólise de glucosinolatos (Adaptado de Cabrita, 2014).	4
Figura 2. 4 - Sinapis alba (Jardim Botânico UTAD, 2022).	5
Figura 2. 5 - Composição de ITCs nos extratos de sementes tratadas com mirosinase. Sa: Sinapis alba; Bn: Brassica napus; Bj: Brassica juncea; Bo: Brassica oleracea; Cs: Camelina sativa. As cores definem o grupo do ITC (Adaptado de Andini et al., 2021).	6
Figura 2. 6 - Couve-nabo (Bejo, 2022).	7
Figura 2. 7 - Comparação da atividade antimicrobiana de uma amostra volátil de <i>A. Sinuata</i> com a ampicilina (antibiótico convencional) (Blažević et al., 2010).	9
Figura 2. 8 - <i>Aurinia leucadea</i> em Salento-Itália (Orsenigo et al., 2019).	10
Figura 2. 9 - <i>Rúcula</i> (Nascimento et al., 2016).	11
Figura 2.10 - <i>Armoracia Rusticana</i> (Jardim Botânico UTAD, 2022).	12
Figura 2. 11 -- <i>Moricandia arvensis</i> (Jardim Botânico UTAD, 2022).	14
Figura 2. 12 - Rotas para síntese de isotiocianatos (Adaptado de Janczewski et al., 2021).	15
Figura 2. 13 - Isotiocianatos alifáticos e seus rendimentos (valores entre parênteses correspondem aos rendimentos obtidos usando água como solvente) (Adaptado de Janczewski et al., 2021).	15
Figura 2. 14 - Isotiocianatos aromáticos e seus rendimentos (Adaptado de Janczewski et al., 2021).	16
Figura 2. 15 - Isotiocianatos derivados de aminoácidos naturais (Adaptado de Janczewski et al., 2021).	16
Figura 2. 16 - Isotiocianatos derivados de aminoácidos naturais (Adaptado de Janczewski et al., 2021).	16
Figura 2.17 - Estrutura molecular dos ITCs projetados e compostos-base (Arianie et al., 2021).	18
Figura 2.18 - Estrutura molecular dos ITCs encontrados na <i>Moringa Oleifera</i> (Arianie et al., 2021).	18
Figura 2. 19 - Isotiocianatos usados para tratamento da dor neuropática (Adaptado de Manelli et al., 2017).	19
Figura 2. 20 - Publicações relacionadas ao uso do BITC no tratamento de 14 tipos de cancro (Adaptado de Dinh et al., 2021).	20
Figura 2. 21 - Formação do complexo de inclusão (Adaptado de Harbs, 2019).	21
Figura 2. 22 - Estruturas químicas das ciclodextrinas comumente usadas para encapsulamento (Oliveira, 2012).	22
Figura 2. 23 - Estrutura química da HP- β -CD (Amaro, 2019).	23
Figura 2. 24 - Estrutura química da metil- β -ciclodextrina (Crupi et al., 2013).	24
Figura 2. 25 - Diagrama de solubilidade de fases (Adaptado de Rodrigues, 2013).	25
Figura 4. 1 - Espectro de absorção do BITC entre os comprimentos de onda 290-700nm.	38
Figura 4. 2 - Critério para definição de produtos fotorreativos para o ensaio de ROS (Adaptado OECD, 2019).	40
Figura 4. 3 - Espectro de UV obtido para uma solução de BITC com concentração de 0,2mM, usando como solvente uma mistura etanol:água (60:40).	41
Figura 4. 4 - Curva de calibração obtida para concentrações entre 2×10^{-5} e 2×10^{-4} mol/L em um comprimento de onda de 245,5 nm.	42
Figura 4. 5 - Diagrama de solubilidade, obtido para a HP- β -CD, após 24h de agitação (método I)...	43
Figura 4. 6 - Diagrama de solubilidade, obtido para a HP- β -CD, após 48h de agitação (método I)...	43
Figura 4. 7 - Diagrama de solubilidade após 24h de agitação (método II).....	45
Figura 4. 8 - Diagrama de solubilidade após 48h de agitação (método II).....	45
Figura 4. 9 - Diagrama de solubilidade com HP- β -CD.	47
Figura 4. 10 - Diagrama de solubilidade relacionado aos resultados obtidos usando M- β -CD.	48

Figura A. 1 - Espectro de absorção para solução de BITC à uma concentração de 0,2mM e com 100% de etanol como solvente.	55
Figura A. 2 - Espectro de absorção para solução de BITC à uma concentração de 2×10^{-4} e com um solvente contendo 80% de etanol e 20% de água.	55
Figura A. 3 - Espectro de absorção para solução de BITC à uma concentração de 0,2mM e com um solvente contendo 50% de etanol e 50% de água.	56
Figura A. 4 - Diagrama de solubilidade do BITC com HP- β -CD após 48h de agitação (Ensaio 2).	56
Figura A. 5 - Diagrama de solubilidade do BITC com M- β -CD após 48h de agitação (Ensaio 2).	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2. 1 - Isotiocianatos presentes nos óleos essenciais obtidos nas folhas e raízes da Brassica rapa var. rapifera (Adaptada de Saka et al., 2017).	8
Tabela 2. 2 - Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais comumente usadas (Adaptada de Amaro, 2019).	22
Tabela 2. 3 - Solubilidade de ITCs em água e solventes nos quais esses compostos apresentam elevada solubilidade (PubChem, 2022).	27
Tabela 3. 1 - Soluções preparadas a partir da solução-mãe para definição do solvente.....	34
Tabela 3. 2 - Preparação de soluções padrão para obtenção da curva de calibração.....	35
Tabela 3. 3 - Preparação das soluções para ensaio de solubilidade (Método I).	35
Tabela 3. 4 - Preparação de soluções para ensaio de solubilidade (Método II).....	36
Tabela 3. 5 - Preparação de soluções para o estudo da solubilidade usando o método II para cada uma das CD.....	36
Tabela 4. 1 - Faixas de valores aceitáveis no ensaio de ROS para o quinino (OCDE, 2019).	39
Tabela 4. 2 - Resultados obtidos para cada composto usando o ensaio de ROS.....	39
Tabela 4. 3 - Absorvâncias obtidas para as soluções padrão com diferentes concentrações de BITC..	41
Tabela 4. 4 - Estudo da solubilidade de BITC usando três concentrações diferentes de HP-β-CD (método I).	43
Tabela 4. 5 - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K).	44
Tabela 4. 6 - Estudo da solubilidade de BITC em três concentrações diferentes de HP- β-CD (método II).	44
Tabela 4. 7 - - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K) sem utilização de ultrassom.	45
Tabela 4. 8 - - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K) sem utilização de ultrassom.	46
Tabela 4. 9 - Estudo da solubilidade do BITC em diferentes concentrações de M- β-CD.....	47
Tabela 4. 10 - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K).	48
Tabela A. 1 - Estudo da solubilidade do BITC em diferentes concentrações de HP- β-CD (Ensaio 2).56	
Tabela A. 2 - Estudo da solubilidade do BITC em diferentes concentrações de M- β-CD (Ensaio 2). 57	
Tabela B. 1 - Resultados para o quinino - Ensaio de ROS.....	58
Tabela B. 2 - Resultados para o BITC - Ensaio de ROS.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

- α -CD – Ciclodextrina alfa
 β -CD – Ciclodextrina beta
 γ -CD – Ciclodextrina gama
K – Constante de estabilidade
% – Por cento
ADN – Ácido desoxirribonucleico
AFM – Microscopia de Força Atómica
AITC – Isotiocianato de alilo
BITC – Isotiocianato de benzilo
BuITC – Isotiocianato de butenilo
3-BuITC – Isotiocianato de 3-butenilo
CD – Ciclodextrina
CIETI – Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial
UE – União Europeia
(GC – MS) – Cromatografia gasosa com deteção de espectrometria de massa
GSL – Glucosinolato
HD – Hidrodestilação
HP- β -CD – Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto
ITC – Isotiocianato
ICH – Diretiva do Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano
MAHD – Hidrodestilação assistida por micro-ondas
MEC – coeficiente de extinção molar
M- β -CD – Metil-beta-ciclodextrina
MITC – Isotiocianato de metilo
5-MSITC – Isotiocianato de (metilsulfinil)pentilo
4-MTITC – Isotiocianato de(metiltio)butilo
5-MTITC – Isotiocianato de(metiltio)pentilo
OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

4-PeITC – Isotiocianato de pentenilo

PEITC – Isotiocianato de feniletilo

PhITC – Isotiocianato de fenilo

5-PhITC – Isotiocianato de 5-(fenil)pentilo

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – Rotações por minuto

SO – Oxigénio singleto

SA – Oxigénio superóxido

SBE- β -CD – Sulfobutil éter beta-ciclodextrina

SFN – Sulforafano

STM – Microscopia de Varrimento por Efeito Túnel

UV/Vis – Ultravioleta Visível

vs – Versus

1. INTRODUÇÃO

1.1 Objetivos e estrutura da dissertação

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar uma revisão bibliográfica sobre a origem e fontes de compostos fitoquímicos da família dos isotiocianatos, caracterizados por apresentar um largo espectro de ação biológica. A pesquisa realizada incidiu sobre a obtenção destes compostos por extração a partir de produtos naturais e/ou por síntese orgânica, bem como analisar as suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas e quimiopreventivas. Uma vez que estes compostos apresentam uma baixa solubilidade em água, foi realizado um estudo acerca da viabilidade da sua microencapsulação, por meio da formação de complexos de inclusão com β -ciclodextrinas, no sentido de conferir aos isotiocianatos maior solubilidade em água e biodisponibilidade, reduzindo a limitação da aplicação desta substância em produtos comerciais.

Esta dissertação é composta por 5 capítulos: Introdução, Revisão bibliográfica e conceitos teóricos necessários para as etapas posteriores, Trabalho experimental, Apresentação e discussão dos resultados, Conclusão e Perspetivas futuras.

No capítulo 1 realiza-se uma breve introdução, apresentando-se o objetivo da dissertação e a sua estrutura, o enquadramento e motivação.

No capítulo 2 é realizada uma revisão bibliográfica, incluindo alguns conceitos teóricos necessários para o desenvolvimento do trabalho. Nesta seção é apresentado o composto em estudo (isotiocianato de benzilo, BITC), formas de obtenção (naturais e sintéticas) e atividade biológica.

No capítulo 3 é descrito o trabalho experimental desenvolvido, contendo a planificação experimental, descrição dos ensaios de fotoreatividade e o estudo de complexação do BITC com ciclodextrinas.

No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos e realizada a respetiva discussão.

No capítulo 5 estão descritas as conclusões acerca do trabalho realizado e dos resultados alcançados, bem como sugestões para trabalhos futuros.

1.2 Enquadramento e motivação

A necessidade crescente de controlo e inibição do crescimento microbiano, seja em ambiente industrial ou doméstico, tem originado o aumento da procura por substâncias com propriedades biocidas. Os biocidas são classificados como substâncias ativas ou combinações que contenham mais de uma substância para prevenir ou inibir o efeito de qualquer organismo nocivo. Estes compostos são comumente usados para controlo de bactérias e incorporados em formulações de produtos como desinfetantes, cosméticos, pesticidas, conservantes e antissépticos devido ao seu baixo custo e à sua eficácia perante uma vasta gama de microrganismos (Alhajjar *et al.*, 2021) (Ribeiro *et al.*, 2018).

Os agentes antimicrobianos e desinfetantes são comumente chamados de biocidas, no entanto, alguns autores os definem separadamente, indicando biocidas como as substâncias que acima de certas quantidades irão matar as células dentro de certos espaços de tempo, enquanto que os agentes antimicrobianos atuam de modo a criar um ambiente inóspito para o crescimento dos microrganismos e os desinfetantes são substâncias ativas seguras para aplicação em superfícies, eliminando as

contaminações presentes no local (Ribeiro *et al.*,2018). Porém, o que todas essas substâncias têm em comum é a capacidade de inibir a atividade e evitar a propagação de microrganismos.

O Regulamento (UE) N.º 528/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de maio de 2012 relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas estabeleceu a existência de 22 tipos de produtos, divididos em 4 grupos principais, nomeadamente desinfetantes, produtos aplicados para prevenção do desenvolvimento de algas e microrganismos, pesticidas e outros produtos biocidas como anti-incrustantes (European Parliament, 2012).

O mecanismo de interação ocorre, de modo geral, através da associação do biocida com a superfície da célula, em seguida esse agente penetra na membrana celular e afeta um local específico inibindo assim a atividade do microrganismo. O efeito desse produto dependerá de vários fatores, entre eles, o ambiente físico externo, a natureza e estrutura do agente antimicrobiano e por fim da sua capacidade de degradação e inativação do organismo indesejado (Avelar, 2012).

A utilização indiscriminada de biocidas e a sua libertação para o meio ambiente podem levar a graves problemas ecológicos. Isso leva a uma busca de agentes antimicrobianos com propriedades mais seguras para prevenção do crescimento de microrganismos em produtos alimentícios sem prejuízo da saúde humana, levando assim, a uma maior procura de compostos naturais extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas (Andini *et al.*,2021).

Além da necessidade de substâncias de origem natural que promovam menor impacto ao meio ambiente e reduza os riscos à saúde humana, a situação gerada pela pandemia do novo coronavírus SARS-CoV-2 fomentou ainda mais pesquisas relacionadas com a busca de produtos biocidas alternativos aos de uso comum, visando a expansão das opções disponíveis. De facto, com a propagação do COVID-19, muitos setores uniram esforços para o combate dessa doença, em especial, o setor da saúde que se mobilizou completamente e trabalhou com afinco para controle e erradicação do vírus. Durante o período de crescimento do número de infetados a busca por produtos antissépticos ou desinfetantes aumentou em proporções descomunais, fazendo com que a produção desses itens fosse reforçada, pois se esgotavam rapidamente nos pontos de vendas (Santana *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os isotiocianatos (ITCs) foram apontados em diversos estudos como potenciais candidatos para formulação de novos compostos antimicrobianos uma vez que apresentam um amplo espectro de atividade (ANDINI *et al.*,2021). Os ITCs são compostos organossulfurados com fórmula molecular $R-N=C=S$, em que o substituinte R pode corresponder a um grupo alquila, alcenilo, tioalquila, tioalcenilo, arila, entre outros. Esses compostos possuem propriedades farmacológicas, como atividade antioxidante, anticancerígena e ação quimiopreventiva (Guerrero-Alonso *et al.*,2021).

Devido às suas propriedades antimicrobianas e quimiopreventivas, os isotiocianatos são o objeto de estudo desse trabalho, com objetivo de acrescentar informações adicionais sobre sua caracterização e incentivar estudos sobre esses compostos, evidenciando a capacidade dos isotiocianatos no tratamento de doenças e sua atuação como agente biocida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Isotiocianatos de origem natural

Os membros da família *Brassicaceae* ou *Cruciferae* são indicados como fonte rica em compostos bioativos. Essa família é composta por cerca de 3200 espécies dentro das quais se destacam, por serem alimentos consumidos habitualmente, a couve branca (*Brassica oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), couve-de-bruxelas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), brócolo (*Brassica oleracea* var. *italica*), mostarda branca (*Sinapis alba*), rúcula (*Eruca sativa*), rabanete (*Raphanus sativus*) e agrião (*Nasturtium officinalis*) (Cabrita, 2014). Alguns desses vegetais podem ser vistos na Figura 2.1.



Figura 2.1 - Exemplos de vegetais crucíferos (Manchali *et al.*, 2012).

Essa família têm sido foco de inúmeras pesquisas devido seus benefícios para saúde e propriedades nutricionais, os vegetais que a compõem são apontados como anticancerígenos, antidiabéticos e participam na prevenção de doenças cardiovasculares, gastrite crônica e doenças hepáticas. Estudos também ressaltam a sua atividade antimicrobiana e antioxidante (Saka *et al.*, 2017).

Os isotiocianatos (ITCs) são compostos organossulfurados presentes nesta família de vegetais e são biossintetizados por meio da hidrólise dos glucosinolatos (GSL) sob ação da enzima mirosinase. Em condições normais, os GSL e a enzima estão fisicamente separados nas células vegetais. O processo de hidrólise acontece após dano no tecido vegetal, que pode ocorrer por corte ou mastigação, acarretando o contacto da enzima presente na própria planta com esse metabolito (Connolly *et al.*, 2021).

Essa conversão ocorre na presença de água, havendo libertação de uma molécula de glucose e formação de um intermediário, aglicona. Esse intermediário é reorganizado a partir da perda de um anião bissulfato (HSO_4^-), ocasionando assim a formação de isotiocianato, como representado na Figura 2.2.

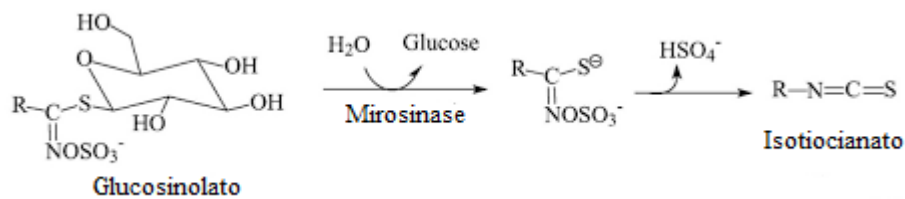


Figura 2.2 - Formação de isotiocianatos a partir de glucosinolatos por hidrólise enzimática (Adaptado de Aguiar, 2012).

Os glucosinolatos são precursores dos isotiocianatos e são encontrados na maior parte dos vegetais crucíferos, sendo responsáveis por conferir o sabor amargo e aroma picante desses alimentos (Connolly *et al.*, 2021). Estes vegetais, com quantidades relevantes de ITCs presentes na sua composição, são consumidos pelos humanos em quantidades consideráveis (até 100 miligramas de ITCs por dia) e podem conter concentrações elevadas de mais de 200 glucosinolatos de origem natural conhecidos até o momento (Dekić *et al.*, 2017).

Na Figura 2.3 são apresentadas as principais classes de isotiocianatos obtidas, por hidrólise enzimática, a partir de diferentes GSL.

Classes	Glucosinolato precursor	Produto (ITC)
Alifático	Glucorafanina (4-Metilsulfínibutil glucosinolato)	 SFN Sulforafano
Alifático	Sinigrina (2-propenil ou alil glucosinolato)	 AITC Isotiocianato de alilo
Aromático	Gluconasturcina (2-feniletíl glucosinolato)	 PEITC Isotiocianato de feniletilo
Aromático	Glucotropaeolina	 BITC Isotiocianato de benzilo

Figura 2.3 - Classes de isotiocianatos formados por hidrólise de glucosinolatos (Adaptado de Cabrita, 2014).

Alguns exemplos de vegetais ricos em ITCs são, o agrião, que é considerado a fonte mais rica de isotiocianato de feniletilo (PEITC) e o mamão, fruta na qual é encontrada o isotiocianato de benzilo (BITC). O isotiocianato de alilo (AITC) é largamente usado na indústria alimentar como conservante (Cabrita, 2014).

Além do agrião, outros vegetais crucíferos têm sido amplamente estudados devido à presença de ITCs na sua composição e as propriedades antimicrobianas e medicinais relacionadas a estes compostos (Cabrita, 2014).

Em relação a capacidade biocida dos ITCs, está descrito na literatura que a incorporação de plantas da família *Brassicaceae* no solo permite a redução do patógeno *Rhizoctonia solani* pela ação dos isotiocianatos presentes nas plantas e por incremento de microrganismos antagonistas presentes no

local como *Pseudomonas spp.* (Aguiar, 2012). Além disso, os ITCs são responsáveis pelo retardamento do processo de desnitrificação, que ocorre devido a capacidade desses compostos de ligação com proteínas, o que acarreta o aumento da disponibilidade de nitrato na planta e redução da quantidade de nitrogénio perdido por volatilização (Aguiar, 2012).

2.2 Isotiocianatos em plantas e sua atividade antimicrobiana e medicinal

A obtenção de substâncias bioativas a partir de produtos naturais tem recebido atenção crescente por parte da indústria farmacêutica uma vez que podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos e agentes antibacterianos com propriedades naturais e que acarretam menor impacto na saúde humana e no meio ambiente. As plantas são importantes fontes de substâncias bioativas com diferentes estruturas químicas e atividades biológicas diversificadas. Os metabolitos secundários, produzidos em pequenas quantidades pelos vegetais, são substâncias ativas conhecidos por exibirem uma panóplia de atividade farmacológica com propriedades quimiopreventivas, anticancerígenas e antibacterianas, sendo essas características explicitadas a seguir, em plantas como mostarda, rúcula e couve-nabo.

2.2.1 Mostarda (planta)

As mostardas são plantas dos géneros *Brassica* e *Sinapis* cujas sementes são usadas como especiarias e que por moagem e mistura com outras substâncias se transformam no condimento conhecido como mostarda.

A mostarda-branca (*Sinapis alba*), apresentada na Figura 2.4, é uma planta anual da família *Brassicaceae* amplamente cultivada na região norte da China que apresenta uma elevada quantidade de glucosinolatos, a partir dos quais se obtém, através de hidrólise, os ITCs (Peng *et al.*, 2014).



Figura 2.4 - *Sinapis alba* (Jardim Botânico UTAD, 2022).

Peng e colaboradores conseguiram isolar por processos de hidrodestilação e extração a vapor o óleo essencial da semente de mostarda-branca e posteriormente caracterizaram-no por cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS) (Peng *et al.*, 2014). O principal componente identificado no óleo de mostarda foi o isotiocianato de alilo (AITC, 71,06%). A ação antibacteriana desse composto foi avaliada por bioensaios na presença de nove bactérias (três gram-positivas e seis gram-negativas), em que os resultados detetaram atividade sobre todas as estirpes apresentando uma maior inibição para as bactérias gram-positivas. Nesse estudo também foi testado o

uso de microencapsulação do óleo por coacervação complexa com genipina (composto orgânico encontrado no jenipapo). As microcápsulas com genipina apresentaram uma elevada estabilidade química sob diferentes condições de temperatura e humidade, o que permite ampliar o potencial de utilização do AITC na preservação de alimentos (Peng *et al.*, 2014).

Vários estudos publicados na literatura sugerem que o AITC possui propriedades interessantes como agente quimiopreventivo do cancro. No entanto, em alguns trabalhos foi manifestada preocupação acerca do potencial de toxicidade deste ITC (Zhang, 2010).

No estudo desenvolvido por Zhang foi descrito que o AITC possui ação bactericida contra uma variedade de bactérias patogénicas como *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium notatum* e *Bacillus cereus*. Também foi evidenciada a atividade antifúngica desse composto perante vários fungos e leveduras, nomeadamente, *Aspergillus flavus*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium commune*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium palitans*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium solitum*. O óleo de mostarda, que tem como principal componente o AITC, foi apontado como uma das substâncias antifúngicas mais fortes entre os óleos naturais estudados (Zhang, 2010).

Andini e colaboradores, estudaram a atividade antimicrobiana de vinte e seis ITCs obtidos a partir de *Sinapis alba* (mostarda branca), *Brassica napus* (colza), *Brassica juncea* (mostarda-castanha), *Brassica oleracea* (couve) e *Camelina sativa*. Foram preparados cinco extratos a partir da extração por Soxhlet, com metanol como solvente. A composição de ITCs em cada extrato e respetiva atividade antibacteriana foram avaliadas após hidrólise enzimática com mirosinase. A atividade antibacteriana de cada um dos extratos foi testada usando *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, avaliando a concentração mínima inibitória e o efeito inibidor do crescimento (Andini *et al.* 2021).

O resultado encontrado relativamente à ação de cada extrato perante as bactérias citadas enfatizou que para uma atividade antimicrobiana eficaz a composição do extrato, ou seja, o tipo de isotiocianato presente, é mais importante que apenas a quantidade desse composto no extrato. Na Figura 2.5 é possível visualizar que os extratos das sementes de *Brassica juncea* (Bj), *Brassica oleracea* (Bo) e *Camelina sativa* (Cs) possuem uma maior concentração de ITCs com radicais alquenilo e metilsulfinilo como, por exemplo, AITC e sulforafano (SFN), o que permite obter melhores resultados contra as bactérias mencionadas do que a *Sinapis alba* (Sa) e *Brassica napus* (Bn). Esses resultados estão associados principalmente ao tipo de ITCs encontrados nessas plantas, que apresentam maior eficácia na inibição das bactérias utilizadas nesse estudo (Andini *et al.* 2021).

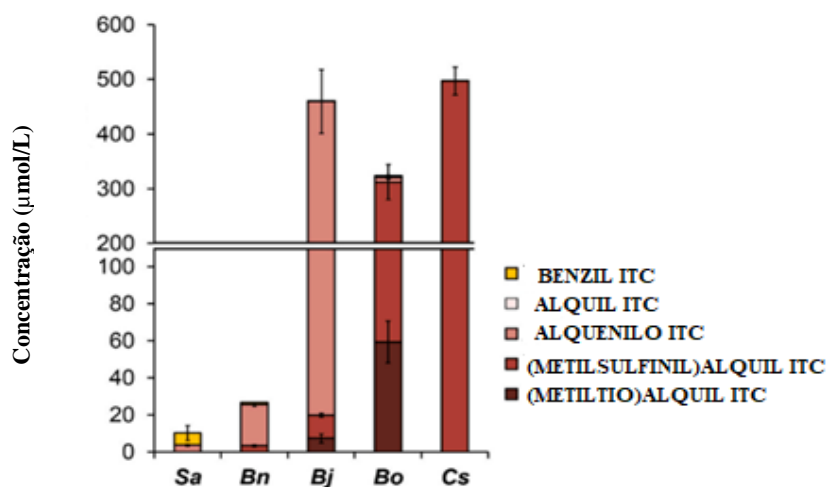


Figura 2.5 - Composição de ITCs nos extratos de sementes. Sa: *Sinapis alba*; Bn: *Brassica napus*; Bj: *Brassica juncea*; Bo: *Brassica oleracea*; Cs: *Camelina sativa*. As cores definem o grupo do ITC (Adaptado de Andini *et al.*, 2021).

2.2.2 Couve-nabo

A couve-nabo (*Brassica rapa* var. *rapifera*) é uma planta anual, da família das crucíferas, cujo caule se hipertrofia, formando um bolbo de cor verde-claro e carne branca, doce e estaladiça. As folhas são compostas por um pecíolo comprido e um vasto limbo, que partem do bolbo carnudo, como apresentado na Figura 2.6 (Bejo, 2022).



Figura 2.6 - Couve-nabo (Bejo, 2022).

Saka e colaboradores estudaram a composição química e atividade biológica da couve-nabo em amostras obtidas em três cidades diferentes na Argélia (Mostaganem, Sétif e Bouira) (Saka *et al.* 2017). Das análises realizadas à composição e propriedades dos óleos essenciais obtidos a partir das folhas e raízes desta planta foi possível verificar a presença de isotiocianatos em grande quantidade. O trabalho evidenciou que a parte da planta, sua localização geográfica e a forma de extração têm impacto direto na composição dos óleos essenciais obtidos. Na Tabela 2.1 são apresentados os ITCs presentes e sua quantidade, em percentagem, nos óleos obtidos por técnicas de extração como hidrodestilação (HD) e hidrodestilação assistida por microondas (MAHD) nas regiões mencionadas (Saka *et al.* 2017).

Tabela 2.1 - Isotiocianatos presentes nos óleos essenciais obtidos nas folhas e raízes da *Brassica rapa* var. *rapifera* (Adaptada de Saka *et al.*, 2017).

Parte da planta	Isotiocianato	HD (%)			MAHD (%)		
		Bouira	Mostaganem	Sétif	Bouira	Mostaganem	Sétif
Folhas	Isotiocianato de alilo	4,6±0,3	8,1±0,5	6,3±0,4	5,3±0,3	10,1±0,5	9,1±0,4
	Isotiocianato de butilo	-	-	-	-	0,1±0	-
	Isotiocianato de butenilo	-	-	0,1±0	0,2±0	0,1±0	0,3±0
	Isotiocianato de feniletilo	-	-	-	-	0,1±0	0,1±0
	Isotiocianato de alilo	9,5±1,0	11,3±1,0	13,7±1,0	11,1±0,9	12,5±0,8	4,4±0,9
Raízes	Isotiocianato de 2-butilo	0,1±0	0,6±0	0,2±0	0,6±0	0,2±0	0,5±0
	Isotiocianato de 3-butenilo	5,9±0,4	7,1±0,6	8,1±0,5	4,8±0,5	5,9±0,4	4,1±0,7
	Isotiocianato de feniletilo	25,7±1,7	21,9±1,5	17,6±1,7	21,6±1,8	19,4±1,7	15,8±1,6
	Isotiocianato de alilo	9,5±1,0	11,3±1,0	13,7±1,0	11,1±0,9	12,5±0,8	4,4±0,9

Por meio da Tabela 2.1 é possível verificar que o óleo essencial obtido a partir de folhas das plantas cultivadas em Mostaganem e extraído pela técnica de MAHD, possui grande quantidade de isotiocianato de alilo, o qual possui efeito antiasmático, sendo também o óleo obtido com maior quantidade de ITCs quando comparado em relação as demais regiões. O óleo essencial extraído por hidrodestilação das raízes de couve-nabo cultivadas em Bouira apresentam maior quantidade de isotiocianatos no total quando comparado as cidades de Mostaganem e Sétif (Saka *et al.* 2017).

Durante este estudo foi igualmente avaliada a atividade antioxidante e antimicrobiana das amostras recolhidas. De modo geral, os óleos essenciais obtidos a partir dessa planta são ricos em ITCs e demonstraram possuir uma vasta atividade antimicrobiana contra bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Fusarium culmorum* e *Aspergillus ochraceus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Saka *et al.* 2017).

2.2.3 *Aurinia*

A pesquisa desenvolvida por Blažević e colaboradores relata a atividade antimicrobiana de um arbusto perene com folhas amarelas da família *Brassicaceae*, a *Aurinia Sinuata* (Blažević *et al.* 2010). Essa planta pode ser encontrada na parte ocidental da península balcânica e sendo usada localmente como antisséptico para tratamento de doenças de pele.

Para isolamento dos compostos voláteis, foram usadas técnicas de hidrodestilação e extração. Os produtos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Todas as amostras continham compostos contendo enxofre e nitrogénio, onde os principais isotiocianatos produzidos por meio da degradação do glucosinolato foram isotiocianato de 5-(metiltio) pentilo (5-MTITC), isotiocianato de 4-pentenilo (4-PeITC) e isotiocianato de 5-(metilsulfinil) pentilo (5-MSITC).

O estudo realizado mostrou que todas os extratos estudados exibiram ação antimicrobiana sobre todas as estirpes testadas, nomeadamente bactérias gram-positivas como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* e microrganismos do reino fungi como *Aspergillus niger*. Os autores relacionaram a potência da atividade antimicrobiana à presença de ITCs, pois esses compostos, juntamente com nitrilos, estão presentes na maioria dos extratos testados.

Na Figura 2.7, são apresentados os diâmetros das zonas de inibição de algumas bactérias pela atividade antimicrobiana de um extrato de *Aurinia Sinuata* em diferentes concentrações (0,100; 0,250 e 0,500 mg/ disco), bem como uma comparação com a ampicilina, um antibiótico convencional. A partir da figura é possível observar uma atividade significativa na inibição de diferentes microrganismos por parte do extrato, o qual necessita de uma concentração mais elevada que a ampicilina para atingir maiores zonas de inibição, porém é proveniente de um produto natural. Tais resultados mostram que o extrato obtido a partir da *A. Sinuata* é um potencial substituinte para a ampicilina, já que esse antibiótico é obtido por uma rota química que utiliza solventes altamente tóxicos.

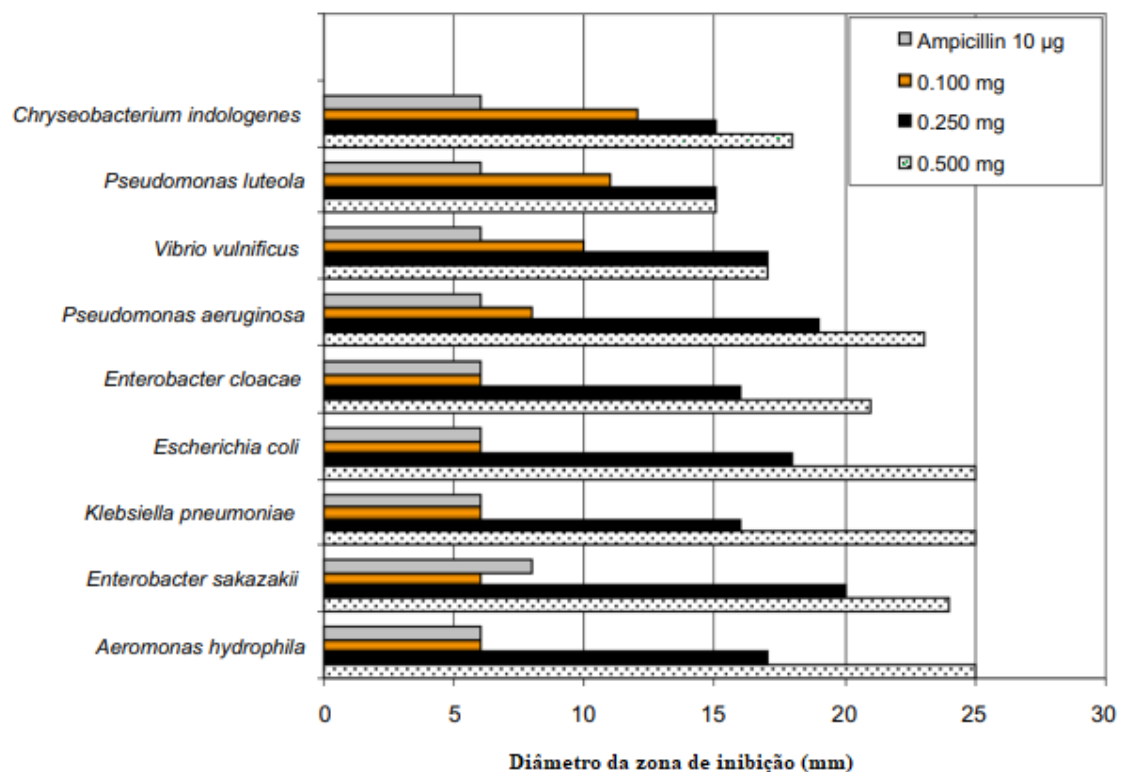


Figura 2.7 - Comparação da atividade antimicrobiana de uma amostra volátil de *A. Sinuata* com a ampicilina (antibiótico convencional) (Blažević et al., 2010).

Dentro desse mesmo género também se encontra a *Aurinia leucadea*. Esta é um subarbusto com folhas longas e flores amarelas como mostrado na Figura 2.8. Esse vegetal cresce em encostas rochosas e falésias em altitudes moderadas e baixas (Blažević et al., 2011). Essa planta encontra-se na lista de plantas em perigo de extinção, sendo assim muito rara e encontrada, maioritariamente na Croácia e em Itália (Orsenigo et al., 2019).



Figura 2.8 - *Aurinia leucadea* em Salento-Itália (Orsenigo *et al.*, 2019).

De acordo com Blažević e colaboradores, os glucosinolatos são encontrados em espécies do género *Aurinia*, como citado anteriormente. O trabalho desenvolvido por esses autores em 2011 foi implementado para verificar a capacidade antifúngica e antibacteriana do produto obtido por meio de hidrodestilação e extração por solvente, neste caso foi usado diclorometano como solvente. Os glucosinolatos foram analisados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a atividade microbiana foi mensurada na presença de três bactérias gram-positivas, três bactérias gram-negativas e três espécies de fungos (Blažević *et al.*, 2011).

A partir das análises desenvolvidas, os principais compostos voláteis obtidos foram ITCs como isotiocianato de 3-butenilo (3-BuITC), 4-PeITC e 5-MSITC. Em relação a atividade antimicrobiana, as amostras apresentaram ação contra todos os microrganismos. Os extratos foram colocados na presença de bactérias como *Bacillus cereus* (gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa), onde no contacto com a primeira foi averiguada a maior inibição entre as bactérias gram-positivas e a segunda foi definida como a mais sensível a ação do extrato, apesar da notável capacidade de resistência da *P. aeruginosa* perante diversas classes de antibióticos. Dentre os fungos expostos ao extrato de *A. leucadea*, as amostras apresentaram forte atividade, principalmente contra o crescimento de estirpes de *Penicillium sp.* Quando comparado a antibióticos como ampicilina e gentamicina, em sua maioria, obtiveram maior ação inibitória (Blažević *et al.*, 2011).

A partir de estudos prévios, os pesquisadores mencionados, reforçam a suspeita que os isotiocianatos sejam os principais inibidores da atividade microbiana, mas a amplitude da ação e sua toxicidade varia consoante a estrutura da cadeia.

2.2.3 Rúcula

A rúcula (*Eruca Sativa*) é um vegetal originário da região do Mediterrâneo da mesma família da mostarda, *Brassicaceae*. É uma hortaliça que apresenta porte baixo, folhas alongadas e coloração verde-escura. As folhas dessa planta são ricas em vitaminas A e C e sais minerais, como cálcio e ferro (Henz *et al.*, 2007). Esse vegetal é apresentado na Figura 2.9.



Figura 2.9 - Rúcula (Nascimento *et al.*, 2016).

Ao longo dos séculos a medicina tradicional tem atribuído às plantas do género *Eruca* várias propriedades terapêuticas designadamente depurativas, diuréticas, digestivas e afrodisíacas e ao óleo obtido a partir das sementes são imputadas propriedades antissépticas (Khoobchandani *et al.* 2010).

Khoobchandani e colegas estudaram as propriedades antimicrobianas de vários extratos (folhas e raízes) e do óleo da semente de rúcula. Foram preparados seis extratos orgânicos de *E. sativa* extraído com solventes de polaridade crescente (éter de petróleo, acetato de etilo e metanol), raízes ou folhas da planta. O óleo de semente *Eruca Sativa* foi obtido pelo método de extração tradicional usando água quente/vapor de água. A atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo foi testada em três bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*) e duas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*). Apesar de todos os extratos investigados terem apresentado atividade antibacteriana, o óleo extraído da semente foi o mais ativo. A concentração mínima inibitória obtida para o óleo foi semelhante à encontrada para o antibiótico de largo espectro ciprofloxacina. A ação antimicrobiana deste óleo foi associada aos ITCs bioativos presentes, como o AITC, 2-PEITC, 3-BuITC e SFN. A partir das análises implementadas nesse estudo, foi possível validar o uso desse óleo na medicina tradicional para tratamento de febre, infeções urinárias e de pele (Khoobchandani *et al.* 2010).

Em 2014, Arora e colegas avaliaram as condições de extração dos produtos hidrolíticos dos glucosinolatos existentes na semente de *Eruca Sativa*. Durante o estudo, os autores aplicaram diferentes métodos visando a obtenção de maior quantidade de compostos bioativos. Diferentes condições foram testadas como homogeneização das sementes, método de secagem dos extratos e o solvente utilizado e posteriormente os extratos obtidos foram analisados por GC-MS (Arora *et al.*, 2014).

Os resultados mostraram que a técnica mais eficiente para a obtenção dos compostos é a hidrodestilação combinada com o uso de diclorometano como solvente e secagem por evaporador rotativo. Tal metodologia obteve maior diversidade de produtos hidrolíticos que as demais, entre eles quatro tipos de isotiocianatos: isotiocianato de 4-(metiltio) butilo (4-MTITC), AITC, 3-BuITC e 5-MTITC (Arora *et al.*, 2014).

2.2.4 *Armoracia*

Armoracia é o género botânico a que pertence a raiz-forte (*Armoracia rusticana*), planta perene, herbácea, da família das Crucíferas, que apresenta folhas radicais grandes e oblongas, folhas caulinares lanceoladas, flores brancas e raízes tuberosas e que é usada como condimento pelo seu sabor picante. Um exemplo encontra-se na Figura 2.10.



Figura 2.10 - *Armoracia Rusticana* (Jardim Botânico UTAD, 2022).

As plantas do género *Armoracia* contêm glucosinolatos, cujos produtos voláteis de hidrólise são conhecidos pela sua atividade antimicrobiana. Petrovic e colaboradores analisaram pela primeira vez a composição e atividade antimicrobiana dos compostos voláteis obtidos a partir das raízes da *Armoracia macrocarpa*, uma espécie rara e ameaçada de extinção, nativa da Europa e encontrada em pântanos da bacia do Danúbio central e oriental. Os resultados obtidos foram comparados com os provenientes da *Armoracia rusticana*. Os autores associam o aroma e sabor acentuado dessas raízes à existência de isotiocianatos em sua composição, onde os compostos mais abundantes são AITC e 2-PEITC (Petrovic *et al.*, 2017).

As amostras voláteis foram obtidas por hidrodestilação e sua atividade antimicrobiana foi testada usando estirpes de bactérias gram-negativas, gram-positivas e do fungo *Candida albicans*. Em ambas as espécies de *Armoracia* as composições das amostras voláteis possuem como componentes dominantes os isotiocianatos. Nas plantas do género *Armoracia macrocarpa*, o composto mais abundante foi o 5-MTITC, já a segunda espécie tem como composto dominante o AITC (Petrovic *et al.*, 2017).

Em relação à atividade antibacteriana, a *A. Macrocarpa* apresentou inibição apenas contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, enquanto a *A. Rusticana* foi eficaz sobre todas as estirpes testadas. A fração volátil obtida a partir da *Armoracia macrocarpa* apresentaram uma atividade significativa relativamente à estirpe e isolados clínicos da *C. albicans*, indicando ser uma matéria-prima valiosa para a indústria farmacêutica (Petrovic *et al.*, 2017).

Outro estudo que avalia a atividade antimicrobiana de isotiocianatos obtidos por uma espécie de *Armoracia* é o produzido por Dekić e colegas, esse artigo se refere a um isotiocianato específico encontrado nessa raiz forte, o isotiocianato de 5-(fenil) pentilo (5-PhITC) (Dekić *et al.*, 2017).

O rábano (raiz-forte) é uma espécie resistente nativa de partes da Europa e Ásia, muito usada por seu valor nutricional e aplicada como tempero culinário. As raízes possuem aroma e sabor semelhante ao da mostarda e as suas folhas são introduzidas em saladas junto a outros vegetais. Em

alguns países, como Romênia, preparações com folhas e raízes dessa planta são usados para resolução de problemas intestinais e para manutenção da saúde (Dekić *et al.*, 2017).

Para realização das análises, amostras desse vegetal foram recolhidos em áreas de cultivo na Sérvia. O material passou por um processo de hidrólise para isolamento dos produtos de interesse e após esse procedimento a composição dos extratos foram analisados por cromatografia gasosa. Nos compostos, tanto daqueles obtidos da parte superficial quanto da parte subterrânea da planta, foram encontrados grande quantidade de isotiocianatos como BITC, 5-PhITC, ITC de 5-MTITC, dentre outros (Dekić *et al.*, 2017).

A atividade antimicrobiana foi avaliada na presença de bactérias gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e gram-negativas como *Salmonella enterica subsp. entérica serovar enteritidis* *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*, além de uma levedura, *Candida albicans* e um molde de *Aspergillus brasiliensis*. Entre estas estirpes, *B. cereus* e *P. vulgaris* foram as mais suscetíveis à ação inibitória enquanto *C. albicans* e *B. subtilis* foram as mais resistentes. A presença de 5-PhITC mostrou elevada atividade contra *P. vulgaris*, as estirpes mais resistentes a ação desse compostos foram bactérias gram-negativas como *E. coli* e *S. entérica*, bem como os fungos (Dekić *et al.*, 2017).

Segundo Dekić e colaboradores, a administração desses extratos deve ser feita com cautela devido a toxicidade associada, podendo causar tremores, dores abdominais frequentes, convulsões crônicas, perda de coordenação, dentre outros. Os autores relacionam a toxicidade do composto a presença de ITCs, com isso deve ser verificado a quantidade de isotiocianato na composição para definição da dose administrada. O extrato com menor toxicidade possuía como ITC mais abundante o AITC (Dekić *et al.*, 2017).

Apesar dos problemas ligados a toxicidade, os extratos obtidos mostraram-se capazes de inibir a atividade antimicrobiana perante as estirpes testadas. Os problemas de toxicidade podem ser contornados com um estudo da composição do extrato obtido, bem como a administração de doses corretas. Um estudo extra foi realizado pelos autores, mostrando a atividade espasmolítica das amostras, em que a presença de 5-PhITC faz com que o extrato seja um antiespasmódico, prevenindo espasmos no intestino, mais potente que o medicamento de uso padrão, papaverina (Dekić *et al.*, 2017).

2.2.5 *Moricandia arvensis*

A *Moricandia arvensis*, apresentada na Figura 2.11, é uma espécie de planta com flores violetas, pertencente à família *Brassicaceae* e pode ser encontrada em Portugal e no norte da África.



Figura 2. 11 -- *Moricandia arvensis* (Jardim Botânico UTAD, 2022).

Essa planta é rica em glucosinolatos, conferindo uma alta atividade antioxidante, por esse motivo foi objeto de estudo por Zeraib e colegas (Zeraib *et al.*, 2011).

O trabalho realizado teve como objetivo a identificação da composição dos óleos essenciais obtidos a partir da *M. arvensis*, bem como a determinação da sua atividade antibacteriana. Os óleos essenciais das folhas de amostras provenientes de Setif (Argélia) foram extraídos por hidrodestilação e sua atividade estudada pelo método de difusão de disco na presença de três culturas bacterianas, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A análise da composição dos óleos essenciais por GC-MS permitiu identificar a presença de ITCs, nomeadamente o 3-BuITC. Em relação à ação antimicrobiana, os óleos essenciais extraídos das plantas selecionadas não apresentaram atividade relevante (Zeraib *et al.*, 2011).

2.3 Isotiocianatos sintéticos

As propriedades antiproliferativas, antibacterianas e antifúngicas exibidas pelos isotiocianatos de origem natural, têm despertado o interesse da comunidade científica por esta família de compostos.

Têm sido propostos na literatura diversos métodos sintéticos para a obtenção de derivados de isotiocianatos (Janczewski *et al.*, 2021). Porém, continuam a predominar três métodos:

- Reação de Staudinger/aza-Wittig: tem início com a reação das azidas ($R-N_3$) com trifenilfosfina (PPh_3). A partir dessa reação as azidas são convertidas em intermediários de iminofosforano que a seguir reagem com dissulfureto de carbono (CS_2) obtendo-se assim, os isotiocianatos finais (Figura 2.12, rota A).
- Conversão a partir de uma amina primária numa só etapa: Tem como ponto de partida uma amina primária ($R-NH_2$), e o uso do tiofosgênio ($CSCl_2$) como reagente para propiciar a transferência do grupo tiocarbonil. Esse reagente é altamente tóxico e corrosivo e por isso tem sido substituído em muitos procedimentos por compostos como por exemplo o 1,1 – tiocarbonildiimidazol ($C_7H_6N_4S$) (Figura 2.12, rota B).
- Conversão a partir de uma amina primária em duas etapas: as aminas são convertidas a ditiocarbamatos intermediários, na presença de uma base e dissulfureto de carbono, e em seguida os intermediários passam por tratamento com um agente dessulfurizante e são então convertidos nos ITCs (Figura 2.12, rota C).

A seleção dos agentes dessulfurizantes, depende das condições reacionais e dos grupos funcionais presentes nos reagentes (Janczewski *et al.*, 2021).

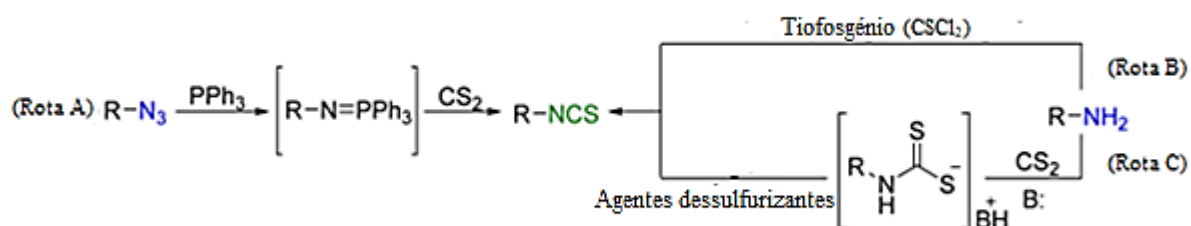


Figura 2. 12 - Rotas para síntese de isotiocianatos (Adaptado de Janczewski *et al.*, 2021).

Num estudo realizado por Janczewski e colaboradores é descrita a síntese de diversos isotiocianatos alifáticos e aromáticos com o auxílio de micro-ondas, assim como a preparação de derivados de ITCs de aminoácidos naturais e sintéticos. A síntese “one-pot” foi realizada usando como agente dessulfurização o 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il) -4-metilmorfolino tolueno-4-sulfonato (DMT/NMM/TsO⁻). Com o uso deste reagente obteve-se rendimentos elevados (72-96%), sendo também considerado mais seguro para o meio ambiente (Janczewski *et al.*, 2021). Os ITCs preparados, bem como os rendimentos obtidos são apresentados nas Figuras 2.13 a 2.16 (Janczewski *et al.*, 2021).

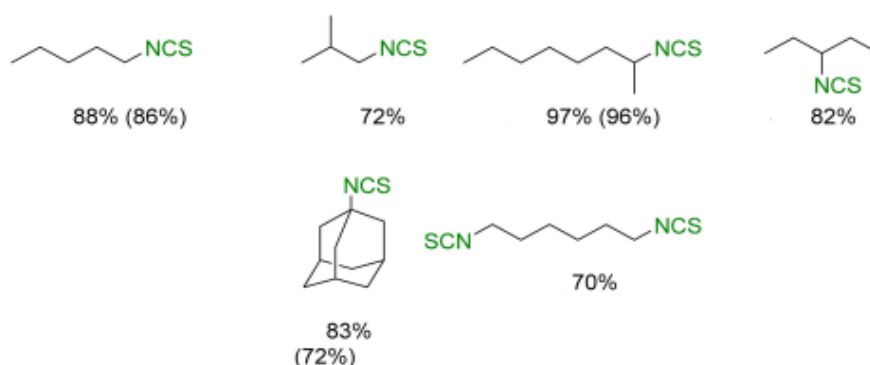


Figura 2. 13 - Isotiocianatos alifáticos e seus rendimentos (valores entre parênteses correspondem aos rendimentos obtidos usando água como solvente) (Adaptado de Janczewski *et al.*, 2021).

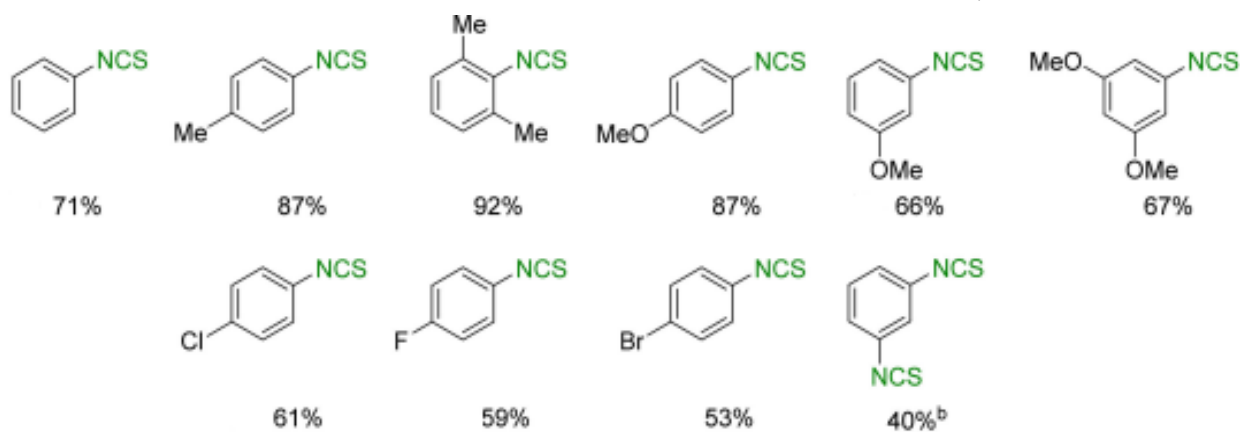


Figura 2. 14 - Isotiocianatos aromáticos e seus rendimentos (Adaptado de Janczewski et al., 2021).

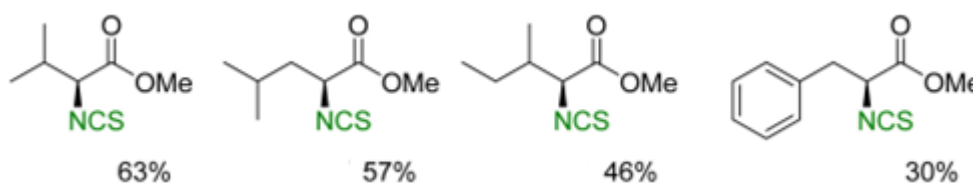


Figura 2. 15 - Isotiocianatos derivados de aminoácidos naturais (Adaptado de Janczewski et al., 2021).

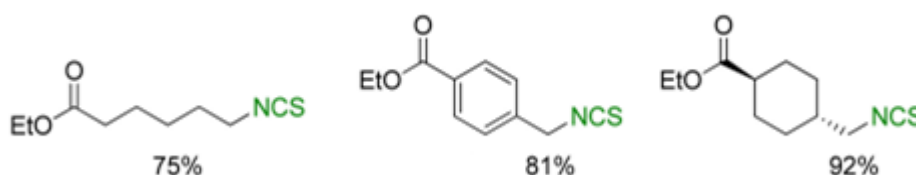


Figura 2. 16 - Isotiocianatos derivados de aminoácidos naturais (Adaptado de Janczewski et al., 2021).

A partir dos resultados obtidos os autores concluíram que esse agente dessulfurizante produz bons resultados, obtendo uma ampla gama de ITCs com elevada pureza usando procedimentos sintéticos rápidos e simples. Mostraram também que o uso de água como solvente proporciona rendimentos ligeiramente menores que aqueles encontrados com o uso de diclorometano (Janczewski et al., 2021).

Os métodos tradicionais de síntese de isotiocianatos envolvem maioritariamente a utilização de dissulfeto de carbono, fosgénio e tiosfógenio que são todos muito tóxicos. De forma a mitigar este problema e possibilitar a síntese de ITCs de uma forma ambientalmente mais benigna, Liao e colegas propuseram a utilização do reagente de Langlois (NaSO_2CF_3 , trifluorometanosulfinato de sódio) que é estável e barato (Liao et al., 2017). O reagente de Langlois demonstrou ser eficiente na preparação de isotiocianatos a partir de aminas primárias na presença de iodeto de cobre (catalisador) e fosfonato de dietilo (agente desoxigenador). Foram testados diferentes solventes, como tolueno, etanol e tetraidrofurano (THF), sendo que os melhores rendimentos foram alcançados com uso de tolueno. A partir dessa reação foram obtidos vinte e nove ITCs com rendimentos satisfatórios (30 – 85%). No entanto, os autores evidenciam a necessidade da investigação de um mecanismo de reação mais detalhado (Liao et al., 2017).

2.4 Isotiocianatos sintéticos vs. naturais

Os isotiocianatos de origem natural ou sintética podem ser usados para tratamento de pragas no solo e são objetos de pesquisas com intuito de elevar as opções de produtos alternativos aos de uso convencional, a fim de reduzir as emissões de possíveis poluentes do solo para o ar, atendendo assim as regulamentações vigentes (Ashworth et al., 2014).

Na agricultura, os agentes de fumigação sintéticos são comumente usados para o controle de pragas antes do plantio, propiciando uma cultura de alto rendimento. Um dos pesticidas usados nesse setor é o isotiocianato de metilo (MITC) sintético (Ashworth et al., 2014).

O uso dessas substâncias obtidas por vias naturais ainda não é tão difundido quanto as opções sintéticas pois, os ITCs sintéticos apresentam melhores resultados quando comparados com os obtidos a partir de produtos naturais, devido as melhorias já realizadas no seu processo de obtenção, alcançando uma libertação eficaz e degradação mais lenta no solo, o que garante maior grau de confiabilidade no processo de controlo implementado (Ashworth et al., 2014).

De acordo com Ashworth e colaboradores, apesar do MITC proporcionar um controlo eficaz de pragas, possui (tal como outros agentes de fumigação sintéticos) potencial poluente, pois em contato com o solo quente volatilizam e são libertados para a atmosfera. Essa emissão atmosférica pode ser reduzida pelo uso de lonas plásticas na região de aplicação ou por meio da impermeabilização do solo (Ashworth *et al.*, 2014).

A biofumigação usando ITCs naturais é feita usando vegetais crucíferos como culturas de rotação no solo em questão, inserindo plantas frescas e moídas como adubo, ou a partir da incorporação de material vegetal processado rico em glucosinolatos, como farinhas. Esse material então sofre uma transformação química no solo para disponibilizar os isotiocianatos necessários para o controlo de microrganismos (Ashworth *et al.*, 2014).

Outras vantagens associadas ao uso dessas fontes naturais de ITCs são, a melhoria da textura do solo, maior capacidade de retenção de água por meio da adição dos vegetais dos quais os isotiocianatos são obtidos, estimulação do aprimoramento da estrutura da comunidade microbiana no solo, aumento da disponibilidade de nutrientes e minimização da compactação do solo (Ashworth *et al.*, 2014).

No trabalho produzido por Arianie e colaboradores, os autores tentaram projetar compostos de ITC a partir do eugenol e cinamaldeído e comparar sua atividade antimalárica com a cloroquina e ITCs naturais obtidos da *M. Oleifera*. Nas Figuras 2.17 e 2.18 são apresentadas as estruturas moleculares dos compostos mencionados (Arianie *et al.*, 2021).

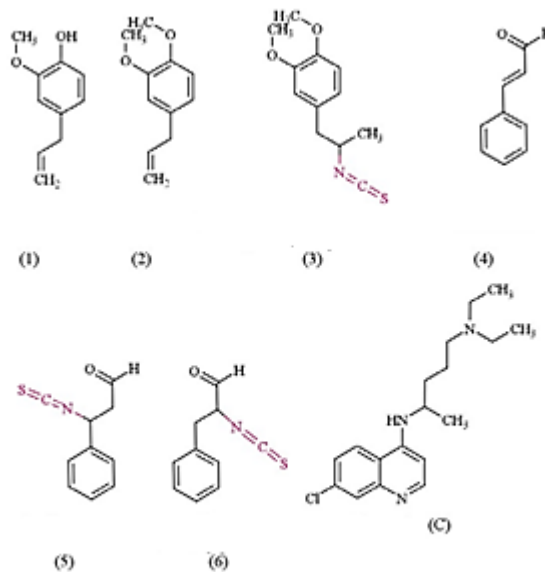
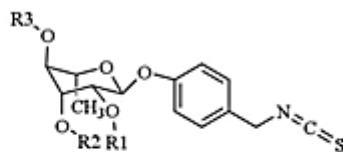


Figura 2.17 - Estrutura molecular dos ITCs projetados e compostos-base onde: 1: Eugenol; 2: Metil-eugenol; 3:4-(ITC de 2-propilo)1,2-dimetoxi-benzeno; 4: cinamaldéido; 5: 3- ITC de 3-fenilpropanal; 6: 2-ITC de 3-fenilpropanal e C: cloroquina (Arianie et al.,2021).



- (7): 4-(α -L-rhamnosyloxy)BITC ($R_1, R_2, R_3=H$).
 (8): 4-(2'-O-acetil- α -L-rhamnosyloxy) BITC ($R_2, R_3=H$; $R_1=Acetato$).
 (9): 4-(3'-O-acetil- α -L-rhamnosyloxy) BITC ($R_1, R_3=H$; $R_2=Acetato$).
 (10): 4-(4'-O-acetil- α -L-rhamnosyloxy) BITC ($R_1, R_2=H$; $R_3=Acetato$).

Figura 2.18 - Estrutura molecular dos ITCs encontrados na *Moringa Oleifera*, onde (Arianie et al., 2021).

Os isotiocianatos sintéticos 3 e 6 (Figura 2.17), possuem toxicidade de risco médio, e foram considerados promissores para inserção no tratamento da malária. Já em relação aos ITCs naturais, os compostos apresentam efeitos mutagénicos e carcinogénicos de risco médio, enquanto a cloroquina, medicamento de referência usado no tratamento desta doença, tem alto risco mutagénico (Arianie et al., 2021).

O trabalho realizado por Arianie e colaboradores permitiu concluir que o eugenol e cinamaldeído podem ser utilizados como *building blocks* na preparação de isotiocianatos e os produtos dessa síntese apresentam potencial para o tratamento da malária (Arianie et al., 2021).

Manelli e colegas investigaram alguns isotiocianatos sintéticos e naturais como novos dadores de gasotransmissor (classe de neurotransmissores capazes de influenciar sinais entre células nervosas) de sulfureto de hidrogénio terapêutico que contribui em diferentes processos patológicos e fisiológicos, e podem ser capazes de atuar para redução da dor neuropática induzida por quimioterapia. Os ITCs estudados estão apresentados na Figura 2.19, sendo que o isotiocianato de fenilo (PhITC) e o

isotiocianato de 3- carboxifenilo foram obtidos por síntese. Para estudo do perfil farmacológico, os compostos foram administrados em camundongos que foram tratados com medicamentos semelhantes aos usados em processos quimioterápicos, como oxaliplatina (Manelli *et al.*, 2017).

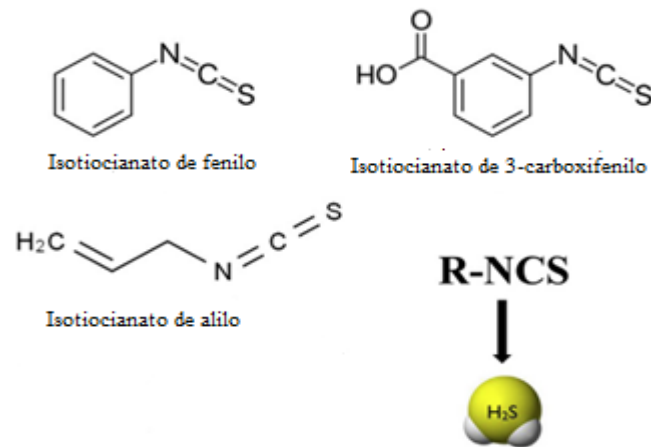


Figura 2. 19 - Isotiocianatos usados para tratamento da dor neuropática (Adaptado de Manelli *et al.*, 2017).

A inserção dos novos dadores de sulfureto de hidrogénio à base de isotiocianatos mostrou-se eficaz a partir dos testes realizados em animais. Foi verificado alívio considerável da dor nos modelos de camundongos com dor neuropática induzida por fármacos anticancerígenos. Os isotiocianatos apresentaram efeito semelhante a medicamentos de uso clínico comum, como duloxetine (medicamento usado em doenças como fibromialgia e dor neuropática), sendo administrados em doses muito menores (Manelli *et al.*, 2017).

A partir dos estudos aqui mencionados foi possível concluir que os ITCs tanto sintéticos como naturais são capazes de contribuir em diferentes setores, seja para tratamento de doenças ou para controlo de pragas, gerando opções alternativas aquelas de uso comum. Os ITCs sintéticos são usados de modo mais abrangente pois a seleção de produtos naturais ainda precisa de modificações para o alcance de resultados equiparáveis a nível de eficácia e produtividade (como no caso da agricultura), porém atentam-se aos cuidados com o meio ambiente, o que tem chamado ainda mais atenção do consumidor, que busca por mercadorias de “selo verde” e, no caso de medicamentos, produtos que sejam de origem natural, que ao curar uma doença não acarretem efeitos colaterais.

2.5 Atividade biológica de isotiocianatos

O cancro é uma das principais causas de mortes no mundo, com isso a busca por novas estratégias de tratamento e prevenção é crescente. O consumo de vegetais crucíferos vem sendo apontado por estudos epidemiológicos como um dos meios de prevenção de cânceros de próstata, ovário e mama (Gupta *et al.*, 2014).

No corpo humano, compostos fitoquímicos como os ITCs, obtidos através da alimentação, tem a capacidade de inibir a ativação de substâncias carcinogénicas pois propiciam o equilíbrio entre as enzimas de fase I e enzimas de fase II. Essas enzimas de fase I ativam carcinógenos e as enzimas de fase II inibem as enzimas de fase I e auxiliam no metabolismo de compostos estranhos ao corpo (xenobióticos) prevenindo a ação cancerígena. Um dos vegetais que apresenta essa capacidade é o

brócolo, sendo apontado com um dos alimentos que ajudam a reduzir o risco de cancro de mama (Manchali *et al.*, 2012).

Além de atuarem como bloqueadores da atividade carcinogénica, os isotiocianatos têm ação quimiopreventiva, evitando a bioativação de carcinogéneos na fase inicial (Cabrita, 2014).

Manchali e colaboradores apontam que a ingestão de vegetais ricos em isotiocianatos proporcionou proteção contra cancro de pulmão em mulheres na China e reduziu significativamente o cancro ativo em indivíduos fumantes e não-fumantes. Estudos citados por esses autores apontam que apenas o consumo de vegetais crucíferos é capaz de prevenir cancro de próstata e seus sintomas, sendo que brócolo e couve-flor são considerados os mais eficazes em tal ação. Também é mencionado o papel dos ITCs em relação ao diabetes tipo II, existindo menor incidência de aparecimento da doença em pessoas que consumiam mais alimentos contendo tais compostos. A prevenção de obesidade e doenças do trato respiratório são também apontadas, além do efeito antimicrobiano contra bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Manchali *et al.*, 2012)

Os isotiocianatos como PEITC, BITC, AITC e o SFN, são compostos vastamente investigados tanto para fins quimiopreventivos como quimioterápicos. O BITC, por exemplo, pode ser encontrado em vegetais como agrião, repolho e couve-flor. Estudos apontam que essa substância é capaz de atuar contra o crescimento do tumor pancreático por meio da inibição de moléculas-chave necessárias para o desenvolvimento da doença (Gupta *et. al.*, 2014).

No estudo desenvolvido por Dinh e colegas foi relatada as atividades cancerígenas do BITC contra 14 tipos de cancro, mencionados na Figura 2.20, onde o gráfico representa a quantidade de publicações relacionadas a capacidade preventiva e inibitória do BITC sobre essas doenças, o seu uso é maioritariamente citado em tratamentos de cancro de mama (27%) e cancro do pâncreas (19%) (Dinh *et al.*, 2021).

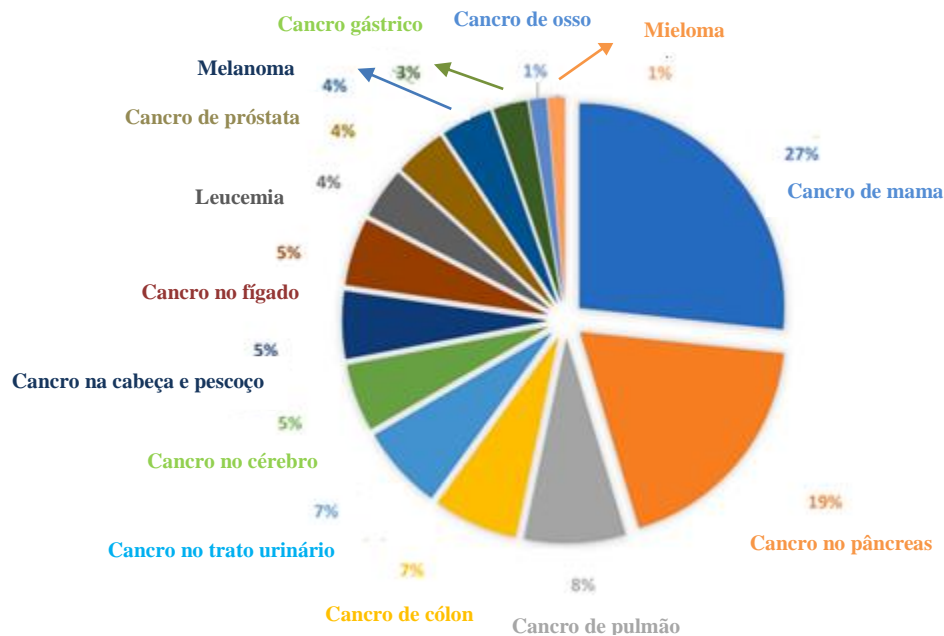


Figura 2. 20 - Publicações relacionadas ao uso do BITC no tratamento de 14 tipos de cancro (Adaptado de Dinh *et al.*, 2021).

Esse estudo apontou que o BITC pode ser usado efetivamente como agente anticancerígeno em concentrações que não apresentam toxicidade aos tecidos normais, com efeitos adversos não

observados até um consumo humano diário de cerca 400-570 mg. Quando comparado a outros isotiocianatos, como SFN e PEITC, o BITC apresentou um efeito citotóxico mais profundo, maior eficácia na cicatrização de feridas e efeitos protetores contra diversos tipos de cancro. O PEITC mostrou-se mais eficiente que o BITC na prevenção de metástases ligadas ao cancro de pulmão (Dinh *et al.*, 2021).

Os fitoquímicos mencionados atuam sobre vias de inibição do crescimento e proliferação de células cancerígenas, indução da apoptose, inibição da angiogénese, e do ciclo celular e evita a formação de metástases, o que facilita o tratamento e reduz a possibilidade de agravamento do estado do paciente (Gupta *et. al*, 2014).

Além disso, alguns isotiocianatos podem ser usados como corantes para marcação de imunoglobulinas em biosistemas, como o isotiocianato de fluoresceína (Liao *et al.*, 2017).

O trabalho concebido por Arianie e colaboradores propõe o uso dos ITCs na criação de um medicamento novo para tratamento da malária, uma doença transmitida por mosquitos e endémica em regiões tropicais e subtropicais, devido ao clima húmido e com temperaturas elevadas, que proporcionam a sobrevivência das larvas do mosquito. A necessidade da busca de medicamentos alternativos aos comumente usados como a cloroquina, vem do fato de que o tratamento com multi-drogas leva a resistência aos fármacos e mortalidade, além dos elevados custos (Arianie *et al.*, 2021).

2.6 Estudos de aprimoramento dos isotiocianatos

2.6.1 Encapsulamento

A formação de complexos de inclusão tem como intuito a diminuição da volatilidade e/ou o aumento da solubilidade, estabilidade, proteção contra condições externas, como fotodegradação, além da redução da toxicidade.

A seleção do agente encapsulante utilizado deve basear-se em critérios como características físicas e químicas do composto bioativo a encapsular (porosidade, solubilidade), tipo de aplicação pretendida (pesticida, fármaco) e na metodologia de encapsulamento escolhida (Harbs, 2019). O agente encapsulante escolhido atua como uma “molécula hospedeira” possibilitando a obtenção de complexos de inclusão com diversas “moléculas hóspedes” de polaridade reduzida e com dimensões inferiores às cavidades da “molécula hospedeira” (Figura 2.21).

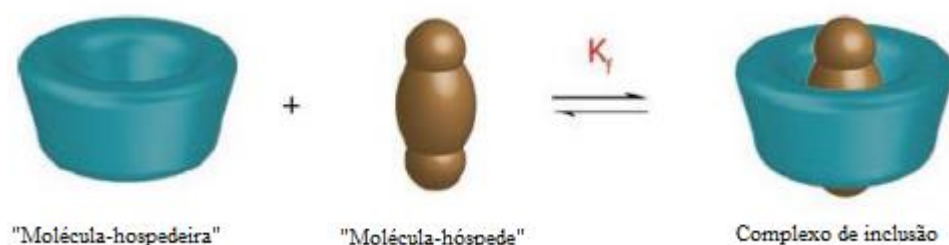


Figura 2. 21 - Formação do complexo de inclusão (Adaptado de Harbs, 2019).

Os compostos comumente usados para esse processo são as ciclodextrinas.

2.6.1.1 Ciclodextrinas

A ciclodextrina é um composto orgânico cíclico que é obtido através da degradação do amido pela ação de uma enzima, a ciclodextrina glicosiltransferase. O fato de ser hidrofóbico no interior e hidrofílico no exterior confere a esse composto a característica necessária para seu uso no encapsulamento (Delagustin, 2021).

Essa propriedade faz com que esse composto seja amplamente usado para melhoria da hidrossolubilidade aparente e estabilidade de substratos, além de possibilitar o transporte de fármacos até um alvo terapêutico dependendo do caso em estudo (Delagustin, 2021).

Quando se trata de óleos essenciais, tal característica faz com que a estabilidade química do óleo seja mantida, reduz a volatilidade, proporciona uma libertação controlada, além de proteger a substância de fatores como luz e temperatura. Porém, a libertação do composto em condições controladas dependerá de outros elementos como equilíbrio entre o composto encapsulado e a ciclodextrina usada, a humidade relativa e a temperatura ambiente (Quinta, 2016).

As ciclodextrinas naturais, produzidas pela ação direta de microrganismos, são denominadas α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, onde a β -ciclodextrina é a mais utilizada, devido sua capacidade de encapsulamento com maior variedade de compostos. As estruturas químicas das ciclodextrinas estão representadas na Figura 2.22 (Oliveira, 2012).

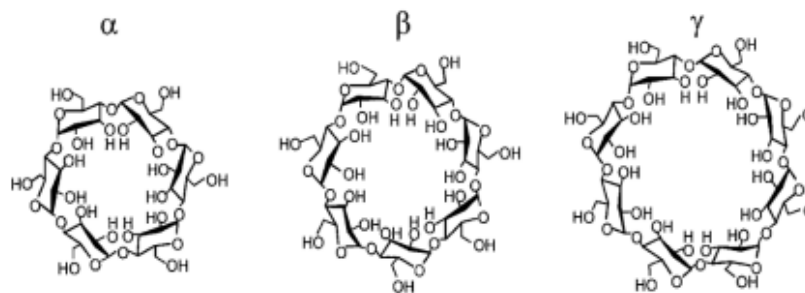


Figura 2. 22 - Estruturas químicas das ciclodextrinas comumente usadas para encapsulamento (Oliveira, 2012).

Algumas propriedades físico-químicas desses compostos estão apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2. 2 - Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais comumente usadas (Adaptada de Amaro, 2019).

Propriedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Diâmetro interno da cavidade (Ångstrom (Å))	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	14,6	15,4	17,5
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	472
Altura (Å)	7,9	7,9	7,9
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água à 25°C (mg/mL)	14,5	1,85	23,2

A β -Ciclodextrina (β -CD) é produzida, por via biotecnológica, em maior quantidade e seu uso é fomentado pela sua alta disponibilidade e baixo custo de produção (Delagustin, 2021). Além disso, a utilização da β -CD é aprovada como excipiente para formulações de uso oral (Amaro, 2019).

Devido a solubilidade limitada em água, as ciclodextrinas naturais possuem limitações para sua aplicação como solubilizante e agente complexante. A β -CD apresenta a menor solubilidade dentre as CDs naturais, como mostrado na Tabela 2.2, no entanto é muito aplicada em estudos de complexação, pois possui um tamanho de cavidade adequado para a formação de complexos com grande quantidade de moléculas bioativas (Amaro, 2019).

A baixa solubilidade em água da β -CD deve-se a formação de ligações de hidrogénio intramoleculares entre os grupos hidroxilos secundários, formando um anel completo, tais interações propiciam uma estrutura inflexível e com capacidade reduzida de obter ligações intermoleculares com as moléculas de água do meio. Isso não ocorre nas outras duas variações de CD mencionadas, proporcionando maior solubilidade aos tipos alfa e gama (Delagustin, 2021).

Também é possível encontrar ciclodextrinas derivadas das naturais, podendo ser hidroxialquiladas, iónicas, ramificadas e poliméricas (Dias, 2018). A inserção de substituintes em um ou mais grupos hidroxilo promove uma desestabilização no anel formado para o caso da β -CD, resultando em maior solubilidade em água. Alguns exemplos de derivados mais solúveis que a β -CD são, nomeadamente, hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) e metil- β -ciclodextrina (M- β -CD), no entanto a adição de substituintes apolares pode ocasionar na redução da hidrossolubilidade do composto (Delagustin, 2021).

A modificação da β -CD pela substituição de 6-OH da sua estrutura por grupos hidroxipropil proporcionou o surgimento da HP- β -CD, um modelo de ciclodextrina com maior solubilidade (>600 mg/mL a 25°C) e menor toxicidade por via intravenosa em relação a molécula precursora (Figura 2.23) (Amaro, 2019).

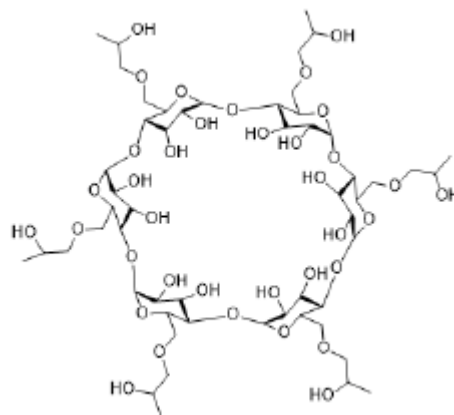


Figura 2. 23 - Estrutura química da HP- β -CD (Amaro, 2019).

Outra ciclodextrina modificada usada em estudos de complexação é a metil- β -CD, cuja estrutura química está representada na Figura 2.24. Esta molécula é um derivado de β -CD altamente solúvel em água, possuindo uma solubilidade de 800 g/L em água a 25°C, e também apresenta boa solubilidade em metanol, etanol, acetona, piridina, dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (Harbs, 2019).

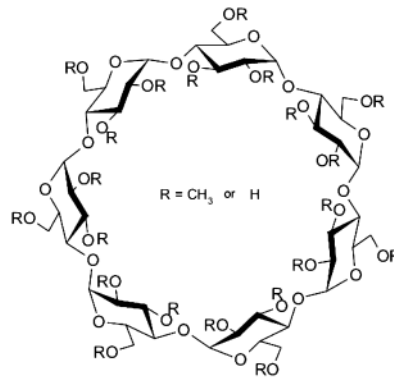


Figura 2. 24 - Estrutura química da metil- β -ciclodextrina (Crupi *et al.*, 2013).

A utilização de ciclodextrinas para encapsulação molecular apresenta vantagens do ponto de vista tecnológico e biológico, considerando que permite a modificação das propriedades físicas e químicas dos compostos de forma simples e com menor custo quando comparado a outros métodos (Veiga e Figueiras, 2012).

Uma das principais aplicações dos complexos de inclusão formados por ciclodextrinas é o aumento da solubilidade aparente dos substratos. Esses complexos formam agregados hidrossolúveis em soluções aquosas com habilidade de incorporar moléculas lipídicas através da formação de estruturas micelares. Esse efeito torna possível a obtenção de soluções para administração oral e intravenosa a partir de moléculas com solubilidade reduzida (Carvalho, 2013).

Esses compostos também tem a capacidade de elevar a estabilidade, propiciada pelo estabelecimento de ligações não-covalentes (eletrostáticas, hidrófobas e pontes de hidrogénio) com macromoléculas. Essas ligações oferecem proteção contra desidratação, hidrólise, oxidação e fotodecomposição, entre outros, contribuindo para a extensão do prazo de validade dos produtos. No caso dos fármacos, o aumento da solubilidade e da estabilidade tem influência sobre a biodisponibilidade, onde a elevação desses dois fatores faz com que a percentagem de fármaco que chega ao local de absorção seja maior (Carvalho, 2013).

O estudo realizado por Siva e colaboradores visualizaram nos complexos de inclusão com ciclodextrinas a possibilidade de remover as limitações dos óleos essenciais derivados de plantas, sendo tais problemas ligados a baixa solubilidade em água e volatilidade. A metil- β -ciclodextrina foi então aplicada na formação do complexo de inclusão com os componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais, nomeadamente, cinamaldeído e isoeugenol. Os resultados obtidos foram promissores, onde o complexo formado foi capaz de superar as limitações anteriormente mencionadas, elevando a solubilidade e estabilidade do óleo essencial, e além disso, alcançar melhor atividade antioxidante e antibacteriana (Siva *et al.*, 2020).

As ciclodextrinas estão inseridas em diferentes ramos da indústria, nomeadamente, na indústria alimentar, cosmética e de higiene pessoal, farmacêutica e agroquímica (Rodrigues, 2013).

2.6.1.2 Diagramas de solubilidade de fases

Um diagrama de solubilidade de fases, ou curva de solubilidade de fases, é utilizado para avaliação do complexo formado no procedimento de encapsulamento, após a inserção do composto hóspede na cavidade da molécula de ciclodextrina.

Tal metodologia foi proposta por Higuchi e Connors consistindo em uma das técnicas mais

usadas para caracterização de complexos de inclusão em solução (Higuchi e Connors, 1965). Esses complexos de inclusão são formados por meio da preparação de soluções com diferentes concentrações de ciclodextrina na qual são inseridas o composto de interesse, em excesso na mistura reacional (Piletti, 2016).

Na figura 2.25 é apresentado um exemplo de um diagrama de solubilidade de fases (Rodrigues, 2013).

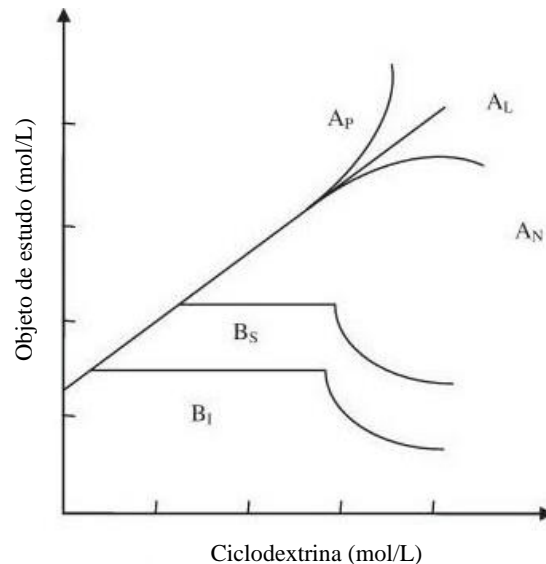


Figura 2. 25 - Diagrama de solubilidade de fases (Adaptado de Rodrigues, 2013).

Esse gráfico representa a mudança da solubilidade do substrato em concentrações crescentes de ciclodextrina, a partir do qual é possível determinar a formação do complexo, definir o tipo de complexo obtido e realizar o cálculo da constante de estabilidade (K), sendo estas realizadas após o alcance do equilíbrio reacional.

Os diagramas de solubilidade (Figura 2.25) podem ser divididos em duas categorias, A e B. As curvas do tipo A, são obtidas quando ocorre formação de complexos de inclusão solúveis e as curvas do tipo B indicam a obtenção de complexos de baixa solubilidade (Piletti, 2016). Dentro dos tipos citados existem subdivisões, sendo as curvas A subdivididas em A_P , A_L e A_N , onde estas indicam, respetivamente, desvio isotérmico negativo, aumento linear da solubilidade com a concentração de CD e desvio isotérmico negativo. As curvas de baixa solubilidade são subdivididas em B_S e B_I , onde a primeira sugere um complexo com solubilidade limitada, enquanto a segunda indica a obtenção de um produto insolúvel (Rodrigues, 2013).

Quando o diagrama de solubilidade apresenta um comportamento linear (perfil A_L), uma estequiometria 1:1 é alcançada, indicando que o complexo é de primeira ordem em relação à ciclodextrina e de primeira ordem ou superior em relação ao objeto de estudo. O perfil A_P é encontrado se o complexo de inclusão formado é de primeira ordem em relação ao substrato e de segunda ordem ou mais em relação à CD. Os perfis que apresentam desvio isotérmico negativo (A_N) possuem interpretação complexa considerando a multiplicidade de fenómenos que podem ocorrer para que seja atingido (Zornio, 2013).

Para os complexos com baixa solubilidade aquosa, em alguns casos inferior a solubilidade da molécula hospedeira em água, causando precipitação durante o encapsulamento, obtém-se os perfis do tipo B. O perfil B_S , contido nessa categoria, apresenta um crescimento progressivo da solubilidade

aparente do composto encapsulado em concentrações baixas de CD, até atingir o ponto máximo de solubilidade. O outro perfil associado ao tipo B, apresenta curvas que não apresentam elevação da solubilidade do substrato (Zornio, 2013).

Além de proporcionar a definição do tipo de complexo formado, a partir das categorias mencionadas, o diagrama de solubilidade de fases permite uma análise quantitativa do complexo obtido, sendo realizada pelo cálculo da constante de estabilidade, calculada de acordo com a Equação 2.1.

$$K = \frac{m}{S_0(1-m)} \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde S_0 é a solubilidade do substrato na ausência de ciclodextrina, ou seja, a ordenada na origem apontada pela equação da reta do diagrama de solubilidade e m indica o declive (Rodrigues, 2013).

A curva de solubilidade de Higuchi e Connors é largamente usada devido a sua capacidade de determinação da efetividade das interações substrato-ciclodextrina e por se tratar de um método simples e que fornece diversas informações acerca da natureza do complexo formado.

A avaliação do encapsulamento com ciclodextrina pode ser feita por meio de inúmeros métodos, através dos quais é possível obter informações quantitativas e qualitativas, capazes de caracterizar um complexo em termos de estequiometria e geometria.

As técnicas usualmente aplicadas são espectrofotometria no ultravioleta visível (UV/Vis), ressonância magnética nuclear (RMN), ensaios eletroquímicos, microscopia de força atômica (AFM), microscopia de varrimento por efeito túnel (STM), espectrofluorimetria, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por espectroscopia de massa e detecção do índice de refração (Rodrigues, 2013).

2.6.1.3 Outros métodos de encapsulamento

Além das ciclodextrinas, outras nanoformulações usadas são micelas, lipossomas e nanopartículas poliméricas. Sendo também capazes de proporcionar uma distribuição uniforme e controlada, aumentar a estabilidade, direcionar os compostos a sítios específicos, além de incorporar substâncias hidrofílicas e lipofílicas. Tais atributos, no caso de fármacos, elevam a eficiência terapêutica, reduz o número de administrações necessárias e minimiza a toxicidade (Dias, 2018).

Os lipossomas são formados por associações coloidais de lipídeos organizados em vesículas esféricas microscópicas de tamanho variável. Um dos lipídeos mais usados para formação desse complexo é a fosfatidilcolina, pois apresenta elevada estabilidade diante de alterações de pH ou concentração de sal no meio, além da formação de uma camada estável em solução aquosa. Esse componente é biodegradável e imunogénico, o que lhe confere alta biocompatibilidade, característica que o coloca como único nanossistema autorizado para administração intravenosa. A utilização desse tipo de encapsulamento para medicamentos terapêuticos diminui a dosagem necessária e aumenta a sua eficácia (Dias, 2018).

Outra nanoformulação comumente usada que pode ser aplicada para encapsulamento são as micelas poliméricas, essas são constituídas por uma cadeia hidrofílica e outra hidrofóbica. O composto a ser encapsulado encontra-se na parte hidrofóbica, possibilitando a incorporação de substâncias com baixa solubilidade em água, essa seção também é responsável pela estabilidade e libertação do composto transportado. A camada hidrofílica propicia o isolamento do componente interno do

ambiente externo aquoso, evitando assim a captura da estrutura pelo sistema imunitário (Dias, 2018).

Nanopartículas poliméricas também podem ser usadas como complexo de inclusão, esse aglomerado de polímeros biodegradáveis possui propriedades terapêuticas e maior estabilidade em fluidos biológicos incitando cada vez mais estudos que promovam sua aplicação (Encinas-Basurto, 2017).

2.6.2 As vantagens do encapsulamento dos isotiocianatos

Alguns isotiocianatos necessitam de uma estrutura protetora para atingir os resultados esperados com sua aplicação. Essa necessidade está ligada à sua baixa solubilidade em água e elevada volatilidade, condições que limitam seus potenciais usos, acarretam a redução de suas atividades antibacterianas e inviabilizam sua utilização como agentes bioativos eficazes. Na Tabela 2.3, estão apresentadas as solubilidades em água de alguns isotiocianatos.

Tabela 2. 3 - Solubilidade de ITCs em água e solventes nos quais esses compostos apresentam elevada solubilidade (PubChem, 2022).

Composto	Solubilidade em água	Solventes mais eficazes
Isotiocianato de benzilo	Muito baixa ($7,30 \times 10^{-4}$ mol/L)	Etanol
Isotiocianato de alilo	Muito baixa (0,02 mol/L)	Benzeno, éter etílico e etanol
Isotiocianato de feniletilo	Muito baixa ($6,74 \times 10^{-4}$ mol/L)	Etanol e heptano

Um exemplo é BITC, um fitoquímico lipofílico que tem elevado potencial anticancerígeno, no entanto, é instável em solução aquosa, principalmente em ambientes alcalinos com elevadas temperaturas. Devido a isso, parte considerável do conteúdo de BITC é perdido durante processos de cozimento, fazendo com que sua biodisponibilidade no vegetal ingerido seja entre 14 a 50% apenas (Tang *et al.*, 2020).

O trabalho desenvolvido por Tang e colegas propõe um sistema de emulsão para melhoria da estabilidade física do BITC. As emulsões possuem elevada interface óleo-água e baixa estabilidade, acarretando desemulsificações em dadas condições, o que faz com que sua aplicação seja limitada e não indicada para uso em alimentos (Tang *et al.*, 2020). Para correção do problema apresentado, os autores desse estudo utilizaram gelatina, substância amplamente usada como estabilizador em indústrias de alimentos.

Para verificar a possibilidade do uso desse estabilizador para criação de uma emulsão eficaz para a entrega de compostos bioativos lipofílicos durante as digestões *in vitro* e *in vivo*, foi utilizada a gelatina de pele de peixe como emulsionante para fabricação de emulsões óleo-água estáveis enriquecidas com BITC. Tal estudo aponta que a gelatina de pele de peixe pode ser usada como emulsionante, possibilitando maior estabilidade da emulsão rica em BITC e desempenhando um papel crucial no destino biológico dos substratos das digestões *in vivo* e *in vitro*. As emulsões à base de gelatina também mostraram taxas de retenção e biodisponibilidade mais elevadas que a emulsão de referência, preparada com Tween 20, surfactante não iônico comumente usado como emulsionante. Os resultados alcançados nesse estudo são importantes para a formulação de novos alimentos funcionais, onde foi atingida uma absorção intestinal máxima de BITC de $10,15 \times 10^{-3}$ cm/min (Tang *et al.*, 2020).

Dias e colaboradores implementaram um estudo com o objetivo de desenvolver embalagens, à

base de alginato de sódio e celulose incorporada com complexo AITC- β -CD, para salame italiano (Dias *et al.*, 2009). A incorporação de compostos antimicrobianos a esses filmes poliméricos de origem natural é de grande importância, gerando uma alternativa aos materiais de uso tradicional e trazendo consigo a preocupação com o meio ambiente e com a saúde do consumidor. Com essa ideologia, o AITC mostra-se como candidato perfeito, sendo um componente volátil extraído do óleo de mostarda e vegetais crucíferos como couve-flor e repolho. O isotiocianato de alilo possui atividade antioxidante e adiciona à embalagem potencial antimicrobiano frente a diversos microrganismos, prevenindo a proliferação de bactérias e deterioração dos alimentos (Dias *et al.*, 2009).

Devido a elevada volatilidade do AITC é necessário o encapsulamento do composto para evitar perda durante o processo, como é verificado no caso apresentado, com o uso da ciclodextrina. Comprovando as características previamente citadas da ciclodextrina como complexo de inclusão, os autores concluíram que o método usado para inserção do AITC foi eficiente, possibilitando a retenção e liberação controlada do AITC, acrescentando características antioxidantes e antimicrobianas ao alimento (Dias *et al.*, 2009).

A potencial aplicação dos isotiocianatos na indústria de embalagens alimentares é restringida pela sua natureza volátil e baixa estabilidade térmica. Nesse segmento, Shin e colegas implementaram um estudo com o objetivo de avaliar a capacidade do complexo de inclusão formado entre o AITC e dois tipos de ciclodextrinas, β -CD e triacetil- β -ciclodextrina (TA- β -CD). Após o encapsulamento do AITC, o seu desempenho como composto ativo de liberação lenta através de uma matriz de polietileno de baixa densidade foi verificado. O complexo AITC-TA- β -CD incorporado em polietileno de baixa densidade mostrou-se eficaz para uso em embalagens antimicrobianas alimentícias e não alimentícias, pois ofereceram uma liberação de AITC mais consistente e com concentração mais elevada que aquela verificada no complexo obtido com β -CD, alcançada pela maior estabilidade térmica do TA- β -CD (Shin *et al.*, 2019).

Outros estudos usando ciclodextrina para encapsulamento de ITCs apontaram que essa estrutura foi capaz de proporcionar estabilidade térmica, redução da volatilidade, inibição da decomposição em fase aquosa, diminuição da reação dos compostos com íons OH⁻ e aumento da solubilidade de alguns isotiocianatos como AITC e PhITC (Dias, 2018).

Li e colaboradores realizaram a preparação e caracterização do complexo de inclusão formado entre o BITC, extraído da semente do mamão papaya, e a β -ciclodextrina, alcançando resultados promissores por meio dessa metodologia. Com a formação do complexo BITC- β -CD, a solubilidade aquosa, a estabilidade e a capacidade de liberação controlada foram consideravelmente aprimoradas. Tais constatações evidenciam que a tecnologia de complexação com ciclodextrina é uma abordagem interessante que promoveria a expansão do uso do BITC como agente antibacteriano em alimentos. Para preparação do complexo, a mistura BITC- β -CD foi inserida em banho ultrassônico (100 Watts) e permaneceu sob agitação durante 3 horas a 30°C, por fim manteve-se as amostras no escuro à temperatura ambiente durante 24 horas. A constante de estabilidade aparente obtida nesse estudo foi de 600,8 L/mol (Li *et al.* 2015).

Outro artigo direcionado para a formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e isotiocianato de benzilo foi o publicado por Uppal e colegas. Considerando o potencial anticancerígeno e antimicrobiano do BITC, os autores desse estudo evidenciaram a necessidade da superação de obstáculos como baixa solubilidade e alta volatilidade, para que esse composto seja inserido de forma ampla em fármacos e biocidas. Com esse objetivo, os autores prepararam complexos de inclusão de BITC com ciclodextrinas, nomeadamente β -CD e HP- β -CD. O estudo foi realizado em diferentes temperaturas (25 °C, 30 °C e 37 °C) usando excesso de BITC e diferentes concentrações de β -CD e HP- β -CD (4 - 20 mM), as amostras foram agitadas durante 24 horas a 850 rpm e centrifugadas

por 15 minutos antes de serem analisadas. Os resultados alcançados nesse estudo foram satisfatórios, obtendo constantes de solubilidade variando entre 151-391 L/mol para complexos formados com β -CD e 115-278 L/mol para complexos formados com HP- β -CD, mostrando que o complexo formado atinge uma maior solubilidade e menor volatilidade, além de manter as propriedades antimicrobianas do BITC livre (Uppal *et al.*, 2017).

Os complexos de inclusão com ciclodextrinas também são formados com intuito de alcançar uma libertação controlada do composto para inibição de algumas bactérias patogénicas. No estudo desenvolvido por Liu e colaboradores verificou-se a possibilidade do desenvolvimento de complexos entre a γ -CD e três isotiocianatos, nomeadamente, BITC, PEITC e MTITC (ITC de 3-(metiltio)propilo) para aprimorar a libertação controlada desse composto para inibição de *Staphylococcus aureus*. Após análises sobre os complexos formados, o BITC- γ -CD proporcionou um tempo maior de atividade inibitória quando comparado aos demais, cerca de 6 dias a mais que os complexos formados entre os outros dois ITCs testados. Esses autores também verificaram o tempo de atividade entre o BITC- γ -CD e o BITC puro, onde o complexo mostrou um efeito antibacteriano mais duradouro sobre a bactéria testada. As barreiras da alta volatilidade do BITC também foram ultrapassadas com o encapsulamento (Liu *et al.*, 2021).

Outra aplicação dos complexos formados entre isotiocianatos e ciclodextrinas foi apresentada por Cai e colegas. Esses autores apontaram o complexo AITC- β -CD como alternativa promissora aos conservantes de uso comum para proteção de produtos por derivados da madeira. Por meio desse estudo foi evidenciada a aplicabilidade do AITC encapsulado com β -ciclodextrina como conservante, obtendo uma elevada resistência ao apodrecimento acarretado por fungos e redução da perda de massa dos painéis de madeira onde o conservante foi testado, com perda de massa abaixo de 7%. Tais resultados mostram que a substituição de conservantes convencionais por produtos alternativos com potencial obtenção por vias naturais é viável, possuindo capacidades de atuação semelhantes aos comumente utilizados (Cai *et al.*, 2020).

Além do encapsulamento com ciclodextrinas, o uso de soluções micelares contendo isotiocianato de alilo se mostraram eficazes sobre células tumorais, intensificando a ação do composto por meio da potencialização dos efeitos citotóxicos (Almeida, 2016).

No estudo realizado por Encinas-Basurto e colaboradores um copolímero biodegradável, nomeadamente o poli (ácido láctico-*co*-glicólico) (PLGA) conhecido por sua utilização em uma variedade de dispositivos terapêuticos por ter elevada biodegradabilidade e biocompatibilidade, foi usado para encapsulamento do isotiocianato de alilo. Tal complexo se mostrou um sistema promissor de ministração, promovendo uma degradação lenta, proteção contra nucleófilos, diminuição da volatilidade associada ao AITC, além disso fez com que a ação antitumoral do composto fosse prolongada (Encinas-Basurto, 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é descrito os procedimentos experimentais aplicados no decorrer desse estudo, sendo aqui contemplados os procedimentos utilizados para os ensaios de fotorreatividade e encapsulamento, bem como, as condições selecionadas e o composto usado para aplicação dos métodos.

3.1 Planeamento experimental

3.1.1 Composto selecionado para estudo

O composto selecionado para esse estudo foi o isotiocianato de benzilo (BITC) com fórmula molecular C_8H_7NS e massa molar de 149,21 g/mol.

O isotiocianato de benzilo em sua forma nativa é um líquido oleoso e hidrofóbico, com forte odor e de fácil degradação, além de apresentar elevada volatilidade (Feltes, 2021). Tais características levaram à escolha desse composto para o presente estudo, pois a partir dos métodos a seguir apresentados foi possível definir se a degradação desse composto estava ligada a exposição a luz visível e também verificar o potencial aumento de sua solubilidade por meio da formação de complexos com ciclodextrinas, já que é um composto fortemente hidrofóbico.

A escolha do BITC também está associada ao elevado número de estudos sobre esse composto, devido suas propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, anti-helmíntica e propriedades medicinais, em especial sua atividade anticancerígena (Feltes, 2021).

O BITC foi adquirido à Sigma-Aldrich Química S.A. (Algés, Lisboa).

3.1.2 Materiais e equipamentos utilizados

Para pesagem de todos reagentes, recorreu-se a uma balança analítica da marca Kern & Sohn GmbH (Balingen, Alemanha), modelo ABJ-NM/ABS-N.

Na medição de volumes realizada no decorrer dos ensaios, foram usadas micropipetas de capacidade variável (1 – 5 mililitros (mL), 10 – 100 microlitros (μ L), de 100-1000 μ L) da marca VWR (Carnaxide, Portugal). Para a filtração das soluções referentes ao ensaio de encapsulamento, foram utilizados filtros de seringa Chromafil, modelo Xtra PTFE 45/25 com uma porosidade de 0,45 micrómetros (μ m) da marca Macherey-Nagel GmbH e Co. (Loures, Portugal).

Nos estudos relativos à encapsulação foi usado um agitador orbital, marca IKA (Staufen, Alemanha), modelo KS 4000 I Control. Para auxiliar na dissolução das soluções, utilizou-se um banho de ultrassons da marca VWR USC (Carnaxide, Portugal), modelo 100TH. Também foi utilizado para otimização do método de encapsulamento o ultrassom da marca J.P Selecta FA,195 Watts (Barcelona, Espanha) para efeito de comparação com as análises realizadas apenas com uso de agitador orbital.

O espectrofotómetro de UV/VIS é da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), UV-1800-240V IVDD. A aquisição de dados foi realizada usando o software “UVProbe 2.42” instalado num computador ligado ao espectrofotómetro.

Para os ensaios de fotorreatividade, foi usada a câmara de fotorreatividade da marca Aralab

(Rio de Mouro, Portugal), modelo FITOCLIMA S600PL.

3.2 Estudo da fotorreatividade do BITC

Para que o uso de um composto seja considerado seguro para administração em biocidas ou fármacos é necessário definir se tal substância não apresenta fototoxicidade, seja para o ambiente em que está inserido ou para saúde humana, uma vez que estes produtos serão expostos a luz ambiente possibilitando a ocorrência de reações fotoquímicas.

A fototoxicidade é uma resposta tóxica que ocorre quando uma amostra contendo produtos químicos fotoativos, também nomeados fotorreativos, é exposta à luz solar. Essa reação fotossensível pode ser categorizada como fotoirritação (reação aguda semelhante a uma queimadura solar após exposição à uma substância fotorreativa), fotoalergia (reação imunológica que ocorre após diversas exposições à um fotoquímico) e fotogenotoxicidade (resposta genotóxica após exposição a um produto químico por fotoexcitação direta do ADN (ácido desoxirribonucleico) ou por excitação indireta de produtos fotorreativos) (OECD, 2019).

O potencial fototóxico de um produto está relacionado a suas propriedades fotoquímicas, em especial a sua capacidade de absorção de luz em comprimentos de onda entre 290-700 nanômetros. Com isso, a diretriz ICH (Diretiva do Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano) S10 indica a análise do espectro de absorção de luz UV-Vis na faixa de comprimentos de onda citada para avaliação da potencial fototoxicidade de uma substância, obtendo assim a absorvidade molar do composto. A diretriz ICH S10 sugere que para um produto com absorvidade molar inferior a 1000 L/mol*cm não há necessidade da realização de outras avaliações de fotosegurança, pois poucos produtos químicos fototóxicos apresentam valor citado (OECD, 2019).

O resultado obtido nessa análise deve ser combinado a outros sistemas de rastreio com objetivo de evitar falsas definições, nomeadamente a avaliação da fotorreatividade dos compostos através do ensaio de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) (OECD, 2019). O ensaio de ROS possui baixa especificidade, podendo gerar falsos positivos para fototoxicidade, pois os mecanismos ligados a essa propriedade não se baseiam apenas na geração de espécies reativas de oxigénio. A substância analisada pode ser fotoativada e reagir diretamente com proteínas ou ADN, o que ocasionará uma ação fototóxica (Aguiar, 2018). Um composto definido como não-fotorreativo nesse ensaio indica que a probabilidade de uma substância ser fototóxica é baixa, entretanto se o resultado definir o composto como fotorreativo é necessário realizar uma avaliação mais detalhada da substância em questão (Freitas, 2016).

Na literatura não são encontrados dados sobre os efeitos da radiação UV/Vis sobre os isotiocianatos. No presente estudo, a avaliação da fotoreatividade foi realizada, de acordo com a diretriz ICH S10, através do estudo da absorvidade molar para verificar o potencial fotorreativo do composto estudado (OCDE, 2019). Em seguida, para complementação dos resultados encontrados no teste anterior foi implementado o ensaio de ROS, largamente introduzido para detetar o oxigénio singlete (1O_2) e o anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerados através de fotoirradiação química, pois são as principais espécies de oxigénio reativo produzidas em uma reação fototóxica (Aguiar, 2018).

3.2.1 Absortividade molar

A absorvidade molar, também conhecida como coeficiente de extinção molar (MEC), é uma

propriedade intrínseca das substâncias e pode ser definida como a capacidade que uma determinada substância possui em absorver luz a um determinado comprimento de onda. A absorvidade molar depende de diversos fatores, tais como a substância em questão, o comprimento de onda utilizado, bem como a temperatura e o solvente nos quais a substância se encontra dissolvida. Segundo a lei de Beer-Lambert, mostrada na Equação 3.1, a absorvância (A) de uma amostra depende da espessura da célula em que está contida a substância – percurso ótico – (l) e da concentração (C) da substância.

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (\text{Equação 3.1})$$

O espectro de absorção do composto estudado foi determinado na faixa de 290-700 nm, de acordo com a norma OECD *Test Guideline 101* (OECD, 2019). O BITC foi dissolvido em DMSO para obter uma concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ e os espectros de absorção foram medidos usando cuvets de quartzo transparentes ao UV (percurso ótico = 10 mm). O espectro foi corrigido considerando a absorção específica do solvente. A absorvidade molar foi calculada usando o pico de máxima absorção (*Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10*, 2013).

3.2.2 Ensaio de ROS

O protocolo de ensaio de ROS e os estudos de validação foram realizados de acordo com o procedimento descrito na literatura (Aguiar, 2018). As soluções-mãe de todas as substâncias testadas foram preparadas na concentração de 10 mM em DMSO e usadas no mesmo dia, protegidas da luz.

A análise da formação de oxigénio singleto (SO) foi detetada por medição espectrofotométrica, a 440 nm, da diminuição da absorvância de uma solução de *p*-nitrosodimetilanilina (RNO) usando imidazol como um aceitador seletivo de SO. As amostras, contendo a substância testada (200 μM), RNO (50 μM) e imidazol (50 μM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (NaPB, pH 7,4), foram colocadas num tubo, agitadas e colocadas num banho de ultrassons, protegidas da luz, durante 10 minutos. A mistura foi transferida para uma célula de quartzo Hellma. Em seguida, as amostras foram irradiadas usando uma câmara climática e simulador solar Fitoclima S600PL (Aralab, Portugal), equipada com oito lâmpadas UV-Vis Repti Glo (20 W), durante 90 min a 25°C. Após irradiação, a absorvância foi lida novamente a 440 nm. A análise da formação de anião superóxido (SA) foi realizada observando a redução de azul de nitro-tetrazólio (NBT) a monoformazan (NBT⁺), que pode ser determinada espectrofotometricamente a 560 nm. Amostras contendo os compostos testados (200 μM) e NBT (50 μM) em 20 mM NaPB foram irradiadas, e a redução do NBT foi medida pelo aumento da absorvância a 560 nm da mesma maneira que para a determinação de SO. As experiências foram realizadas em triplicado.

Como o simulador solar utilizado era diferente dos modelos recomendados, foi necessário validar as condições de irradiação. O ensaio ROS foi realizado para garantir que as condições de irradiação satisfizessem os critérios recomendados usando um controlo positivo (quinino) (Aguiar, 2018).

De acordo com o resultado (média das determinações em triplicado) do ensaio ROS, as substâncias testadas são classificadas como fotorreativas quando se obtém um valor SO igual a 25 ou superior e/ou um valor SA 20 ou superior; por sua vez, a substância é considerada não fotorreativa quando são registados valores inferiores a 25 para SO e inferiores a 70 para SA (Aguiar, 2018).

O quinino e o dimetilsulfóxido usados neste procedimento foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich Química S.A.

3.3 Estudo da complexação do BITC com diferentes ciclodextrinas

3.3.1 Escolha do solvente

Uma vez que o BITC é pouco solúvel em água, inicialmente realizou-se um estudo do solvente a usar para a preparação da curva de calibração. Os dados disponíveis na literatura mostram que o BITC é solúvel em etanol, pelo que se optou por usar como solvente uma mistura etanol/água. Para otimizar a proporção da mistura etanol:água a usar como solvente, preparou-se uma solução-mãe de BITC 10 mM em etanol. Por diluição da solução-mãe prepararam-se quatro soluções com concentrações de 0,2mM em BITC, usando como solvente diferentes proporções de etanol:água (Tabela 3.1).

Tabela 3. 1 - Soluções preparadas a partir da solução-mãe para definição do solvente.

Solução	% etanol na mistura
1	100
2	80
3	60
4	50

Traçaram-se espectros de cada uma das soluções preparadas entre os comprimentos de onda 200 a 400 nm, e suas absorvâncias máximas determinadas.

3.3.2 Curva de calibração

Para obtenção da curva de calibração, foi preparada uma solução intermédia, com concentração de 1 mM de BITC em etanol.

A partir da solução intermédia prepararam-se 6 soluções padrão usando como solvente uma mistura etanol-água (60:40).

As concentrações das soluções padrão, bem como a quantidade de etanol e água adicionada são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2 - Preparação de soluções padrão para obtenção da curva de calibração.

Padrão	Volume da solução intermédia (mL)	Concentração de BITC (mol/L)	Volume de etanol (mL)	Volume de água (mL)
1	2,00	$2,00 \times 10^{-4}$	4,00	4,00
2	1,50	$1,50 \times 10^{-4}$	4,50	4,00
3	1,00	$1,00 \times 10^{-4}$	5,00	4,00
4	0,76	$7,50 \times 10^{-5}$	5,24	4,00
5	0,50	$5,00 \times 10^{-5}$	5,50	4,00
6	0,25	$2,50 \times 10^{-5}$	5,75	4,00

Mediu-se as absorvâncias de todas as soluções preparadas a 245,5 nm e construiu-se, a partir dos valores obtidos, a curva de calibração representando Absorvância vs Concentração de isotiocianato. Esse procedimento foi realizado em triplicado.

3.3.3 Estudo da complexação do BITC com diferentes ciclodextrinas

Tendo em consideração a literatura encontrada, para o estudo de solubilidade do BITC, foram usados dois métodos de preparação do complexo de inclusão, um deles foi implementado com o uso de ultrassons e agitador orbital (método I) e o outro, só com agitador orbital (método II) (Li *et al.*, 2015; Uppal *et al.*, 2017; Piletti, 2016).

Método I: Preparou-se uma solução-mãe de HP- β -CD com uma concentração de 30 mM.

Na sequência, para três matrizes de 25 mL foram preparadas três soluções com excesso de BITC (30 mg) em soluções de ciclodextrina entre 0 mM e 30 mM (Tabela 3.3). De seguida os matrizes foram revestidos com papel de alumínio e colocados num banho de ultrassons à 195 Watts e temperatura de 30°C durante 3 horas.

Tabela 3. 3 - Preparação das soluções para ensaio de solubilidade (Método I).

Solução	Massa de BITC pesada (g)	CD (mM)	Volume de CD (mL)	Volume de água (mL)
A	0,030	0	0	10,00
B		10,0	3,40	6,60
C		30,0	10,00	0

De seguida, as soluções foram agitadas num agitador orbital, a 100 rpm à temperatura ambiente, durante 48 horas.

Em períodos definidos, retiraram-se alíquotas destas soluções, filtraram-se com filtros de 0,45 μ m e, depois de uma diluição conveniente, determinou-se a concentração de BITC presente em cada uma delas recorrendo à curva de calibração.

Método II: Analogamente ao ensaio anterior, preparou-se primeiramente três soluções com concentrações de 0, 10 e 30mM em ciclodextrina (HP- β -CD) com BITC (30 mg) (Tabela 3.4).

Tabela 3. 4 - Preparação de soluções para ensaio de solubilidade (Método II).

Solução	Massa de BITC pesada (g)	CD (mM)	Volume de CD/30mM (mL)	Volume de água (mL)
A	0,030	0	0	10,00
B		10,0	3,40	6,60
C		30,0	10,00	0

Em seguida levaram-se as soluções mencionadas a agitação nas mesmas condições do estudo anterior, mas desta vez sem utilização prévia do ultrassons e alíquotas foram diluídas e analisadas em espectrofotómetro UV-Vis em períodos definidos.

Uma vez que os resultados obtidos por ambos os métodos não foram significativamente diferentes, optou-se por realizar o estudo mais detalhado usando o método II.

Deste modo, repetiu-se o procedimento descrito anteriormente usando soluções com concentração de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mM em ciclodextrina (HP- β -CD ou M- β -CD).

Na Tabela 3.5, apresenta-se a quantidade de BITC pesada, os volumes de CD 30 mM e o volume de água colocados em cada recipiente para os dois tipos de CD utilizados.

Tabela 3. 5 - Preparação de soluções para o estudo da solubilidade usando o método II para cada uma das CD.

Solução	Massa de BITC pesada (g)	HP- β -CD (mM)	Volume de CD (mL)	Volume de água (mL)
A	0,030	0	0	10,00
B		5,00	1,70	8,30
C		10,0	3,40	6,60
D		15,0	5,00	5,00
E		20,0	6,70	3,30
F		25,0	8,40	1,60
G		30,0	10,00	0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com objetivo de avaliar a fotorreatividade do BITC e definir se esse composto apresenta ou não potencial fototóxico, foram efetuados os ensaios para determinação da absorvidade molar e o ensaio de ROS. Também foi realizado um estudo da complexação do BITC com ciclodextrinas, usando dois derivados de β -ciclodextrina, a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e a metil- β -ciclodextrina (M- β -CD). Os resultados alcançados para os estudos mencionados estão dispostos nas seções a seguir.

4.1 Estudo da Absortividade molar do BITC

De acordo com a ICH, a condição primária para avaliação do potencial fotorreativo é se um composto absorve fótons em qualquer comprimento de onda entre 290 – 700 nm. Um composto que possua uma absorvidade molar (ϵ) superior a 1000 L/mol*cm na faixa de comprimentos de onda mencionada, é considerado suficientemente fotorreativo para resultar em fototoxicidade direta (*Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10*, 2013). O espectro de absorção do BITC, usando como solvente o DMSO, foi traçado entre os comprimentos de onda de 290 – 700 nm (Figura 4.1).

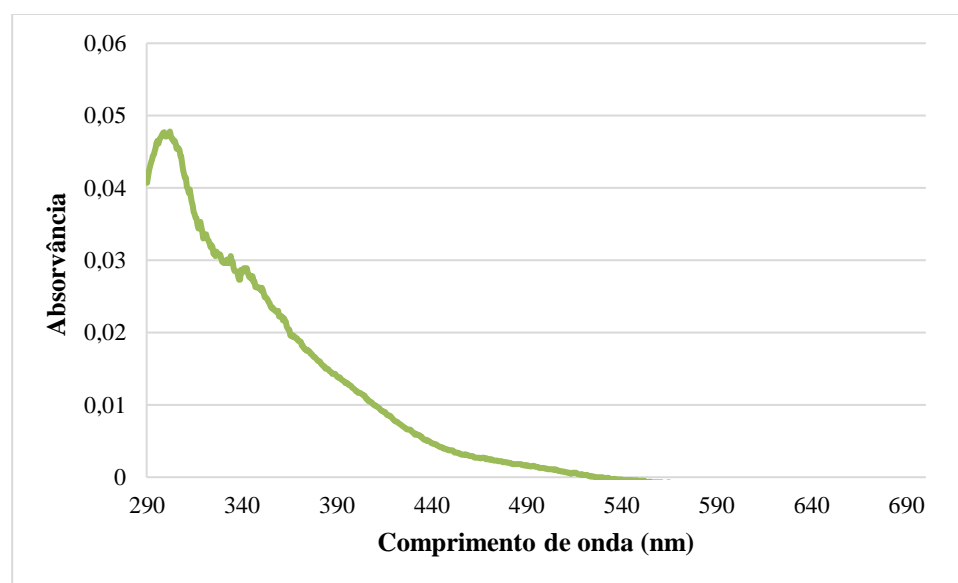


Figura 4. 1 - Espectro de absorção do BITC entre os comprimentos de onda 290-700nm.

O resultado obtido permitiu concluir que o BITC não absorve radiação na gama de comprimentos de onda estudada.

Apesar dos resultados obtidos não indicarem a existência de grupos cromóforos, decidiu-se continuar com o estudo uma vez que o BITC pode eventualmente sofrer fragmentação fotoinduzida, devido à presença do grupo isotiocianato, e potencializar a ocorrência de fototoxicidade.

4.2 Ensaio ROS

O ensaio de ROS requer inicialmente a definição das condições experimentais necessárias para o estudo, visando garantir que tal procedimento atenda os critérios recomendados, usando para isso um controlo positivo, que é usado como referência para as análises subsequentes (OCDE, 2019).

O controlo positivo testado para esse estudo foi o quinino, comumente aplicado na otimização do ensaio de ROS, a partir do qual se valida o método utilizado caso o resultado obtido para este composto se encontre dentro dos valores de referência. Para o quinino os valores esperados neste ensaio são os dispostos na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1 - Faixas de valores aceitáveis no ensaio de ROS para o quinino (OCDE, 2019).

Valores de referência para o quinino (controlo positivo)	
SO	319 a 583
SA	193 a 385

Neste estudo a geração de SO foi determinada por meio do cálculo da redução da absorvância de RNO (*p*-nitrosodimetilanilina) a 440 nm, utilizando a Equação 4.1 (OCDE, 2019).

$$\text{Diminuição } A_{440} = [A_{440}(-) - A_{440}(+) - (a - b)] \times 1000 \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde o sinal (-) corresponde a absorvância antes da exposição à luz, o sinal (+) à absorvância após exposição à luz UV/Vis e a e b, indicam o branco antes e depois da exposição à luz.

Para o SA a geração foi calculada pela Equação 4.2 (OCDE, 2019), tendo em conta o aumento da absorvância em 560nm como consequência da formação de NBT+ (monoformazan).

$$\text{Aumento } A_{560} = [A_{560}(+) - A_{560}(-) - (b - a)] \times 1000 \quad (\text{Equação 4.2})$$

O ensaio com o quinino (controlo positivo) foi efetuado e o resultado obtido após um tempo de exposição de 2:30 horas foi de 449 e 265 para o SO e o SA, respetivamente. Em qualquer dos casos, os resultados obtidos para o quinino se encontram dentro do intervalo aceitável, indicando as condições experimentais são as adequadas para o ensaio ROS.

O mesmo ensaio foi realizado para o BITC. Os valores obtidos para os testes estão dispostos na Tabela 4.2. As absorvâncias obtidas para o controlo positivo e para o BITC pode ser visualizado no Anexo B.

Tabela 4. 2 - - Resultados obtidos para cada composto usando o ensaio de ROS.

Composto	SO	SA	Fotorreatividade
BITC	10	3	Não fotorreativo

De acordo com a literatura, uma substância é considerada fotorreativa, se o valor de SO for ≥ 25 e/ou o valor de SA ≥ 70 (Figura 4.2) (OECD, 2019).

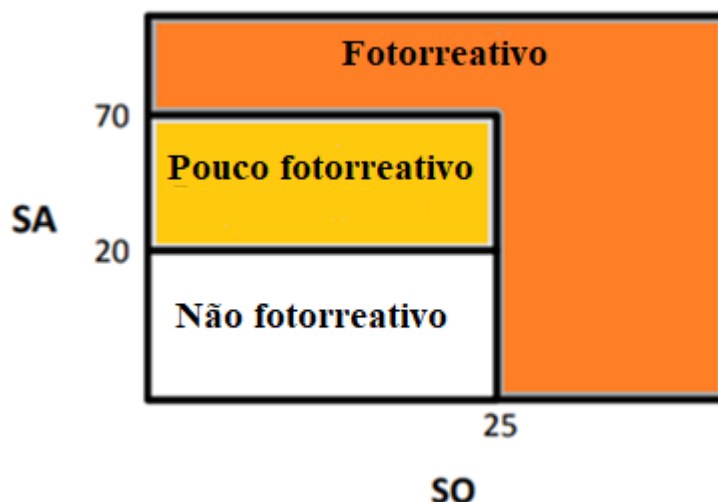


Figura 4. 2 - Critério para definição de produtos fotorreativos para o ensaio de ROS (Adaptado OECD, 2019).

A partir dos resultados especificados na Tabela 4.2, o BITC mostra-se não-fotorreativo, ou seja, não induz a geração de espécies de oxigénio (SO e SA) quando exposto à luz UV-Vis nas condições de análise utilizadas no ensaio de ROS. Esse resultado é coerente com os dados obtidos anteriormente relativos à absorvância molar e sugerem que o BITC não apresenta potencial fototóxico.

4.3 Estudo da complexação do BITC com diferentes ciclodextrinas

Com objetivo de analisar a complexação do isotiocianato de benzilo com ciclodextrinas em meio aquoso, efetuaram-se ensaios de solubilidade de acordo com o procedimento descrito por Higuchi e Connors (1965). O presente estudo foi realizado com duas CD, HP- β -ciclodextrina e Metil- β -ciclodextrina, e em cada caso foram medidas as absorvâncias das soluções, com auxílio de espectrofotometria UV-Vis, à temperatura ambiente.

4.3.1 Escolha do solvente

Foram traçados os espectros de soluções de BITC 0,2 mM preparadas em solventes contendo diferentes proporções de etanol:água (secção 3.3.1). Os resultados obtidos indicaram que proporções de água acima de 40% acarretariam em uma diminuição da absorvância quando comparado a solução com 100% de etanol, no qual o BITC é completamente solúvel. Assim, a mistura etanol:água (60:40) foi usada como solvente nos estudos posteriores. Na Figura 4.3 é apresentado o espectro da solução de BITC usando como solvente a mistura etanol:água (60:40), os espectros obtidos para as demais proporções testadas estão dispostos no Anexo A.

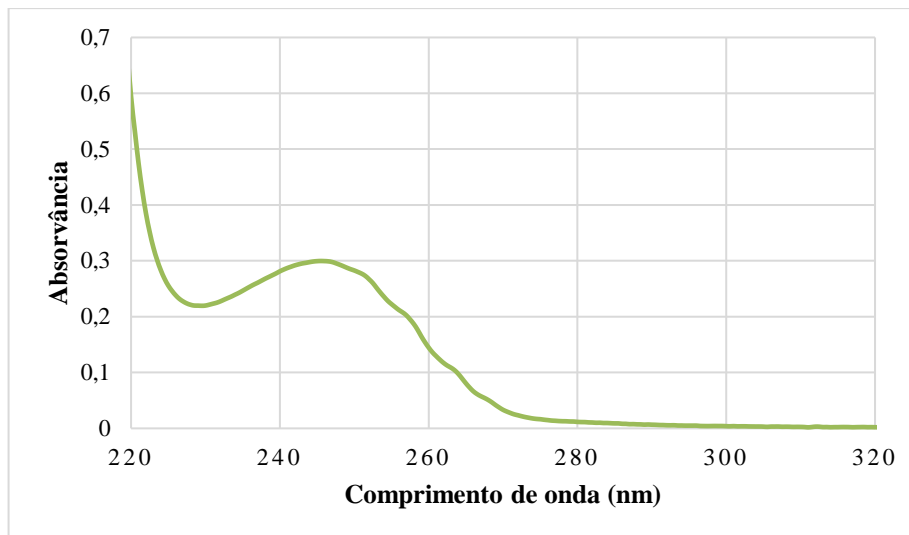


Figura 4. 3 - Espectro de UV obtido para uma solução de BITC com concentração de 0,2mM, usando como solvente uma mistura etanol:água (60:40).

O comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvância, é de 245,5 nm, valor este definido para as análises seguintes.

4.3.2 Curva de calibração

Traçou-se a curva de calibração no intervalo de concentração de BITC variando entre 2×10^{-5} e 2×10^{-4} mol/L. Na Tabela 4.3 apresentam-se as absorvâncias para as diferentes concentrações de BITC ao comprimento de onda de 245,5 nm.

Tabela 4. 3 - Absorvâncias obtidas para as soluções padrão com diferentes concentrações de BITC.

Padrão	Concentração de BITC (mol/L)	Absorvância a 245,5 nm
1	$2,04 \times 10^{-4}$	0,3395
2	$1,53 \times 10^{-4}$	0,2597
3	$1,02 \times 10^{-4}$	0,1585
4	$7,75 \times 10^{-5}$	0,1212
5	$5,10 \times 10^{-5}$	0,0733
6	$2,57 \times 10^{-5}$	0,0285

Por meio dos resultados obtidos foi traçada a curva de calibração apresentada na Figura 4.4. O ensaio para definição da curva de calibração foi realizado em triplicado.

Como é possível verificar por meio do gráfico apresentado, existe uma correlação linear entre a absorvância de radiação e a concentração de BITC, para as concentrações testadas, com coeficiente de correlação de 0,9973.

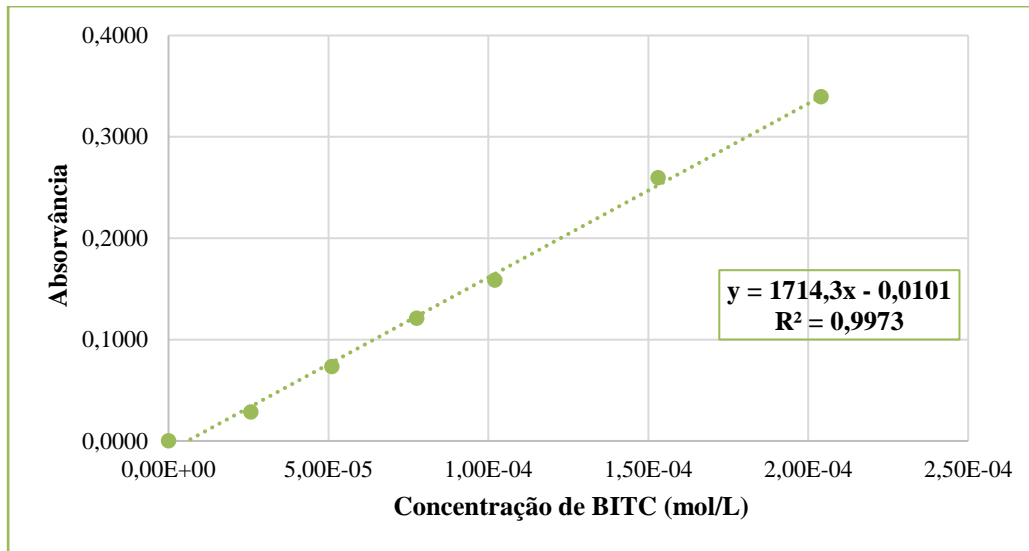


Figura 4. 4 - Curva de calibração obtida para concentrações entre 2×10^{-5} e 2×10^{-4} mol/L no comprimento de onda de 245,5 nm.

Com a curva de calibração definida, prosseguiu-se para o estudo seguinte, onde o composto foi encapsulado usando as duas ciclodextrinas anteriormente mencionadas.

4.3.3 Escolha do método de encapsulamento do BITC com a HP - β -ciclodextrina

Como mencionado na secção 3.3.3, foram testados 2 métodos para a o estudo da solubilidade do BITC, a complexação com o uso de ultrassons e agitador orbital (método I) e a complexação usando somente o agitador orbital (método II) (Li *et al.*, 2015; Uppal *et al.*, 2017; Piletti, 2016). Tal teste foi realizado para possibilitar a definição do melhor método para o presente estudo.

4.3.3.1 Estudo do encapsulamento usando o método I

Foram preparadas soluções contendo 30 mg de BITC e concentrações crescentes de CD que foram de seguida sujeitas às condições experimentais descritas anteriormente para o método I. Retiraram-se alíquotas após 24h e 48h de agitação e determinou-se a concentração de BITC nestas soluções usando a curva de calibração estabelecida anteriormente. Uma vez que os resultados obtidos para as duas ciclodextrinas mostraram tendências e conclusões semelhantes optou-se por apresentar unicamente os resultados experimentais obtidos para uma delas (HP- β -CD). Na Tabela 4.4 encontram-se os resultados obtidos para a HP- β -CD.

Tabela 4. 4 - Estudo da solubilidade de BITC usando três concentrações diferentes de HP-β-CD (método I).

Ensaio	Concentração de HP-β-CD (mM)	Fator de diluição	Absorvância (245,5 nm)	Concentração de [BITC] (mol/L)
1 (24h)	0	2,5	0,2974	$4,49 \times 10^{-4}$
	10,0	20	0,1369	$1,72 \times 10^{-3}$
	30,0	20	0,3108	$3,74 \times 10^{-3}$
2 (48h)	0	2,5	0,289	$4,36 \times 10^{-4}$
	10,0	20	0,154	$1,91 \times 10^{-3}$
	30,0	20	0,347	$4,17 \times 10^{-3}$

A partir das concentrações obtidas foram traçados os diagramas de solubilidade ([BITC] = f [[CD]) (Figuras 4.5 e 4.6).

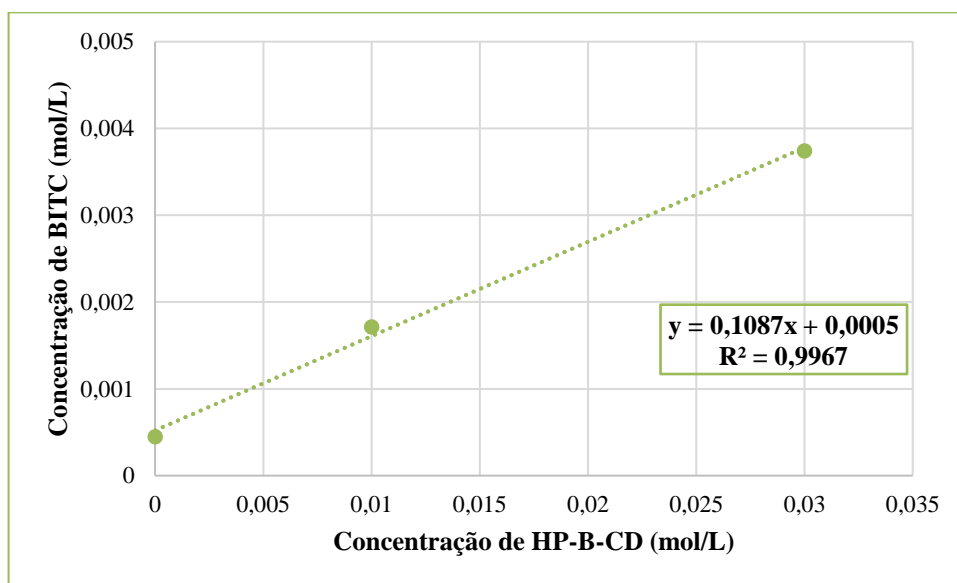


Figura 4. 5 - Diagrama de solubilidade, obtido para a HP- β -CD, após 24h de agitação (método I).

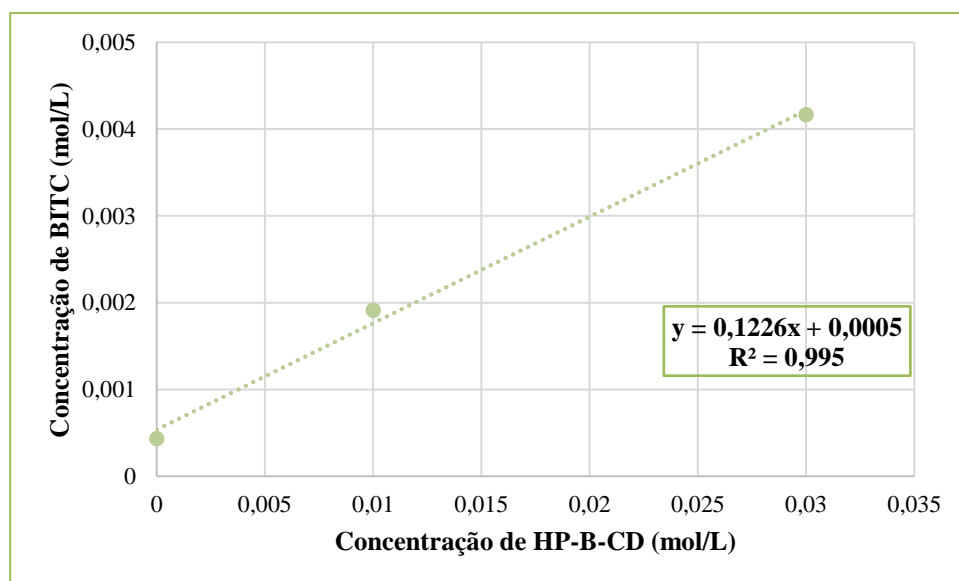


Figura 4. 6 - Diagrama de solubilidade, obtido para a HP- β -CD, após 48h de agitação (método I).

Os resultados obtidos mostram um aumento da solubilidade do BITC com o incremento da quantidade de CD. A constante de estabilidade obtida para a HP- β -CD, recorrendo à Equação 2.1, é apresentada na Tabela 4.5.

Tabela 4. 5 - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K).

Ensaio	Equação da reta ($y=mx+b$)	Declive (m)	Ordenada na origem (S_0) (mol/L)	R ²	Constante de estabilidade (K) (L/mol)
1	$y = 0,1087x + 0,0005$	0,1087	0,0005	0,9967	243,9
2	$y = 0,1226x + 0,0005$	0,1226	0,0005	0,9950	279,4

Os dados encontrados mostram valores para a constante de estabilidade da mesma ordem de grandeza para 24h e 48h de agitação. Estes valores encontram-se em concordância com o resultado descrito na literatura de 278,60 L/mol (Uppal *et al.*, 2017).

4.3.3.2 Estudo do encapsulamento utilizando o método II

Prepararam-se soluções contendo 30 mg de BITC e concentração crescente de CD e foram sujeitas de seguida às condições experimentais descritas para o método II (capítulo 3). Retiraram-se alíquotas após 24h e 48h de agitação e determinou-se a concentração de BITC nestas soluções usando a curva de calibração média. Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados obtidos no estudo de solubilidade com a HP- β -CD.

Tabela 4. 6 - Estudo da solubilidade de BITC em três concentrações diferentes de HP- β -CD (método II).

Ensaio	Concentração de HP- β -CD (mM)	Fator de diluição	Absorvância (245,5 nm)	Concentração de [BITC] (mol/L)
1 (24h)	0	2,5	0,2384	$3,62 \times 10^{-4}$
	10,0	20	0,1133	$1,44 \times 10^{-3}$
	30,0	20	0,2088	$2,55 \times 10^{-3}$
2 (48h)	0	2,5	0,2540	$3,85 \times 10^{-4}$
	10,0	20	0,1510	$1,88 \times 10^{-3}$
	30,0	20	0,3260	$3,92 \times 10^{-3}$

Foram traçados diagramas de solubilidade, os quais se encontram apresentados nas Figuras 4.7 e 4.8.

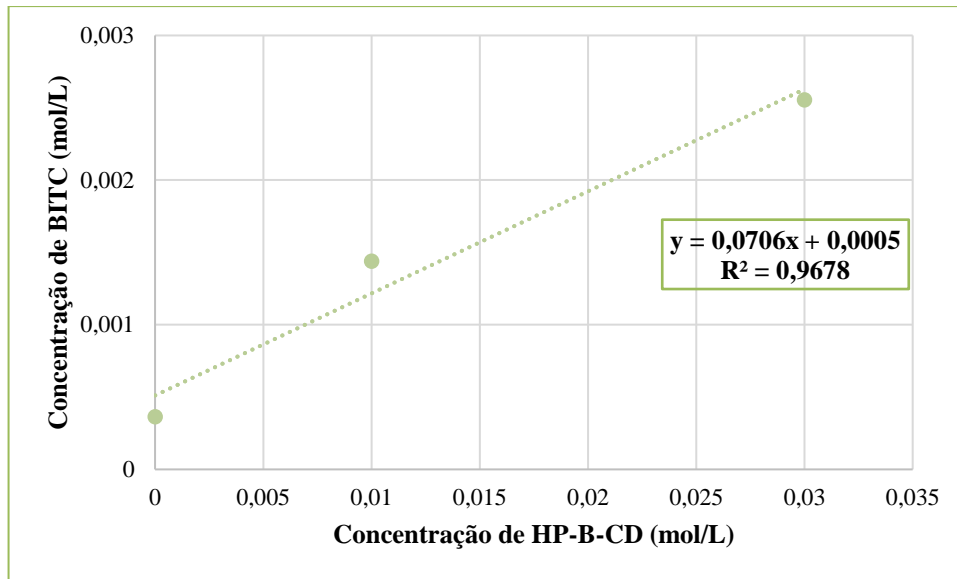


Figura 4. 7 - Diagrama de solubilidade após 24h de agitação (método II).

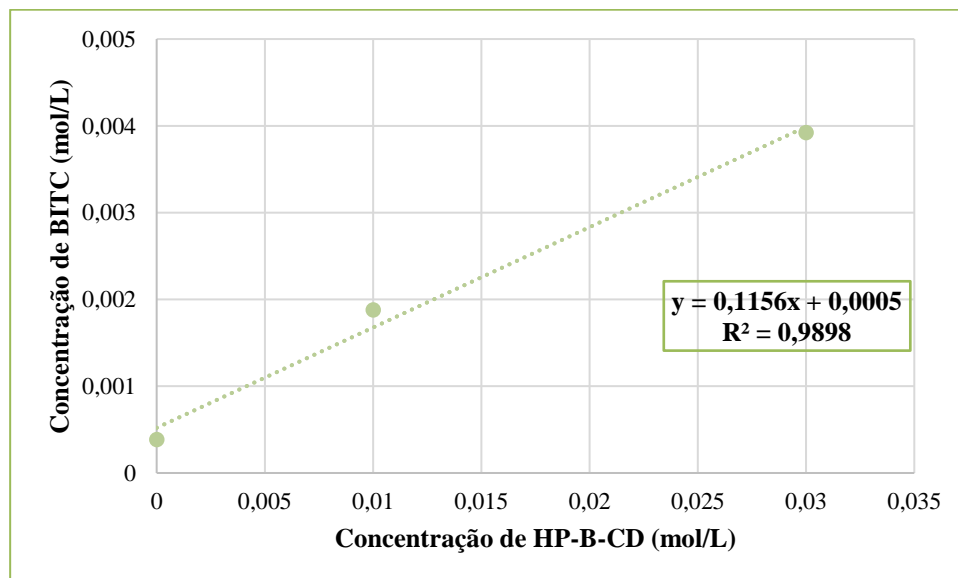


Figura 4. 8 - Diagrama de solubilidade após 48h de agitação (método II).

Com os resultados alcançados a partir dos diagramas de solubilidade, calculou-se a constante de estabilidade, recorrendo novamente a Equação 2.1, os valores encontrados estão dispostos na Tabela 4.7.

Tabela 4. 7 - - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K) sem utilização de ultrassom.

Ensaio	Equação da reta (y=mx+b)	Declive (m)	Ordenada na origem (So) (mol/L)	R ²	Constante de estabilidade (K) (L/mol)
1	$y = 0,0720x + 0,0005$	0,0706	0,0005	0,9678	151,9
2	$y = 0,1156 + 0,0005$	0,1156	0,0005	0,9898	261,4

Os valores encontrados para a constante de estabilidade usando 24h e 48h de agitação são

diferentes o que indica que, usando somente a agitação orbital, o equilíbrio demora mais tempo a ser atingido. De qualquer forma, o valor obtido após 48 h de agitação é semelhante ao obtido usando o método I e ao valor descrito na literatura para o BITC. Assim, por ser um método experimentalmente mais simples, optou-se por realizar um novo estudo, com um maior número de soluções com concentrações crescentes de CDs, usando o método II e agitação durante 48h à temperatura ambiente (25°C).

4.3.4 Ensaios de solubilidade dos complexos formados entre o isotiocianato de benzilo e as diferentes ciclodextrinas utilizando o método II

A partir dos resultados obtidos na seção anterior, a método selecionado foi a complexação utilizando agitador orbital, sem agitação prévia com ultrassons.

Sendo assim, em sete matrizes colocaram-se 30 mg de BITC e concentrações crescente das duas CDs (HP- β -CD e M- β -CD) que de seguida foram colocadas a agitar, num agitador orbital (100 rpm) durante 48h à temperatura ambiente (25°C). Os ensaios foram realizados em duplicado.

Relativamente ao estudo do encapsulamento do BITC com HP- β -CD, o resultado obtido para um dos ensaios encontra-se apresentados na Tabelas 4.8 (os demais resultados se encontram no ANEXO A).

Tabela 4. 8 - - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K).

Concentração de HP- β -CD (mM)	Fator de diluição	Absorvância (245,5 nm)	Concentração de [BITC] (mol/L)
0	2,5	0,2930	$4,42 \times 10^{-4}$
5,00	10	0,1815	$1,12 \times 10^{-3}$
10,0	20	0,1210	$1,53 \times 10^{-3}$
15,0	20	0,1855	$2,28 \times 10^{-3}$
20,0	20	0,2260	$2,75 \times 10^{-3}$
25,0	20	0,2780	$3,36 \times 10^{-3}$
30,0	20	0,3035	$3,66 \times 10^{-3}$

Na Figura 4.9 apresenta-se o respetivo diagrama de solubilidade obtido através dos valores dispostos na Tabela 4.8.

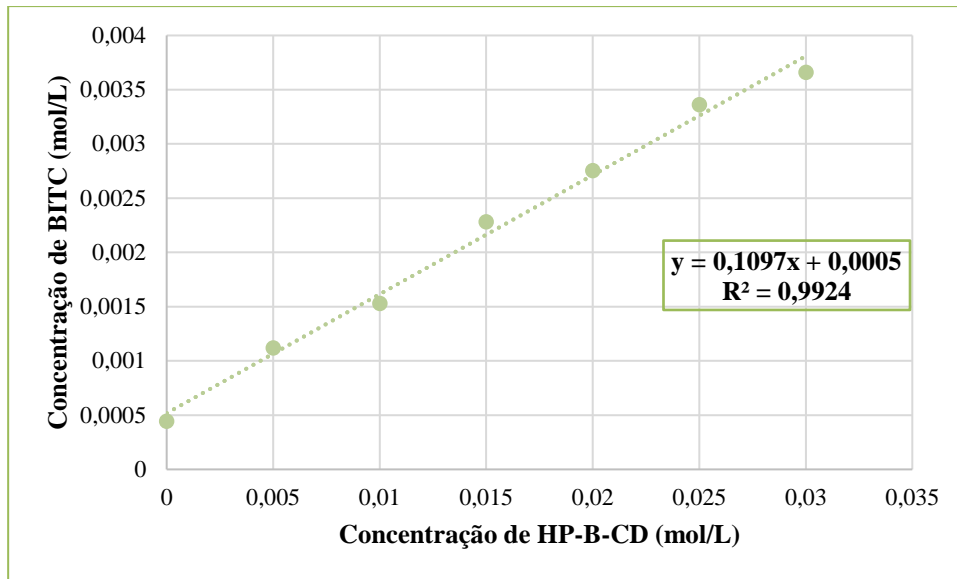


Figura 4. 9 - Diagrama de solubilidade com HP- β -CD.

Na Tabela 4.9 encontram-se representados os resultados obtidos relativamente ao estudo do encapsulamento do BITC com a M- β -CD para um dos ensaios (o ensaio duplicado encontra-se no Anexo A desse documento).

Tabela 4. 9 - Estudo da solubilidade do BITC em diferentes concentrações de M- β -CD.

Concentração de M- β -CD (mM)	Fator de diluição	Absorvância (245,5 nm)	Concentração de [BITC] (mol/L)
0	2,5	0,3235	$4,86 \times 10^{-4}$
5,00	10	0,2110	$1,29 \times 10^{-3}$
10,0	20	0,1705	$2,11 \times 10^{-3}$
15,0	20	0,2585	$3,13 \times 10^{-3}$
20,0	20	0,3325	$4,00 \times 10^{-3}$
25,0	20	0,4020	$4,81 \times 10^{-3}$
30,0	20	0,5035	$5,99 \times 10^{-3}$

A partir dos valores apresentados na Tabela 4.9 foi traçado o diagrama de solubilidade correspondente (Figura 4.10).

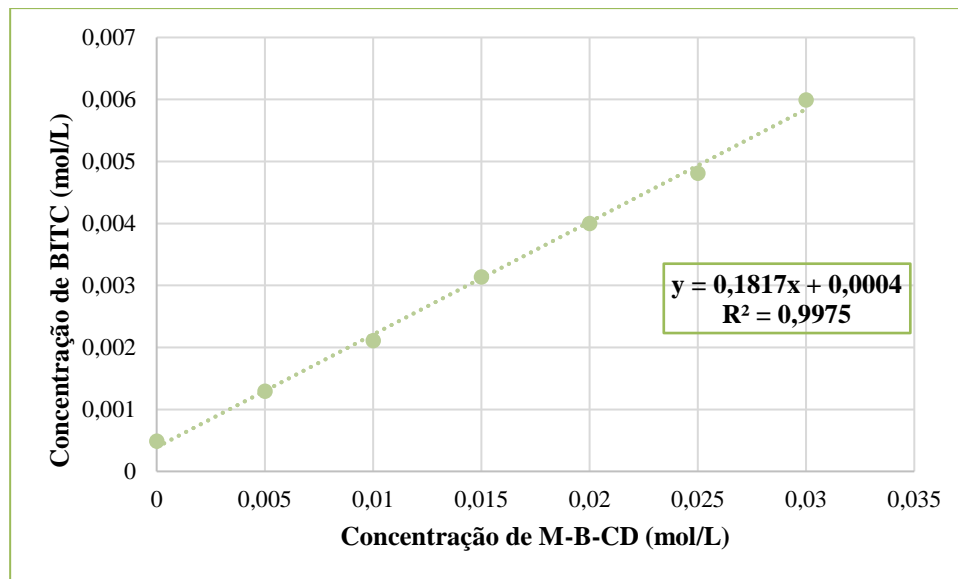


Figura 4. 10 - Diagrama de solubilidade relacionado aos resultados obtidos usando M- β -CD.

Em qualquer dos casos, os diagramas mostram a existência de um aumento da solubilidade do BITC com o incremento da concentração da CD. Os declives obtidos são inferiores a 1 o que indica que os complexos entre o BITC e as CD são formados numa proporção 1:1 (Zornio, 2013).

A partir dos diagramas de solubilidade, calcularam-se as constantes de estabilidade médias, recorrendo a Equação 2.1, tendo-se obtido os valores apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4. 10 - Dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade (K).

CD	Declive (m)	Ordenada na origem (S ₀) (mol/L)	R ²	Constante de estabilidade (K) (L/mol)
HP- β -CD	0,111	0,0005	0,9926	250±4
M-β -CD	0,184	0,0004	0,9971	565±10

Os valores obtidos para a constante de estabilidade foram de 250±4 e 565±10 L/mol, respetivamente.

O valor obtido para a HP se mantém da mesma ordem de grandeza do valor obtido por Uppal e colaboradores no estudo realizado para complexação do BITC à mesma temperatura (25°C) (278,60 L/mol) (Uppal *et al.*, 2017).

Com a utilização das ciclodextrinas foi possível alcançar um aumento na solubilidade do BITC de oito vezes para o encapsulamento utilizando HP- β -CD e de doze vezes com o uso da M- β -CD.

Para mesmas condições de processo, o valor da constante de estabilidade com a M-β-ciclodextrina é superior.

De acordo com Oliveira e colaboradores, as CDs metiladas de baixo grau de substituição molar parecem ser os solubilizantes mais poderosos, corroborando o resultado apresentado (Oliveira *et al.*, 2009). Dias e colegas relatam que o uso de um derivado metilado de CD indica uma boa solubilização de compostos pouco solúveis, como é o caso do composto de interesse neste documento (Dias, 2018). Estudos também apontam que as ciclodextrinas metiladas possuem eficiência de complexação superiores às da β-CD devido ao aumento do espaço hidrofóbico da cavidade da

ciclodextrina ocasionado pela inserção de substituintes (Teixeira, 2012).

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica sobre um grupo de compostos naturais - os isotiocianatos - encontrados em vegetais da família das crucíferas que são descritos como apresentando uma elevada atividade antimicrobiana, antioxidante e antifúngica.

O isotiocianato de benzilo, composto largamente citado em pesquisas ligadas à sua ligação ao tratamento do cancro, foi selecionado para estudos de fotorreatividade e encapsulamento usando ciclodextrinas. Esses estudos foram efetuados com objetivo de averiguar uma possível fototoxicidade desse composto e no caso do encapsulamento, proporcionar uma maior solubilidade e biodisponibilidade e diminuir a volatilidade do BITC.

As análises efetuadas permitiram que o BITC não é fotorreativo indicando que a possibilidade desse isotiocianato apresentar fototoxicidade é reduzida.

Os estudos de solubilidade usando duas ciclodextrinas, HP- β -CD e M- β -CD, permitiram verificar a existência de uma relação linear entre o aumento da solubilidade do isotiocianato de benzilo e o aumento da concentração das CDs. O estudo de solubilidade foi realizado usando diferentes condições experimentais, uso de ultrassons e agitador orbital (método I) ou somente utilização de agitador orbital (método II), e permitiu chegar à conclusão de que o processo de complexação não é muito influenciado pela ação dos ultrassons, dado que o uso deste não propiciou grande aumento na constante de estabilidade.

Com isso, os demais ensaios foram realizados sem o uso de ultrassons para as duas variações de β -Ciclodextrina utilizadas. Onde os valores para as constantes de estabilidade foram de 250(\pm 4) L/mol para HP- β -Ciclodextrina e 565(\pm 10) L/mol para a M- β -Ciclodextrina, com tempo de agitação de 48 horas.

Os resultados encontrados confirmam a potencial de aplicabilidade dos complexos de inclusão com CDs para aprimoramento de agentes antimicrobianos contendo isotiocianatos em sua composição.

Para um seguimento dos estudos efetuados, considera-se que seria relevante para a pesquisa sobre os isotiocianatos, realizar ensaios que avaliem a estabilidade, volatilidade e toxicidade do complexo versus isotiocianato na sua forma livre. Além disso, seria apropriado uma caracterização instrumental aprofundada do complexo de inclusão BITC-CD de forma a perceber como ocorre a formação destes complexos.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, B. L. (2018). *Evaluation of the phototoxicity of the topical phenolic antioxidants*. Dissertation of the 2nd Cycle of Studies Conducting of the Master's Degree in Toxicologia Analítica Clínica e Forense – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Porto.
- Aguiar, N. D. D. C. (2012) Microbial community impact by allyl isothiocyanate application and soil microbiological indicators. 2012. 133 f. Tese (Doutorado em Etiologia; Epidemiologia; Controle) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa–Brazil. <http://locus.ufv.br/handle/123456789/1044>.
- Alhajar, R. K., Ghannam, R. B., See, J. R. C., Wright, O. G., Campa, M. F., Hazen, T. C., & Techtmann, S. M. (2021). *Comparative study of the effects of biocides and metal oxide nanoparticles on microbial community structure in a stream impacted by hydraulic fracturing*. *Chemosphere*, 284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131255>
- Almeida, T. C. (2016). Avaliação da atividade antitumoral in vitro de soluções micelares contendo alil isotiocianato. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/10799>.
- Andini, S., Araya-Cloutier, C., Lay, B., Vreeke, G., Hageman, J., & Vincken, J. P. (2021). *QSAR-based physicochemical properties of isothiocyanate antimicrobials against gram-negative and gram-positive bacteria*. *LWT*, 144, 111222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111222>
- Amaro, B. R. (2019). *Síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade antibacteriana e do potencial antitumoral dos complexos de inclusão de ofloxacino com ciclodextrinas*. Universidade Federal de Juiz de Fora–Campus Governador Valadares - Programa multicêntrico de pós-graduação em bioquímica e biologia molecular. <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/10234>.
- Arianie, L., Ifitah, E.D., Warsito. (2021). *Natural isothiocyanate anti-malaria: Molecular docking, physicochemical, ADME, toxicity and synthetic accessibility study of eugenol and cinnamaldehyde*. *Int J App Pharm*, Vol 13, Issue 6, 82-88. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijap/article/view/42292/25622>
- Arora, R., Sharma, D., Kumar, R., Singh, B., Vig, A. P., & Arora, S. (2014). *Evaluating Extraction Conditions of Glucosinolate Hydrolytic Products from Seeds of *Eruca sativa* (Mill.) using GC-MS*. *Journal of food science*, 79(10), C1964-C1969. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12579>.
- Ashworth, D. J., Yates, S. R., Wang, D., & Luo, L. (2014). *Natural and synthetic isothiocyanates for pest control in soil*. In *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities* (pp. 159-177). American Chemical Society. [doi:10.1021/bk-2014-1172.ch012](https://doi.org/10.1021/bk-2014-1172.ch012).
- Avelar, L. M. M. P. R. D. (2012). *Ensaio de biocontaminação por microfungos em vários tipos de polímeros*. Dissertação de mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. <http://hdl.handle.net/10316/24979>.
- Bejo (2022). *Couve-nabo*. <https://www.bejo.pt/couve-nabo>. Acesso: 09/10/2022.
- Blažević, I., Radonić, A., Mastelić, J., Zekić, M., Skočibušić, M., & Maravić, A. (2010). *Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae)*. *Food Chemistry*, 121(4), 1020-1028. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.041>.
- Blažević, I., Radonić, A., Skočibušić, M., De Nicola, G. R., Montaut, S., Iori, R., & Maravić, A. (2011). *Glucosinolate profiling and antimicrobial screening of *Aurinia leucadea* (Brassicaceae)*. *Chemistry & biodiversity*, 8(12), 2310-2321. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100169>.
- Cabrita, S.F.C. (2014). *Atividades medicinais dos isotiocianatos*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas- Instituto Superior de Saúde Egas Muniz. <http://hdl.handle.net/10400.26/13087>.
- Cai, L., Lim, H., Kim, Y., & Jeremic, D. (2020). *β -Cyclodextrin-allyl isothiocyanate complex as a natural preservative for strand-based wood composites*. *Composites Part B: Engineering*, 193, 108037. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108037>.
- Carvalho, I. M. (2013). *Ciclodextrinas: novas aplicações*. Projeto de Pós-Graduação/Dissertação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. <http://hdl.handle.net/10284/4086>.
- Connolly, E.M., Sim, M., Travica, N., Marx, W., Beasy, G., Lynch, G.S., Bondonno, C.P., Lewis, J.R., Hodgson, J.M., Blekkenhorst, L.C. (2021). *Glucosinolates from cruciferous vegetables and their potential role in chronic disease: Investigating the preclinical and clinical evidence*. *Front. Pharmacol*, 12:767975. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.767975>.
- Connors, K. A., & Higuchi, T. (1965). *Phase Solubility Techniques*, *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation*, Vol. 4, pp. 117-212.
- Crupi, V., Guella, G., Longeville, S., Majolino, D., Mancini, I., Paciaroni, A., & Venuti, V. (2013). *Influence of chirality on vibrational and relaxational properties of (S)- and (R, S)-ibuprofen/methyl- β -cyclodextrin inclusion complexes: An INS and QENS study*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(39), 11466-11472. <https://doi.org/10.1021/jp403099a>.

- Dekić, M. S., Radulović, N. S., Stojanović, N. M., Randjelović, P. J., Stojanović-Radić, Z. Z., Najman, S., & Stojanović, S. (2017). *Spasmolytic, antimicrobial and cytotoxic activities of 5-phenylpentyl isothiocyanate, a new glucosinolate autolysis product from horseradish (Armoracia rusticana P. Gaertn., B. Mey. & Scherb., Brassicaceae)*. *Food chemistry*, 232, 329-339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.150>.
- Delagustin, M. G. (2021). *Derivados de ácidos orgânicos-β-ciclodextrina: síntese, purificação e avaliação da toxicidade in vitro*. Tese (doutoramento). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil). <http://hdl.handle.net/10183/235974>.
- Dinh, T. N., Parat, M. O., Ong, Y. S., & Khaw, K. Y. (2021). *Anticancer activities of dietary benzyl isothiocyanate: A comprehensive review*. *Pharmacological Research*, 169, 105666. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105666>.
- Dias, J. V. M. (2018). *Potencial de formulações para solucionar problemas da administração oral do isotiocianato de alilo (AITC)*. 48 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. <http://www.monografias.ufop.br/handle/35400000/758>.
- Dias, M. V., de FF Soares, N., Borges, S. V., da Silva, W. A., & Oliveira, I. R. (2009). *Avaliação de embalagens antimicrobianas*. In Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros-Foz do Iguaçu, Paraná (Brazil). <https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/1356.pdf>.
- Encinas-Basurto, D., Ibarra, J., Juarez, J., Burboa, M. G., Barbosa, S., Taboada, P., & Valdez, M. A. (2017). *Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for sustained release of allyl isothiocyanate: characterization, in vitro release and biological activity*. *Journal of Microencapsulation*, 34(3), 231-242. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1323037>.
- European Parliament (2012). *Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products* (Text with EEA relevance) Text with EEA relevance: Biocidal Product Regulation (EU) No 528/2012. <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj>. Acesso: 15/01/2022.
- Feltes, G. (2021). *Estudo de diferentes técnicas de extração para isotiocianato de benzila das sementes de mamão (Carica papaya Linn) do grupo formosa*. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Erechim, Rio Grande do Sul (Brazil).
- Freitas, J. V. de. (2016). *Avaliação in vitro do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível*. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-04102016-162635/>.
- Guerrero-Alonso, A., Antunez-Mojica, M., & Medina-Franco, J. L. (2021). *Chemoinformatic Analysis of Isothiocyanates: Their Impact in Nature and medicine*. *Molecular Informatics*, 40(11), 2100172. <https://doi.org/10.1002/minf.202100172>.
- Gupta, P., Kim, B., Kim, S.-H., & Srivastava, S. K. (2014). *Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(8), 1685–707. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300684>.
- Harbs, A. H. R. (2019). *Uso de metil-β-ciclodextrina no tingimento têxtil*. Trabalho de conclusão de curso - Graduação em Engenharia Têxtil, Universidade Federal de Santa Catarina, Blumenau (Brazil). <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/199753>.
- Henz, G.P., Mattos L. M. (2007). *Caracterização dos maços de rúcula comercializados no Distrito Federal e estimativa de perdas*. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPH-2009/33444/1/bpd_35.pdf.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2013. *Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10, Step 4*. https://database.ich.org/sites/default/files/S10_Guideline.pdf. Acesso: 11/10/22.
- Janczewski, Ł., Kręgiel, D., & Kolesińska, B. (2021). *Synthesis of Isothiocyanates Using DMT/NMM/TsO– as a New Desulfurization Reagent*. *Molecules*, 26(9), 2740. <https://doi.org/10.3390/molecules26092740>.
- Jardim Botânico UTAD (2022). *Armoracia rusticana*. https://jb.utad.pt/especie/Armoracia_rusticana. Acesso: 10/10/2022.
- Jardim Botânico UTAD (2022). *Moricandia arvensis*. https://jb.utad.pt/especie/Moricandia_arvensis. Acesso: 10/10/2022.
- Jardim Botânico UTAD (2022). *Sinapis alba*. https://jb.utad.pt/especie/Sinapis_alba_subesp_alba. Acesso: 10/10/2022.
- Khoobchandani, M., Ojeswi, B. K., Ganesh, N., Srivastava, M. M., Gabbanini, S., Matera, R., ... & Valgimigli, L. (2010). *Antimicrobial properties and analytical profile of traditional Eruca sativa seed oil: Comparison with various aerial and root plant extracts*. *Food Chemistry*, 120(1), 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.011>.
- Li, W., Liu, X., Yang, Q., Zhang, N., Du, Y., & Zhu, H. (2015). *Preparation and characterization of inclusion complex of benzyl isothiocyanate extracted from papaya seed with β-cyclodextrin*. *Food chemistry*, 184, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.091>.
- Liao, Y. Y., Deng, J. C., Ke, Y. P., Zhong, X. L., Xu, L., Tang, R. Y., & Zheng, W. (2017). *Isothiocyanation of amines using the Langlois reagent*. *Chemical Communications*, 53(45), 6073-6076. <https://doi.org/10.1039/C7CC02373A>.
- Liu, J., Wu, H., Ao, X., Hao, H., Bi, J., Hou, H., & Zhang, G. (2021). *Characterization of the Inclusion Complexes of Isothiocyanates with γ-Cyclodextrin for Improvement of Antibacterial Activities against Staphylococcus aureus*. *Foods*, 11(1), 60. <https://doi.org/10.3390/foods11010060>.

- Manchali, S., Chidambara Murthy, K. N., & Patil, B. S. (2012). *Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables*. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 94– 106. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.08.004>.
- Mannelli, L. D. C., Lucarini, E., Micheli, L., Mosca, I., Ambrosino, P., Soldovieri, M. V., & Ghelardini, C. (2017). *Effects of natural and synthetic isothiocyanate-based H2S-releasers against chemotherapy-induced neuropathic pain: Role of Kv7 potassium channels*. *Neuropharmacology*, 121, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.029>.
- Nascimento, E.C., Genuncio, G.C. (2016). Consumo de rúcula em plena expansão. <https://revistacampoenegocios.com.br/consumo-de-rucula-esta-em-plena-expansao/>. Acesso: 15/10/22.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 10966, *Ethyl isothiocyanate*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-isothiocyanate>. Acesso:03/08/2022.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2346, *Benzyl isothiocyanate*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2346#section=Solubility>. Acesso:03/08/2022.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 16741, *Phenethyl isothiocyanate*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16741#section=Solubility>. Acesso: 03/08/2022.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5971, *Allyl isothiocyanate*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5971>. Acesso: 03/08/2022.
- OCDE (2019), *Teste n° 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/915e00ac-en>.
- Oliveira, R., Santos, D., & Barata, P. (2009). Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto. ISSN 1646-0480. 6. 70-83. <http://hdl.handle.net/10284/1271>.
- Oliveira, C. M. S. (2012). *Estudo da funcionalização e recarga de fibras sintéticas com β-ciclodextrinas*. Dissertação (mestrado). Mestrado em Têxteis Avançados, Universidade do Minho. <https://hdl.handle.net/1822/22305>
- Orsenigo, S., Adorni, M., Alessandrini, A., Armiraglio, S., Castello, M., Forte, L., & Fenu, G. (2019). *Global and regional IUCN Red List assessments: 7. Italian Botanist*, 7, 107. <https://doi.org/10.3897/italianbotanist.7.35467>.
- Peng, C., Zhao, S. Q., Zhang, J., Huang, G. Y., Chen, L. Y., & Zhao, F. Y. (2014). *Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (Sinapis alba) seed essential oil by complex coacervation*. *Food chemistry*, 165, 560-568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.126>.
- Petrović, S., Drobac, M., Ušjak, L., Filipović, V., Milenković, M., & Niketić, M. (2017). *Volatiles of roots of wild-growing and cultivated Armoracia macrocarpa and their antimicrobial activity, in comparison to horseradish, A. rusticana*. *Industrial Crops and Products*, 109, 398-403. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.056>.
- Piletti, R. (2016). *Obtenção e caracterização de microcápsulas de eugenol e de óleo de alho duplamente revestidas para aumento da estabilidade térmica*. Tese (doutoramento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis (Brazil). <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/174137>.
- Quinta, M. A. D. M. S. A. D. (2016). *Avaliação de efeito antifúngico de óleos essenciais por encapsulamento em ciclodextrina: potencial de aplicação e efeitos de tratamento em pintura a óleo*. Dissertação (mestrado), Mestrado em Conservação e Restauro de Bens Culturais, Universidade Católica Portuguesa, Porto (Portugal). <http://hdl.handle.net/10400.14/21510>.
- Ribeiro, M., Simões, L. C., & Simões, M. L. (2018). *Biocides*. In Thomas M. Schmidt, *Encyclopedia of Microbiology* (Fourth Edition), Academic Press, 478-490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12118-1>.
- Rodrigues, T. L. (2013). *Utilização da Nanotecnologia para o desenvolvimento sustentável na indústria agro-alimentar* (Dissertação de Mestrado em Energias Sustentáveis, Instituto Politécnico do Porto (Portugal)). <http://hdl.handle.net/10400.22/6621>.
- Saka, B., Djouahri, A., Djerrad, Z., Terfi, S., Aberrane, S., Sabaou, N., & Boudarene, L. (2017). *Chemical variability and biological activities of Brassica rapa var. rapifera parts essential oils depending on geographic variation and extraction technique*. *Chemistry & biodiversity*, 14(6), e1600452. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600452>.
- Santana, C. V. C. de., Santos, C. D. S., Lima, J. M. D., Almeida, M. E. F. D. S., & Silva, W. B. D. (2021). *Farmácia magistral e a sua importância no abastecimento de insumo de higiene preventiva do covid-19*. *Revista Multidisciplinar Em Saúde*, 2(3), 11. <https://doi.org/10.51161/rem/1409>.
- Shin, J., Kathuria, A., & Lee, Y. S. (2019). *Effect of hydrophilic and hydrophobic cyclodextrins on the release of encapsulated allyl isothiocyanate (AITC) and their potential application for plastic film extrusion*. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(42), 48137. <https://doi.org/10.1002/app.48137>.
- Siva, S., Li, C., Cui, H., Meenatchi, V., & Lin, L. (2020). *Encapsulation of essential oil components with methyl-β-cyclodextrin using ultrasonication: Solubility, characterization, DPPH and antibacterial assay*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 104997. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104997>.
- Tang, Y., Wang, X., Yu, J., Song, L., & Lin, S. (2020). *Fish skin gelatin-based emulsion as a delivery system to protect lipophilic bioactive compounds during in vitro and in vivo digestion: The case of benzyl isothiocyanate*. *LWT*, 134, 110145. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110145>.

- Teixeira, A. C. L. S. (2012). *Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução* (Doctoral dissertation, [sn]). <http://hdl.handle.net/10284/3573>.
- Uppal, S., Kaur, K., Kumar, R., Kahlon, N. K., Singh, R., & Mehta, S. K. (2017). *Encompassment of Benzyl Isothiocyanate in cyclodextrin using ultrasonication methodology to enhance its stability for biological applications*. *Ultrasonics sonochemistry*, 39, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.007>.
- Veiga, F., & Figueiras, A. (2012). *Libertação Modificada por Inclusão do Fármaco em Ciclodextrinas*. In: Souto, E.B. e Lopes, C.M. *Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos*. Porto, Edições Fernando Pessoa, pp. 347-369.
- Zeraib, A., Ramdani, M., Lograda, T., Chalard, P., & Figueredo, G. (2011). *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Moricandia arvensis L(DC.)*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10: 342-346. doi: [10.3923/ajps.2011.342.346](https://doi.org/10.3923/ajps.2011.342.346).
- Zhang, Y. (2010). *Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), 127–35. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900323>.
- Zornio, CF (2013). *Preparação e caracterização do complexo de inclusão B-ciclodextrina/(z)-jasmona e da fibra de algodão enxertada com B-ciclodextrina*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis (Brazil). <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/103552>.

ANEXO A – Resultados das amostras analisadas por UV-Vis para estudo da complexação do isotiocianato de benzilo e diferentes ciclodextrinas.

Neste anexo são apresentadas as demais figuras dos espectros de absorção para os ensaios de escolha do solvente. As duas outras curvas de calibração obtidas para o estudo de complexação também encontram aqui disponibilizadas, bem como os diagramas de solubilidade obtidos por meio dessas curvas e os resultados relevantes sobre esses diagramas.

- **Espectros obtidos para escolha do solvente**

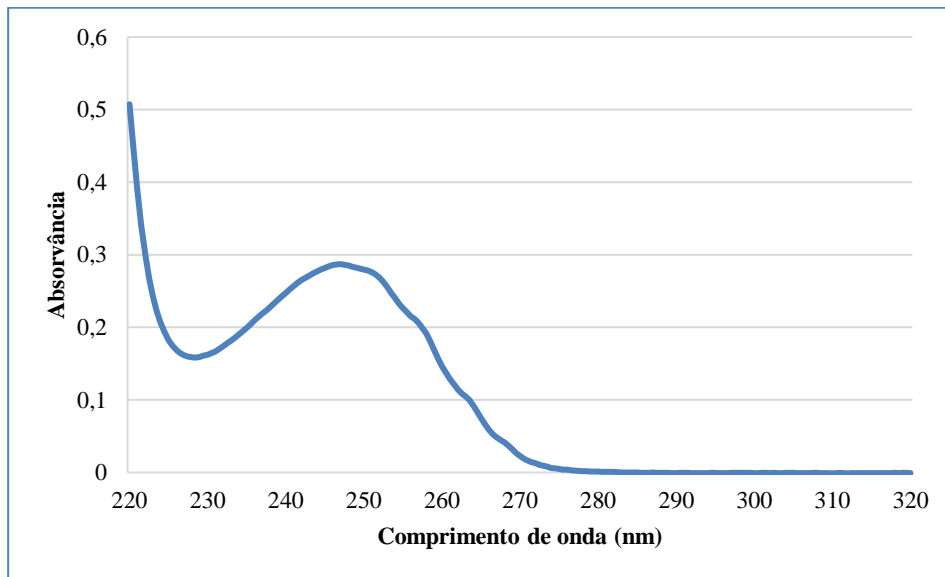


Figura A. 1 - Espectro de absorção para solução de BITC à uma concentração de 0,2mM e com 100% de etanol como solvente.

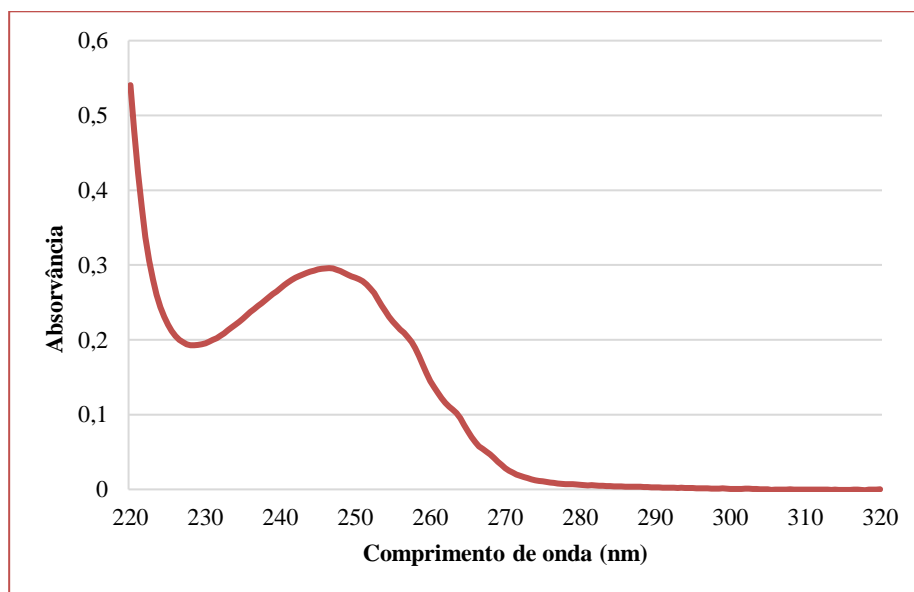


Figura A. 2 - Espectro de absorção para solução de BITC à uma concentração de 0,2mM e com um solvente contendo 80% de etanol e 20% de água.

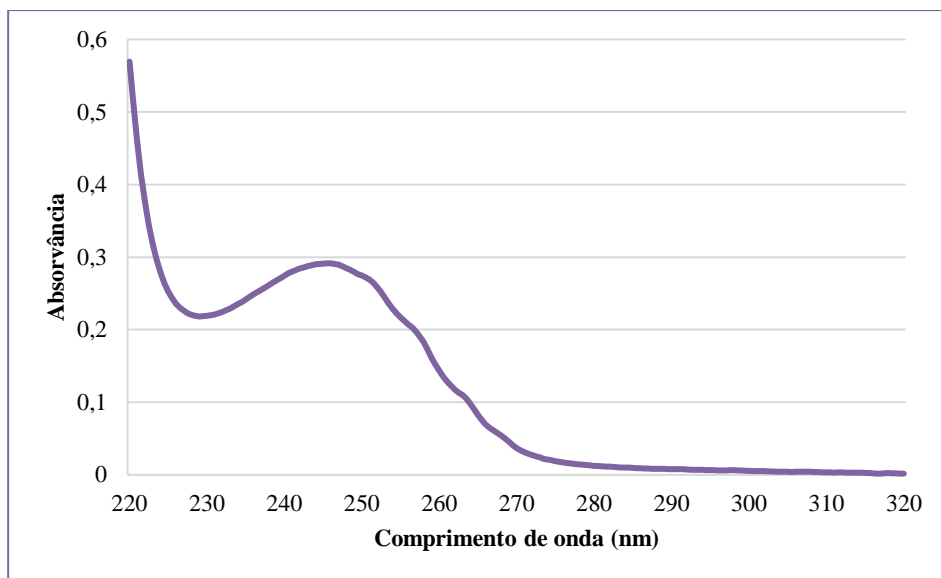


Figura A. 3 - Espectro de absorção para solução de BITC à uma concentração de 0,2mM e com um solvente contendo 50% de etanol e 50% de água.

- **Tabela e diagrama de solubilidade do complexo BITC-HP-β-CD (Ensaio 2)**

Tabela A. 1 - Estudo da solubilidade do BITC em diferentes concentrações de HP- β-CD (Ensaio 2).

Concentração de HP- β-CD (mM)	Fator de diluição	Absorvância (245,5 nm)	Concentração de [BITC] (mol/L)
0	2,5	0,3066	$4,53 \times 10^{-4}$
5,00	10	0,1944	$1,14 \times 10^{-3}$
10,0	20	0,1315	$1,54 \times 10^{-3}$
15,0	20	0,1984	$2,32 \times 10^{-3}$
20,0	20	0,2412	$2,82 \times 10^{-3}$
25,0	20	0,2943	$3,44 \times 10^{-3}$
30,0	20	0,3209	$3,75 \times 10^{-3}$

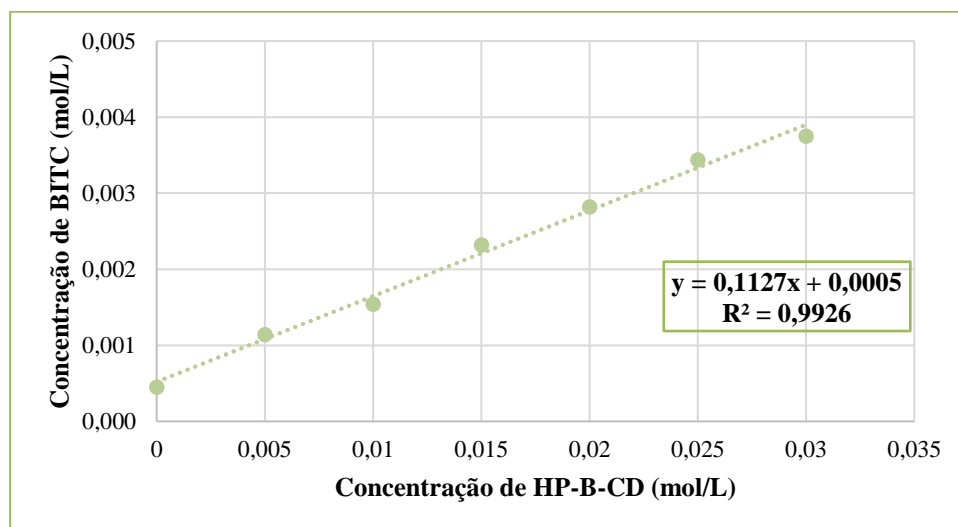


Figura A. 4 - Diagrama de solubilidade do BITC com HP-β-CD após 48h de agitação (Ensaio 2).

- **Tabela e diagrama de solubilidade do complexo BITC-M-β-CD (Ensaio 2)**

Tabela A. 2 - Estudo da solubilidade do BITC em diferentes concentrações de M- β-CD (Ensaio 2).

Concentração de HP- β-CD (mM)	Fator de diluição	Absorvância (245,5 nm)	Concentração de [BITC] (mol/L)
0	2,5	0,3381	$4,99 \times 10^{-4}$
5,00	10	0,2253	$1,32 \times 10^{-3}$
10,0	20	0,1829	$2,14 \times 10^{-3}$
15,0	20	0,2738	$3,20 \times 10^{-3}$
20,0	20	0,3509	$4,10 \times 10^{-3}$
25,0	20	0,4229	$4,94 \times 10^{-3}$
30,0	20	0,5283	$6,17 \times 10^{-3}$

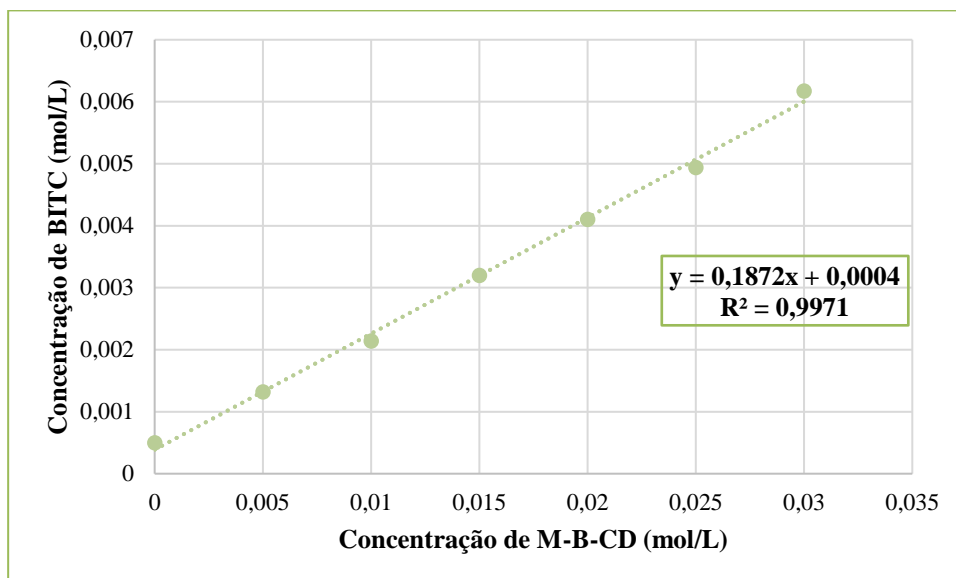


Figura A. 5 - Diagrama de solubilidade do BITC com M-β-CD após 48h de agitação (Ensaio 2).

ANEXO B – Resultados das amostras analisadas por UV-Vis para estudo da fotorreatividade do BITC

Nessa seção estão inseridos os valores de absorvâncias obtidos no ensaio de ROS para o quinino e composto de interesse neste documento.

Tabela B. 1 - Resultados para o quinino - Ensaio de ROS.

ROS (Quinino-controlo positivo) Com 2:30h de irradiação			
Resultados SO			
Leitura	Antes da irradiação	Após 2:30h de irradiação	
1 ^a	1,762	1,803	Branco
1 ^a	1,815	1,407	SO
Resultados SA			
1 ^a	0,002	0,005	Branco
1 ^a	0,001	0,263	SA

Tabela B. 2 - Resultados para o BITC - Ensaio de ROS.

ROS (Benzil isotiocianato) Com 2:30h de irradiação			
Resultados SO			
Leitura	Antes da irradiação	Após 2:30h de irradiação	
1 ^a	1,795	1,795	Branco
2 ^a	1,795	1,787	Branco
3 ^a	1,795	1,788	Branco
1 ^a	1,799	1,788	SO
2 ^a	1,799	1,780	SO
3 ^a	1,799	1,783	SO
Resultados SA			
1 ^a	0,006	0,001	Branco
2 ^a	0,000	0,001	Branco
3 ^a	0,000	0,002	Branco
1 ^a	0,000	0,002	SA
2 ^a	0,000	0,001	SA
3 ^a	0,000	0,002	SA