



Microencapsulação do biocida benzisotiazolinona (BIT)

ANA BEATRIZ FERREIRA DA SILVA

Novembro de 2022

Microencapsulação do biocida benzisotiazolinona (BIT)

Ana Beatriz Ferreira da Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, área de especialização Qualidade



Departamento de Engenharia Química

Outubro de 2022

Relatório da Unidade Curricular de Dissertação/Estágio do 2º ano do Mestrado em Engenharia Química

Candidato: Ana Beatriz Ferreira da Silva, nº 1150522, 1150522@isep.ipp.pt

Orientador: Dr.º Jorge Manuel Pinto de Jesus Garrido, JJG@isep.ipp.pt

Co-orientador: Drª. Ermelinda Manuela Pinto de Jesus Garrido, EMG@isep.ipp.pt

Local: Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI)



Departamento de Engenharia Química

Mestrado em Engenharia Química

Outubro de 2022

Agradecimentos

Este espaço será dedicado a todos que contribuíram para a realização desta dissertação.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Dr.^o Jorge Garrido e Dr.^a Manuela Garrido, por todo o acompanhamento dado ao longo do desenvolvimento da tese bem como por toda a simpatia, apoio e disponibilidade durante as várias etapas desta tese de mestrado.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e ao Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI), pelas instalações fornecidas e a todos os elementos do CIETI que me ajudaram, sempre que foi necessário, destacando, em particular, o apoio e ajuda da Vânia Silva.

Agradeço também a todos os amigos que me apoiaram, ajudaram e ouviram durante todo o processo de realização e escrita desta dissertação.

Por fim, agradeço aos meus pais, aos meus irmãos e à minha família por todo o apoio prestado durante todas as etapas desta tese.

Resumo

A utilização de produtos biocidas torna-se essencial para controlar organismos que prejudicam a saúde humana e/ou a saúde animal e também para controlar os organismos que provocam danos em materiais naturais ou manufaturados. No entanto, o uso destes produtos pode colocar em risco os seres humanos, os animais e o próprio ambiente devido às suas propriedades e por isso é necessário cumprir com a legislação vigente para se efetuar a sua colocação e venda no mercado.

O encapsulamento usando ciclodextrinas (CD) tem sido descrito como uma tecnologia efetiva na redução do impacto de poluentes orgânicos, nomeadamente os biocidas, na saúde humana e no meio ambiente. A formação dos complexos de inclusão com CDs permite melhorar a solubilidade e estabilidade das moléculas bioativas e desta forma reduzir as concentrações necessárias para atingir o efeito biológico pretendido.

Neste trabalho, foi efetuado o estudo do microencapsulamento do biocida benzisotiazolinona (BIT) em três ciclodextrinas diferentes: a β -ciclodextrina (β -CD), a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e a metil- β -ciclodextrina (Metil- β -CD).

Em todos os casos foi observada uma melhoria da solubilidade do biocida, verificando-se a existência de uma relação linear entre o aumento da concentração de BIT e o incremento da concentração das ciclodextrinas. Os dados obtidos permitiram concluir que o complexo de inclusão é formado numa estequiometria de 1:1.

As constantes de estabilidade, K , dos complexos de inclusão BIT/ β -CD, BIT/HP- β -CD e BIT/Metil- β -CD foram de $197 \pm 1 \text{ M}^{-1}$, $197 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ e $204 \pm 3 \text{ M}^{-1}$.

A caracterização por espectrofotometria de UV-Vis e por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) do complexo BIT/HP- β -CD, preparado por kneading permitiu confirmar a formação do complexo de inclusão.

Palavras-Chave: Microencapsulação, Ciclodextrinas, Biocidas, Benzisotiazolinona (BIT)

Abstract

Use of biocide products is essential for the controlling of organisms that may be harmful to human and animal health and also for the controlling of damage caused to natural or manufactured materials. However, the use of this products can put human and animal lives and the environment at risk due to its inherent properties, which makes mandatory to follow the legislation pertaining to its supply and usage.

The encapsulation using cyclodextrins (CD) has been described as an effective technology for the reduction of the impact of organic pollutants, namely biocides, in public health and the environment. The formation of inclusion complex with CDs allows to increase the solubility and stability of bioactive molecules, thus reducing the concentration needed for the intended biological effect.

In this work, the study of the microencapsulation of biocide benzisothiazolinone (BIT) using three different cyclodextrins, beta-cyclodextrin (β -CD), 2- hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- β -CD) and methyl-beta-cyclodextrin (methyl- β -CD), was carried out.

In all cases, a higher water solubility was achieved and a linear correlation was obtained between the BIT concentration and cyclodextrins' concentration. The obtained data allowed to conclude that the inclusion complex formed has a 1:1 stoichiometry.

The stability constants, K , obtained for the inclusion complexes of BIT/ β -CD, BIT/HP- β -CD and BIT/Methyl- β -CD were $197 \pm 1 \text{ M}^{-1}$, $197 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ and $204 \pm 3 \text{ M}^{-1}$, respectively.

The characterization by spectrophotometry of UV-Vis and by differential scanning calorimetry (DSC) of the complexes prepared by kneading confirmed the formation of the inclusion complex.

Keywords: Microencapsulation, Cyclodextrin, Biocides, Benzisothiazolinone (BIT)

Nomenclatura

Abreviaturas

α – CD – α – Ciclodextrina

β – CD – β – Ciclodextrina

γ – CD – γ – Ciclodextrina

K – Constante de estabilidade

% - percentagem

CD – ciclodextrina

CE – Comissão Europeia

DL – Decreto Lei

HP- β -CD – 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina

Metil- β -CD – Metil- β -ciclodextrina

BIT – Benzisotiazolinona

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DGS - Direção Geral de Saúde

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

MI – Metilisotiazolinona

MCI - Clorometilisotiazolinona

OIT – Octilisotiazolinona

DCOIT – Dicloro-octilisotiazolinona

p.a. – pureza analítica

rpm – rotação por minuto

UV/Vis – Ultravioleta Visível

RMN – Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

FTIR – Espetroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

S_0 – ordenada na origem

σ – desvio padrão

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivos do trabalho	1
1.3 Organização do relatório	1
2. Substâncias Químicas.....	3
2.1 Biocidas	5
2.1.1 Classificação	6
2.1.2 Legislação de produtos Biocidas	9
3. Substâncias Ativas.....	11
3.1 Isotiazolinonas	11
3.2 Benzisotiazolinona	15
3.3. Ciclodextrinas	18
3.3.1 Ciclodextrinas substituídas	20
3.3.2 Complexos de inclusão	22
3.3.4 Diagramas de solubilidade	24
3.4 Encapsulação de biocidas	26
4. Parte Experimental.....	29
4.1 Reagentes e Solventes	29
4.2 Equipamento e Material	29
4.3 Preparação e Caracterização dos Complexos de Inclusão	30
4.3.1 Estudos Prévios	30
4.3.2 Curva de calibração	30
4.4 Estudos de solubilidade	31
4.4.1 Estudo da complexação com CDs	31
4.4.2 Estudo da complexação com β-CD	31
4.4.3 Estudo da complexação com HP-β-CD	32
4.4.4 Estudo da complexação com Metil-β-CD	32
4.5 Preparação e caracterização do complexo de BIT/HP-β-CD	33
5. Resultados obtidos e discussão	35
5.1 Espectro UV e escolha do solvente	35
5.2 Curva de calibração	35
5.3 Estudo da complexação BIT com as diferentes ciclodextrinas	37
5.4 Caracterização do complexo de inclusão BIT/HP-β-CD	41
6. Conclusões e sugestões de trabalho futuro	43

Bibliografia.....	45
-------------------	----

Índice de tabelas

Tabela 1 - Biocidas do Grupo 1 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]	6
Tabela 2 - Biocidas do Grupo 2 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]	7
Tabela 3 - Biocidas do Grupo 3 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]	8
Tabela 4 - Biocidas do Grupo 4 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]	8
Tabela 5 - Propriedades das diferentes ciclodextrinas ^[33]	19
Tabela 6 - Concentração da solução padrão para os diferentes fatores de diluição	30
Tabela 7 - Preparação das soluções de BIT para o estudo em β -CD para análise por UV/Vis com um volume total de 25,00 mL	31
Tabela 8 - Preparação das soluções de BIT para o estudo em HP- β -CD para análise por UV/Vis com um volume total de 25,00 mL	32
Tabela 9 - Preparação das soluções de BIT para o estudo em Metil- β -CD para análise por UV/Vis com um volume total de 25,00 mL	32
Tabela 10 - Resultados da leitura das absorvâncias máximas para a obtenção da curva de calibração	36
Tabela 11 - Resultados obtidos, absorvância e concentração de BIT médios para o estudo com a β -CD	37
Tabela 12 - Resultados obtidos, absorvância e concentração de BIT médios para o estudo com a HP- β -CD	37
Tabela 13 - Tabela 12 - Resultados obtidos, absorvância e concentração de BIT médios para o estudo com a Metil- β -CD	38
Tabela 14 - Resultados obtidos nos diagramas de solubilidade de fases da β -CD, HP- β -CD e Metil- β -CD	40

Índice de figuras

Figura 1 - Projeção da produção(venda) de substâncias químicas por região, 2010-2050 ^[1]	3
Figura 2 - Estrutura do isotiazol ^[14]	11
Figura 3 - Reação de síntese do isotiazol em 1956 ^[13]	11
Figura 4 - Formação do anel de tiazol pela síntese de Hantzsch ^[16]	12
Figura 5 - Reação de Cook-Heilborn ^[16]	12
Figura 6 - Síntese de Gabriel ^[16]	12
Figura 7 - Isotiazolinonas ^[17]	13
Figura 8 - Isotiazolinonas mais usadas: Metilisotiazolinona (MI), Clorometilisotiazolinona (MCI), Benzisotiazolinona (BIT), Octilisotiazolinona (OIT) e Dicloro-octilisotiazolinona (DCOIT) ^[17]	14
Figura 9 - Estrutura química do BIT ^[23]	15
Figura 10 - Reação tradicional para a obtenção do BIT ^[17]	15
Figura 11 - Riscos toxicológicos do BIT ^[24]	16
Figura 12 - Estrutura da D-glucose ^[31]	18
Figura 13 - Representação das diferentes ciclodextrinas ^[32]	18
Figura 14 - Forma tronco-cônica das CD ^[34]	19
Figura 15 - Estrutura química da HP- β -CD(1) e da Metil- β -CD(2) ^[37] ^[38]	21
Figura 16 - Imagem ilustrativa da formação do complexo de inclusão ^[42]	22
Figura 17 - Diagrama de solubilidade de fase de Higuchi e Connors ^[45]	24
Figura 18 - Espectro do composto BIT	35
Figura 19 - Curva de calibração do biocida BIT para soluções de concentração entre 1×10^{-5} e $1,25 \times 10^{-4}$ mol/dm ³	36
Figura 20 - Diagrama de solubilidade de fases em β -CD	38
Figura 21 - Diagrama de solubilidade de fases em HP- β -CD	39
Figura 22 - Diagrama de solubilidade de fases em Metil- β -CD	39
Figura 23 - Espectro do complexo BIT/HP- β -CD	41
Figura 24 - Curvas térmicas obtidas por DSC do BIT, da HP- β -CD e do complexo BIT/HP- β -CD	42

1. Introdução

1.1 Enquadramento

O trabalho desenvolvido e apresentado nesta dissertação é relevante devido ao crescente uso de biocidas e da necessidade de desenvolver novos produtos que, relativamente aos que existem atualmente, sejam mais estáveis (foto)quimicamente e mais eficientes aquando da sua aplicação.

Os complexos de inclusão com ciclodextrinas permitem melhorias na eficiência dos produtos nomeadamente através do aumento da solubilidade, da estabilidade e a libertação controlada das substâncias encapsuladas.

A benzisotiazolinona (BIT) é um biocida amplamente aplicado em produtos de limpeza, desinfetantes e também é usado em tintas e vernizes. Constatou-se que este composto é poluente e apresenta uma solubilidade baixa e por isso, no trabalho apresentado realizaram-se estudos com o objetivo de aumentar a sua solubilidade e em simultâneo controlar a libertação do biocida no ambiente.

O trabalho apresentado nesta dissertação é prova para a conclusão do Mestrado em Engenharia Química - Qualidade.

1.2 Objetivos do trabalho

O objetivo deste trabalho foi estudar o encapsulamento do biocida BIT em diferentes ciclodextrinas: a β -ciclodextrina (β -CD), a 2- hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e a metil- β -ciclodextrina (Metil- β -CD). O estudo de solubilidade do BIT nas CDs foi realizado pelo método de Higuchi e Connors. O complexo de inclusão sólido BIT/ HP- β -CD foi preparado por kneading e avaliado por espectrofotometria de UV/Vis e calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

1.3 Organização do relatório

Este relatório encontra-se dividido em 6 capítulos.

O capítulo 1 prende-se com o enquadramento e objetivos do trabalho e a organização do relatório.

No capítulo 2 é feita uma pequena introdução à problemática do uso dos biocidas, são apresentados os diferentes grupos e tipos de biocidas e a legislação existente para o uso dos mesmos.

No capítulo 3 é descrita a isotiazolinona, substância ativa presente no biocida BIT, e é caracterizado o BIT. Aborda-se também o uso das ciclodextrinas, os complexos de inclusão e o estado da arte.

No capítulo 4 apresentam-se os procedimentos experimentais e no capítulo 5 encontram-se os resultados obtidos e a sua discussão.

O último capítulo, capítulo 6, apresenta as conclusões principais deste trabalho.

2. Substâncias Químicas

A exposição a substâncias químicas ocorre todos os dias e através de muitas vias diferentes, como ingestão, inalação ou o contacto com a pele. Embora muitas substâncias químicas sejam inofensivas ou até benéficas, outras constituem uma ameaça para a nossa saúde e o meio ambiente. O uso de substâncias químicas continua a crescer e, com ela, o potencial de exposição a tais substâncias (figura 1).^[1]

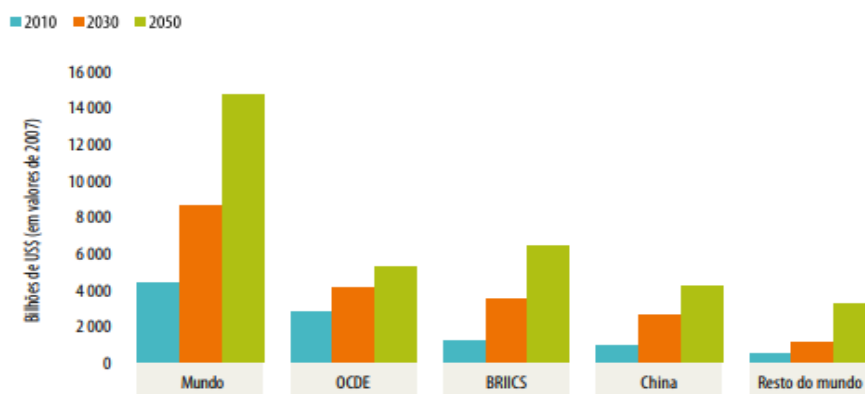


Figura 1 - Projeção da produção(venda) de substâncias químicas por região, 2010-2050^[1]

No nosso dia a dia entramos em contacto com inúmeras substâncias químicas seja através do detergente que usamos para lavar a roupa ou a loiça ou mesmo o nosso champô preferido. De entre todas estas substâncias que contactamos existem algumas como por exemplo os biocidas, que podem ser prejudiciais para a nossa saúde ou para o meio envolvente. Os biocidas são importantes para proteger o ser humano, animais e materiais contra organismos nocivos podendo, no entanto, transformar-se em ameaças para o meio ambiente.

Ao longo dos anos têm sido várias as iniciativas, conferências, manifestações que trazem este assunto de novo à discussão mundial e à troca de ideias entre diversos países para a obtenção de soluções viáveis para se tratar este problema.

Neste âmbito, a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, adotada por todos os Estados-Membros das Nações Unidas em 2015, definiu as prioridades e aspirações do desenvolvimento sustentável global para 2030 procurando mobilizar esforços globais à volta de um conjunto de objetivos e metas comuns. São 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) que pretendem “acabar com a pobreza, promover a prosperidade e o bem-estar de todos, proteger o ambiente e combater as alterações climáticas”.^[2] O controlo da utilização das substâncias químicas, e em particular os biocidas, é fundamental para a proteção do ambiente.

O desenvolvimento de novos produtos biocidas, menos tóxicos e mais estáveis, ajudará a alcançar o ODS3 e o ODS6 que se prendem com uma Saúde de Qualidade e Água Potável e Saneamento, respetivamente, e contribuem também para o ODS12 (Produção e

Consumo Sustentáveis) porque alargam a vida útil de materiais, reduzindo assim a utilização de recursos.

É importante ainda referir que os biocidas podem também afetar o ser humano e os animais se estes não forem devidamente guardados, utilizados ou descartados. Assim, o uso descuidado destes pode comprometer o ODS3, o ODS6, o ODS14 (Proteger A Vida Marinha) e o ODS15 (Proteger a Vida Terrestre). ^{[2][3]}

O uso sustentável de biocidas é possível recorrendo o mínimo necessário a estes produtos utilizando-os de uma forma eficaz. ^[3]

2.1 Biocidas

Os produtos contendo biocidas são concebidos para matar pragas ou bactérias indesejáveis e podem pôr em risco os seres humanos, os animais e o ambiente de diversas formas, devido às suas propriedades intrínsecas e aos padrões de utilização que lhes estão associados.

Tornou-se necessário estabelecer na União Europeia (UE) princípios comuns para a avaliação e a autorização de produtos biocidas de forma a garantir uma abordagem harmonizada por parte dos Estados-Membros.^[4] A Diretiva 98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Fevereiro de 1998 relativa à colocação de produtos biocidas no mercado define produtos biocidas como “substâncias ativas e preparações que contenham uma ou mais substâncias ativas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador, e que se destinem a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a ação de um organismo prejudicial por mecanismos químicos ou biológicos”^[4].

Embora as regras relativas à disponibilização no mercado de produtos biocidas tenham sido definidas pela Diretiva 98/8/CE, foi necessário adaptá-las, segundo a experiência que se obteve ao longo dos anos, devido a problemas que se detetaram durante os primeiros anos de circulação desta. Por isso, em 2012, foi necessária uma revisão que tivesse em conta as substâncias ativas que já existiam e as substâncias ativas novas que surgiram ao longo do tempo que resultou no Regulamento (UE) n.º 528/2012. Por isto, 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, define produto biocida como: “qualquer substância ou mistura, na forma em que são fornecidos ao utilizador, que consistam, contenham ou que gerem uma ou mais substâncias ativas, com o objetivo de destruir, repelir ou neutralizar um organismo prejudicial, prevenir a sua ação ou controlá-la de qualquer outra forma, por meios que não sejam a simples ação física ou mecânica”.^[5] Este regulamento define, igualmente, como produto biocida: ” qualquer substância ou mistura gerada a partir de substâncias ou misturas que não sejam abrangidas pelo âmbito de aplicação da primeira definição e utilizada com o objetivo de destruir, repelir ou neutralizar um organismo prejudicial, prevenir a sua ação ou controlá-la de qualquer outra forma, por meios que não sejam a simples ação física ou mecânica”.^[5]

Os biocidas são essenciais para a nossa vida diária e são encontrados em inúmeras aplicações comerciais para eliminar ou inibir o crescimento de microorganismos. Existem, no entanto, biocidas mais específicos que não são seguros para o ser humano e para o ambiente e quando utilizados em grandes quantidades promovem o desenvolvimento de resistências para o fim para que são procurados. É necessária, assim, uma melhoria dos agentes biocidas para que sejam eficazes contra os microorganismos prejudiciais ao mesmo tempo que se deve minimizar a exposição de longa duração a altas concentrações e combater o desenvolvimento de resistências.^[6]

2.1.1 Classificação

No Regulamento (UE) nº 528/2012, os produtos biocidas são classificados de acordo com 22 tipos, agrupados em quatro grupos principais:

1. Desinfetantes
2. Conservantes
3. Produtos de controlo de animais prejudiciais
4. Outros produtos prejudiciais

No Grupo 1 encontram-se os biocidas utilizados para a higiene humana e animal, desinfetantes de superfícies e equipamentos que entrem ou não em contacto com géneros alimentícios e alimentos para animais e, ainda, produtos utilizados na desinfeção de água potável.

No Grupo 2 encontram-se os biocidas utilizados para prevenir o aparecimento de micróbios e algas.

No Grupo 3 encontram-se os biocidas utilizados no controlo de pragas tais como inseticidas, repelentes e atrativos, avicidas, vermícidias entre outros.

No Grupo 4 encontram-se os biocidas utilizados em produtos antiincrustantes e fluidos de embalsamento e taxidermia.

Nas tabelas 1 a 4 apresentam-se os biocidas divididos pelos respetivos grupos, tipo de produtos e a sua descrição.

Tabela 1 - Biocidas do Grupo 1 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]

Grupo 1 - Desinfetantes		
Número	Tipo de Produtos	Descrição
TP 1	Higiene humana	Utilizados na higiene humana. Aplicados na pele ou no couro cabeludo humano ou em contacto com eles com o objetivo de desinfetar.
TP 2	Desinfetantes e algicidas não destinados a aplicação direta em seres humanos ou animais	Utilizados na desinfeção de superfície materiais, equipamentos e mobiliário, que não entrem em contacto direto com géneros alimentícios ou alimentos para animais. Usados em piscinas, aquários, sistemas de desinfeção de ar e água para consumo humano ou animal, produtos têxteis, tecidos, máscaras, tintas, etc.
TP 3	Higiene veterinária	Utilizados na higiene veterinária tais como desinfetantes e desinfetantes de materiais e superfícies associados ao alojamento ou transporte de animais, sabões desinfetantes, produtos de higiene oral ou corporal ou com função antimicrobiana.

TP 4	Superfícies em contacto com os géneros alimentícios e alimentos para animais	Utilizados na desinfeção de equipamentos, recipientes, utensílios de consumo, superfícies destinadas à produção, transporte ou armazenagem de produtos alimentares.
TP 5	Água potável	Produtos utilizados na desinfeção de água potável destinada a seres humanos ou animais.

Tabela 2 - Biocidas do Grupo 2 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]

Grupo 2 - Conservantes		
Número	Tipo de Produtos	Descrição
TP 6	Conservantes para produtos durante o armazenamento	Conservação de produtos manufacturados (com a exceção de alimentos, cosméticos, medicamentos ou dispositivos médicos) com o objetivo de controlar a deterioração microbiana. Utilizado como conservantes para o armazenamento ou utilização de iscos rodenticidas, inseticidas ou outros.
TP 7	Produtos de proteção de películas	Conservação de películas ou revestimentos com o objetivo de preservar as propriedades iniciais da superfície de materiais ou objetos.
TP 8	Produtos de proteção de madeira	Proteção de madeira.
TP 9	Produtos de proteção de fibras, couro, borracha e materiais polimerizados	Proteção de materiais fibrosos ou polimerizados. Impedem a acumulação de microrganismos na superfície dos materiais, evitando a formação de odores.
TP 10	Produtos de proteção de materiais de construção	Proteção de materiais de alvenaria, compósitos e outros materiais de construção, com exceção da madeira.
TP 11	Produtos de proteção de líquidos utilizados nos sistemas de arrefecimento e processamento	Proteção da água ou de outros líquidos utilizados em sistemas de arrefecimento e processamento.
TP 12	Produtos de proteção contra secreções viscosas	Prevenção ou controlo da formação de matérias viscosas em materiais, equipamentos e estruturas destinadas à indústria.
TP 13	Produtos de proteção para os fluidos utilizados no processamento ou corte	Controlar a deterioração microbiana nos fluidos utilizados para processar ou cortar metais, vidros ou outros materiais.

Tabela 3 - Biocidas do Grupo 3 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]

Grupo 3 – Produtos de controlo de animais prejudiciais		
Número	Tipo de Produtos	Descrição
TP 14	Rodenticidas	Controlo de ratos, ratazanas e outros roedores por outros meios que não sejam os de repeli-los ou atraí-los.
TP 15	Avicidas	Controlo de aves por outros meios que não sejam repeli-los ou atraí-los.
TP 16	Moluscicidas, vermicidas e produtos destinados a controlar outros invertebrados	Controlo de moluscos, vermes e invertebrados não abrangidos por outros tipos de produtos por outros meios que não sejam repeli-los ou atraí-los.
TP 17	Piscicidas	Controlo de peixes por outros meios que não sejam repeli-los ou atraí-los.
TP 18	Inseticidas, acaricidas e produtos destinados a controlar outros artrópodes	Controlo dos artrópodes (insetos, aracnídeos e crustáceos) por outros meios que não sejam repeli-los ou atraí-los.
TP 19	Repelentes e atrativos	Controlo de organismos prejudiciais (invertebrados, como pulgas, ou vertebrados como aves, peixes, roedores) repelindo ou atraindo-os.
TP 20	Controlo de outros vertebrados	Controlo de vertebrados não abrangidos por outros tipos de produtos do presente grupo, por outros meios que não sejam repeli-los ou atraí-los.

Tabela 4 - Biocidas do Grupo 4 com o respetivo número, tipos de produtos e descrição ^[7]

Grupo 4 – Outros produtos biocidas		
Número	Tipo de Produtos	Descrição
TP 21	Produtos antiincrustantes	Controlo do desenvolvimento e depósito de organismos incrustantes (micróbios e formas superiores de espécies vegetais ou animais) em navios, materiais de aquicultura e outras estruturas de meio aquático.
TP 22	Fluidos de embalsamentos e taxidermia	Desinfecção e conservação de cadáveres humanos ou animais ou de partes destes.

2.1.2 Legislação de produtos Biocidas

Como legislação para o uso de biocidas em Portugal, existe o Decreto-Lei nº 140/2017, que assegura a execução do Regulamento da União Europeia (UE) nº 528/2012, que estabelece a disponibilidade no mercado e a utilização de produtos biocidas em Portugal. Este identifica as autoridades competentes e avaliadoras de produtos biocidas como sendo: ^[8]

- Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV)
- Direção Geral de Saúde (DGS)
- Agência Portuguesa do Ambiente (APA)

Por existirem diferentes autoridades competentes para a avaliação dos produtos biocidas foi necessária a elaboração do Regulamento Delegado da UE nº 1062/2014 que é relativo aos exames sistemáticos de todas as substâncias ativas presentes em produtos biocidas. Assim, a avaliação foi distribuída da seguinte maneira: ^{[9][10]}

- DGS: saúde humana
- DGAV:PET: propriedades físico-químicas e saúde animal
- APA: riscos e efeitos para o ambiente.

O Decreto-Lei nº 112/2010 estabelece as regras para a colocação no mercado dos produtos biocidas transpondo a Diretiva nº 98/8/CE do Parlamento Europeu e retificando o Decreto-Lei nº121/2002.

3. Substâncias Ativas

As substâncias ativas presentes nos biocidas podem desempenhar um papel diferente, consoante o objetivo com que são empregues. As isotiazolinonas são substâncias amplamente utilizadas como biocidas em produtos industriais, domésticos e cosméticos. Sendo as isotiazolinonas o objeto de estudo deste trabalho, centrar-se-á a atenção unicamente neste grupo de substâncias ativas.

3.1 Isotiazolinonas

A procura por novos compostos químicos e o desenvolvimento de metodologias de síntese mais económicas são uma prioridade nos laboratórios de química dos dias de hoje. Dentro destes compostos, os heterocíclicos derivados do isotiazol (figura 2) têm despertado um grande interesse porque apresentam atividade biológica tanto para o uso na área da medicina como na agricultura.^{[11][12][13]}

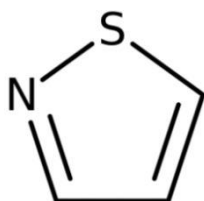


Figura 2 - Estrutura do isotiazol^[14]

O isotiazol ou 1,2-tiazol, foi preparado, com sucesso, pela primeira vez em 1956, a partir da oxidação do composto 5-amino-1,2-benzisotiazol com uma solução de permanganato de potássio, figura 3. A química do isotiazol progrediu rapidamente desde que o anel de isotiazol foi sintetizado e foram encontradas formas mais rápidas e simples para se obter este composto.^[13]

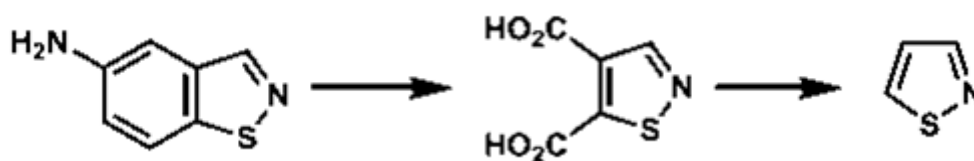


Figura 3 - Reação de síntese do isotiazol em 1956^[13]

A primeira vez que se ouviu falar do anel de tiazol foi em 1887 quando Hantzsch e Weber o descreveram pela primeira vez e a sua estrutura foi conseguida em 1889 por Popp. Na altura, o estudo sobre os compostos heterocíclicos era muito grande e o anel de tiazol foi alvo de vários estudos. O tiazol pode apresentar-se em 2 isómeros: o 1,3 – tiazol e o 1,2 – tiazol mais conhecido como isotiazol.^[15]

O anel de tiazol pode ser obtido de diversas formas mas a mais utilizada e a mais comum é através da síntese de Hantzsch (figura 4). A síntese de Hantzsch é dividida em 3

passos. No primeiro passo, existe um ataque nucleofílico do átomo de enxofre da tiamida ao átomo de carbono da α -haloacetona. No segundo passo há a formação de um composto intermediário, a α -tioacetona, e no terceiro e último passo é necessária a desidratação do composto intermediário para haver assim a formação do anel de tiazol.^[16]

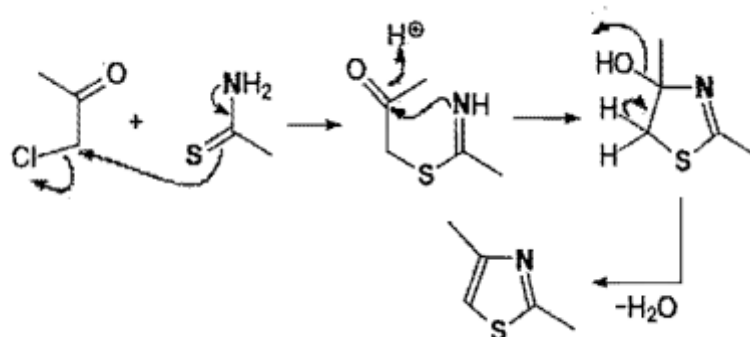


Figura 4 - Formação do anel de tiazol pela síntese de Hantzsch^[16]

Na literatura são encontradas mais formas de obtenção do anel de tiazol das quais se destacam a reação de Cook-Heilborn e a síntese de Gabriel. A reação de Cook-Heilborn (figura 5) envolve a reação de α -aminonitrilos com dissulfeto de carbono ou ésteres sendo o produto final o 5-amino-1,3-tiazol-2-tióis-4-substituídos. Na síntese de Gabriel (figura 6) o produto final obtido são anéis de tiazol substituídos que provêm da reação de α -acilaminocetonas com pentassulfureto de fósforo (P_4S_{10}) em quantidades estequiométricas.^[16]

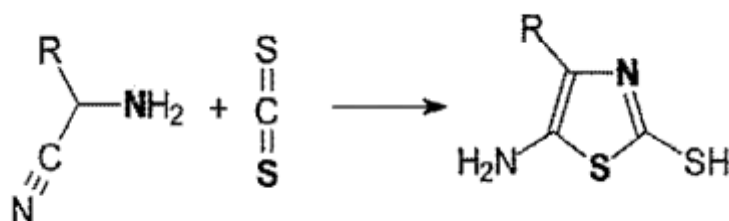


Figura 5 - Reação de Cook-Heilborn^[16]

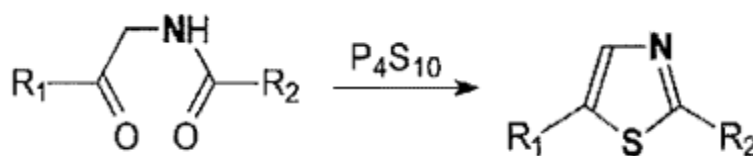


Figura 6 - Síntese de Gabriel^[16]

O isotiazol é um composto aromático estável, devido à sua estrutura cíclica, e por isso é muito utilizado na pesquisa e desenvolvimento de novas estruturas moleculares. A estas novas estruturas deu-se o nome de derivados do isotiazol.^[13]

As propriedades biológicas apresentadas pelos derivados do isotiazol têm gerado grande interesse na descoberta de novas substâncias o que se reflete num aumento do número de patentes e na utilização dos derivados de isotiazol em diversos produtos.^[17] Os diversos derivados do isotiazol já caracterizados diferem entre si na substituição no heteroátomo.^[16]

Os derivados do isotiazol mais utilizados em aplicações industriais e na produção de intermediários reativos, para a síntese de várias substâncias orgânicas como produtos farmacêuticos e agroquímicos, são as isotiazolinonas (figura 7).^[18]

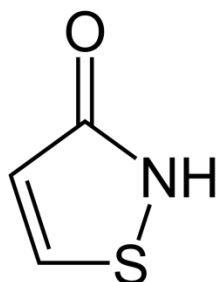


Figura 7 - Isotiazolinonas ^[17]

As isotiazolinonas são conhecidas pelas suas propriedades antifúngicas e antibacterianas. Graças à eficácia observada em meios com diferentes pHs, as isotiazolinonas são encontradas numa grande variedade de produtos domésticos e industriais. São largamente utilizadas como biocidas no controlo de crescimento de microorganismos em indústrias de tratamento de águas e têm também sido recomendadas como conservante contra o crescimento de fungos numa grande gama de produtos como tintas, vernizes de madeira, adesivos, e couro natural ou artificial.^[19]

As isotiazolinonas mais encontradas em aplicações comerciais isoladas ou combinadas (figura 8) são:^[17]

- Metilisotiazolinona (MI),
- Clorometilisotiazolinona (MCI),
- Benzisotiazolinona (BIT),
- Octilisotiazolinona (OIT),
- Dicloro-octilisotiazolinona (DCOIT)

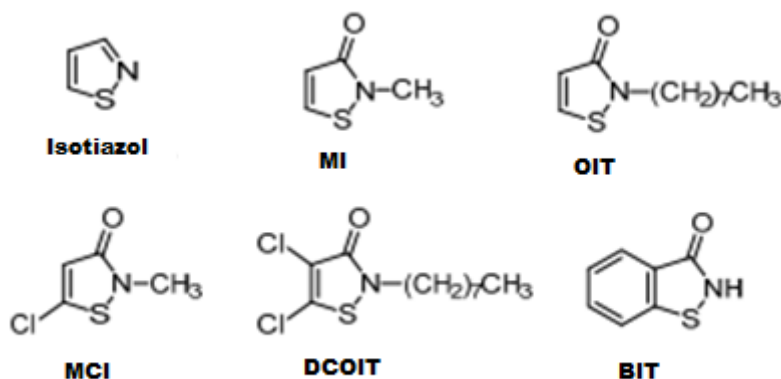


Figura 8 - Isothiazolinonas mais usadas: Metilisotiazolinona (MI), Clorometilisotiazolinona (MCI), Benzisotiazolinona (BIT), Octilisotiazolinona (OIT) e Dicloro-octilisotiazolinona (DCOIT)^[17]

A metilisotiazolinona é utilizada em processos de tratamento de águas, cosméticos, tintas, detergentes e em combinação com clorometilisotiazolinona, na proporção de 3:1, como ingrediente ativo no biocida comercial, Kathon[®]. A benzisotiazolinona e a octilisotiazolinona embora o seu uso em cosméticos e produtos de cuidados íntimos esteja proibido uma vez que foram reportadas queixas de alergias, podem ser encontrados em detergentes, produtos industriais como tintas e vernizes e produtos com couro. O BIT é mais procurado que o OIT em produtos específicos como conservantes de madeira e tintas anti-incrustantes. A dicloro-octilisotiazolinona pode ser encontrada no produto anti-incrustante Sea-Nine 211 que impede o crescimento de organismos indesejáveis nas tintas utilizadas em navios. O início do uso do DCOIT aconteceu devido à necessidade da substituição do tributilestanho (TBT) devido à sua toxicidade.^{[17][19][20][21]}

3.2 Benzisotiazolinona

O BIT é um ácido orgânico fraco, com uma constante de dissociação (pK_a) de 7,3, que pertence à classe dos benzotiazóis e que apresenta na sua estrutura molecular um anel de benzeno ligado à isotiazolinona.^[22] Na figura 9 é apresentada a estrutura do biocida BIT.

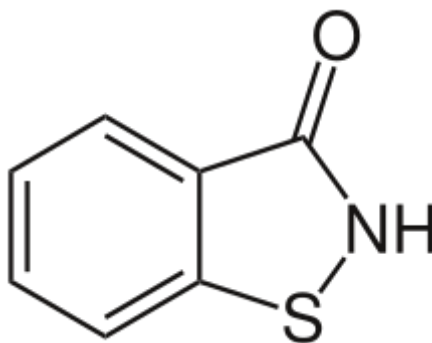


Figura 9 - Estrutura química do BIT^[23]

Existem várias formas de síntese do BIT mas as mais tradicionais baseiam-se na reação de condensação do cloreto de 2-clorossulfanilbenzoílo na presença de amoníaco (figura 10) e na halogenação, amidação e ciclização intramolecular utilizando o ácido 2,2'-ditiodibenzoico como reagente de partida.^[17]

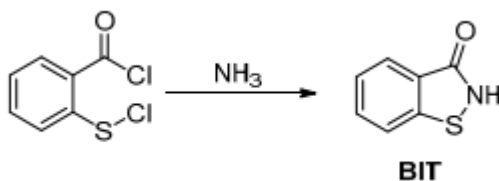


Figura 10 - Reação tradicional para a obtenção do BIT^[17]

Nos últimos 30 anos, têm sido realizados esforços para melhorar a forma como se produz BIT e ao mesmo tempo evitar a utilização de reagentes tóxicos e corrosivos usados na obtenção do biocida na forma mais tradicional. Com o aumento do interesse neste composto pelas suas propriedades biocidas e medicinais é esperado que se encontrem outras formas de produção do BIT no futuro.^[17] Os riscos toxicológicos do uso do BIT encontram-se na figura 11.



Figura 11 - Riscos toxicológicos do BIT ^[24]

O BIT é usado como agente antimicrobiano (slimicida) em cosméticos, na produção de luvas descartáveis de polivinilo, como conservante de soluções à base de água (exemplos: pastas, tintas ou óleos), como auxiliar de saúde pública estando presente em desinfetantes e como conservante em couro e borracha.^{[25][26]}

A benzisotiazolinona tem sido descrita como hidroliticamente estável e apresenta um tempo de semivida, no ambiente, de mais de 30 dias. O BIT pode ser transportado através dos solos e chegar às águas superficiais, preservando a sua ação biocida durante 3 meses mesmo estando exposto à radiação solar.^[17]

A presença do BIT no meio ambiente pode resultar de contaminação proveniente de diversas fontes, como exemplo podemos citar a libertação do BIT da tinta de superfícies de edifícios, quando ocorre precipitação, e da libertação dos cosméticos e produtos de saúde.^{[27][28]}

Os resíduos de BIT podem ser tratados através da utilização de vários produtos que diminuem a quantidade do químico nos efluentes, dependendo da eficácia dos processos. A osmose inversa quando aplicada durante técnicas de tratamento de águas residuais, consegue retirar de forma eficaz isotiazolinonas a baixas concentrações. No entanto e especificamente, o BIT é adicionado em várias etapas deste tratamento, para evitar o crescimento de biofilmes nas membranas, com concentrações que rondam os 160mg/L.^[28] Como a osmose inversa é cada vez mais utilizada foi necessário encontrar-se soluções para resolver o problema. Uma delas foi o processo de ozonização. A ozonização é um método muito aplicado no tratamento e recuperação de águas residuais que se baseia na decomposição do ozono para formação de radicais hidroxilos na presença de água. Estes radicais conseguem fazer a remoção do BIT e diminuem também a sua toxicidade durante o processo.^[28]

Uma forma eficaz de reduzir a contaminação ambiental do BIT, passa necessariamente pela redução das quantidades usadas nas formulações e/ou promover a utilização de sistemas de libertação controlada. Ao longo da última década, a microencapsulação em ciclodextrinas têm-se revelado uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada, uma vez que apresentam a capacidade de alterar as propriedades físico-químicas e biológicas das moléculas hóspede. A microencapsulação permite controlar a quantidade do biocida que é libertada para o meio e desta forma, o controlo da toxicidade do biocida é mais eficaz. Torna-se uma técnica não tóxica e mais amiga do ambiente.^[29]

A microencapsulação surge assim como uma tecnologia promissora que pode ser aplicada a substâncias sólidas, líquidas ou gasosas. O processo é baseado na encapsulação da molécula hóspede numa molécula hospedeira, formando um complexo de inclusão.^[29]

3.3. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos largamente utilizadas em diversas áreas industriais, como moléculas importantes uma vez que têm a capacidade de formar complexos com diversas substâncias.^[30]

O cientista Antoine Villiers descobriu as dextrinas cristalinas que mais tarde foram reconhecidas como CD e publicou o primeiro trabalho sobre estes compostos em 1891. As formas naturais mais comuns das ciclodextrinas são a α -CD, β -CD e γ -CD que são constituídas por 6, 7 ou 8 unidades de D-glucose (figura 12). As ciclodextrinas quimicamente modificadas podem ser obtidas pela introdução de diferentes grupos funcionais na posição 2, 3 e 6 do grupo hidroxilo da molécula de glucose (figura 12).^[30]

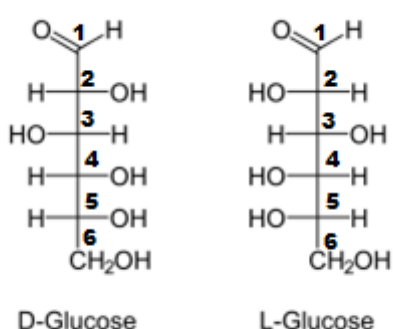


Figura 12 - Estrutura da D-glucose^[31]

Na figura 13 encontram-se representadas as diferentes CD e na tabela 5 é possível observar-se as propriedades das mesmas.

- α -CD com 6 unidades de glucose
- β -CD com 7 unidades de glucose
- γ -CD com 8 unidades de glucose

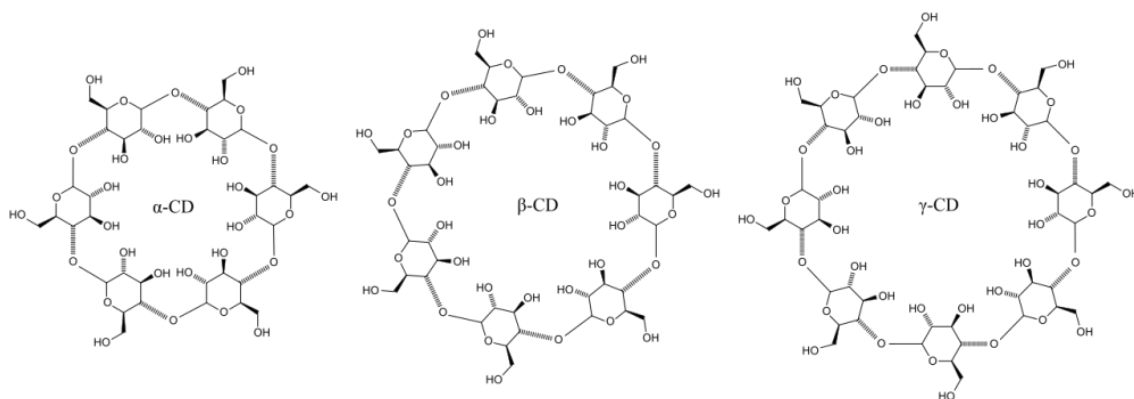


Figura 13 - Representação das diferentes ciclodextrinas^[32]

Tabela 5 - Propriedades das diferentes ciclodextrinas^[33]

CD	Nº de unidades de glucose	Peso molecular (g/mol)	Diâmetro interno (Å)	Volume interno (Å ³)	Solubilidade aquosa a 25°C (% m/v)
α -CD	6	972	4,7-5,3	174	14,5
β -CD	7	1135	6,0-6,5	262	1,85
γ -CD	8	1297	7,5-8,3	427	23,2

As ciclodextrinas apresentam uma forma tronco-cônica (figura 14) e não a de um cilindro perfeito, devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas e da conformação em cadeira das unidades de glucose. Os grupos hidroxilo externos conferem às CD características hidrofílicas e ao interior, constituídos por anéis de grupos C-H e átomos de oxigênio glicosídicos, um carácter hidrofóbico. O exterior hidrofílico confere uma maior solubilidade em água do que na maioria dos solventes orgânicos.^[33]

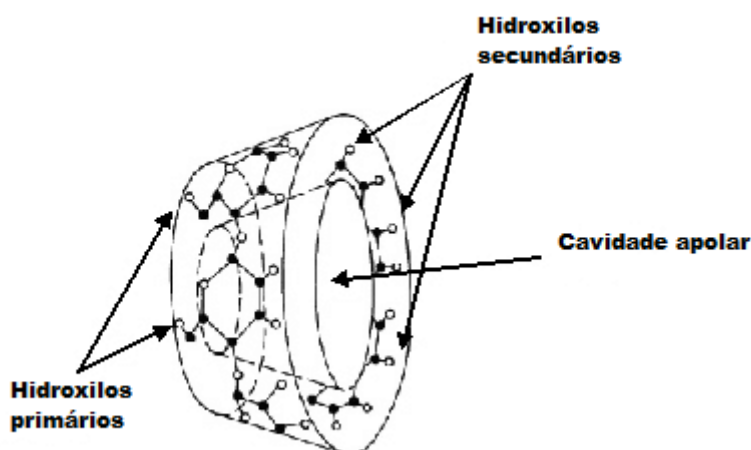


Figura 14 - Forma tronco-cônica das CD^[34]

As vantagens da utilização das CD são: ^[30]

1. o aumento da solubilidade aquosa de substâncias pouco solúveis;
2. o aumento da permeabilidade das substâncias através das membranas biológicas;
3. o aumento da estabilidade e da biodisponibilidade das substâncias;
4. a redução de reações adversas com as substâncias tais como reações gastrointestinais ou irritações oculares e outros efeitos secundários;
5. a conversão de líquidos e óleos em pós;
6. a redução da evaporação e estabilização de sabores;
7. a melhoria do palato e o manuseamento dos compostos;
8. evita a incompatibilidade de misturas.

3.3.1 Ciclodextrinas substituídas

Apesar de as ciclodextrinas poderem ser utilizadas na sua forma natural, a modificação das suas propriedades pode resultar em várias vantagens para quem as usa. Nas ciclodextrinas naturais, cada unidade de glucopirranose tem 3 grupos hidroxilos livres que diferem entre si nas funções e na reatividade.^[35] Na β -CD, há 21 grupos hidroxilos que podem ser modificados substituindo o átomo de hidrogénio ou o grupo hidroxilo por uma larga gama de grupos substituintes como: -alquilo, -hidroxialquilo, -carboxialquilo, -amino, -tio, -tosilo, -glucosilo, -maltosilo, -éteres, -ésteres, -ácido, -bases e derivados que podem ser preparados através de reações químicas enzimáticas. Estas modificações têm como objetivo:^[35]

- Melhorar a solubilidade dos derivados de CD (e dos seus complexos);
- Melhorar a associação entre a CD e o complexo com a estabilização da molécula hóspede reduzindo a sua reatividade e a mobilidade;
- Anexar grupos específicos ao sítio da ligação (formação de enzimas);
- Formar polímeros insolúveis contendo CD;

A modificação das CD naturais leva a que os seus derivados se tornem produtos não cristalinos e amorfos. A mudança destas características promove o aumento da concentração das CD em soluções aquosas que se mantêm física e microbiologicamente estáveis durante um determinado período de tempo, quer seja em complexo de inclusão ou como agente livre com a simultânea redução da sua toxicidade.^[36] Os derivados da CD que podem ser usados para formar complexos de inclusão devem ter as seguintes características:^[36]

- Devem ser muito solúveis em água à temperatura ambiente;
- Não devem ser muito dispendiosos;
- Disponível a alta pureza;
- Não devem ser tóxicos, mesmo em altas concentrações;
- Permitir uma fácil solubilização de produtos lipofílicos;
- Estável à esterilização e em solução para armazenamento;
- Não reagir do ponto de vista farmacológico;
- Biodegradável;

Dos derivados da β -CD, os mais importantes são as β -CD-metiladas e a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) que são heterogéneos, amorfos e muito solúveis em água.^[37] Na figura 15 encontram-se as estruturas químicas das duas CD.

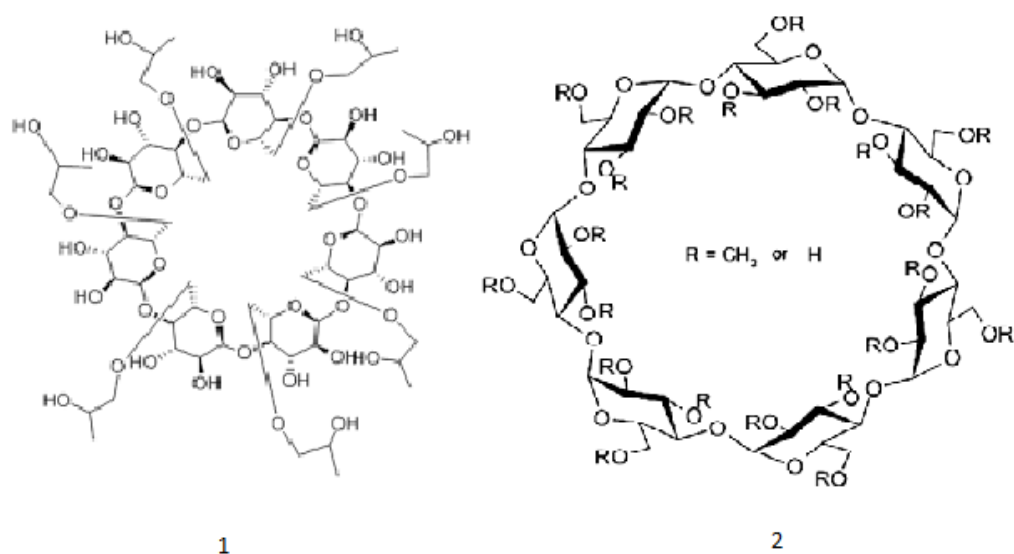


Figura 15 - Estrutura química da HP-β-CD(1) e da Metil-β-CD(2) ^[37] ^[38]

3.3.2 Complexos de inclusão

As ciclodextrinas podem ser utilizadas para encapsular vários tipos de moléculas. Em termos práticos, as CD podem ser vistas como cápsulas vazias de tamanho molecular. Se a cavidade da CD estiver preenchida por outra substância é formado o complexo de inclusão.^[39]

O complexo de inclusão é formado através das interações entre a substância a encapsular, molécula hóspede, e a ciclodextrina. Esta interação requer que haja complementaridade entre os dois compostos presentes na interação.^[40] Devido às capacidades próprias que as CD apresentam é que se torna possível a formação do complexo. As capacidades das CD vão-se adaptando consoante a molécula hóspede que está na cavidade hidrofóbica.^[40]

Cada ciclodextrina tem um tamanho de cavidade diferente e, por isso, os complexos formados serão diferentes. Sabe-se que a α -CD complexa bem moléculas mais pequenas ou cadeias laterais de moléculas de maiores dimensões. A γ -CD é utilizada para complexar moléculas de tamanho considerável, como os antibióticos. A β -CD é a ciclodextrina utilizada para encapsular moléculas maiores como os anéis aromáticos. Porém, geralmente, as ciclodextrinas tendem a formar complexos com compostos que sejam neutros e aniônicos. No que toca à formação do complexo de inclusão, na cavidade da ciclodextrina, há outros fatores que devem ser tidos em conta nomeadamente: fatores estequiométricos relacionados com a forma e o tamanho das moléculas hóspedes e a polaridade das moléculas.^[41]

O complexo de inclusão é conseguido através da substituição das moléculas de água, na cavidade da ciclodextrina, pela molécula hóspede que é menos solúvel em água e durante o processo de encapsulamento, nenhuma ligação covalente é formada ou destruída. A cavidade hidrofóbica das CD fornece um microambiente para que as moléculas hóspedes não polares possam entrar e formar complexos de inclusão. Na figura 16 encontra-se um exemplo de um complexo de inclusão numa CD.^[42]



Figura 16 - Imagem ilustrativa da formação do complexo de inclusão^[42]

A formação e estabilização dos complexos é atingida e estabelecida através da ocorrência de interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio.^[43]

Os complexos formados podem ser gerados em solução ou no estado cristalino, sendo a água o solvente de eleição. Quando a água não é o solvente adequado para a formação do complexo, o que torna este processo muito mais longo e por vezes impossível de ser realizado, é necessário recorrer a um solvente orgânico que permita a formação do complexo

de inclusão. Este solvente orgânico deve ter como características: a facilidade de remoção por evaporação e não complexar com a CD.^[43]

As moléculas encapsuladas são libertadas do complexo de inclusão por diluição ou por complexação competitiva. Uma ou mais moléculas hóspedes podem formar o complexo com a CD e uma ou mais moléculas de CD podem formar o complexo com a molécula hóspede. O mais comum é uma molécula hóspede formar o complexo com uma molécula de CD.^[42]

3.3.4 Diagramas de solubilidade

A solubilidade é uma das propriedades da molécula hóspede que pode ser alterada por microencapsulação com CDs e que tem suscitado maior interesse em termos de aplicação.^[44] Para o estudo da formação de complexos de inclusão em solução é comumente usado o método de solubilidade de fase descrito por Higuchi e Connors.^[44] Este método consiste na monitorização das alterações de solubilidade das moléculas hóspede induzidas pela adição de quantidades crescentes do agente complexante neste caso as CDs.

A capacidade de solubilização das CDs é avaliada recorrendo a diagramas de solubilidade de fases que consistem em representações gráficas das variações de solubilidade das moléculas hóspede em função do aumento da concentração das CDs. (figura 17)

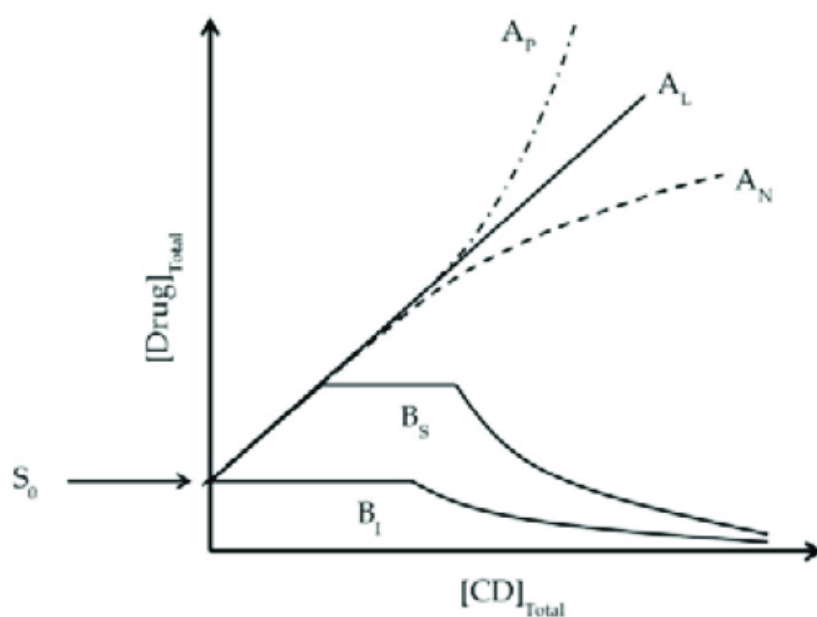


Figura 17 - Diagrama de solubilidade de fase de Higuchi e Connors^[45]

O diagrama de fases pode ser classificado em dois tipos, A e B (figura 17). Os diagramas do tipo A são observados quando os complexos de inclusão formados são solúveis. Os diagramas tipo B são observados quando o complexo de inclusão apresenta solubilidade mais baixa na solução aquosa.^[46]

Dentro dos diagramas de tipo A existem 3 perfis: o A_L , o A_P e o A_N . O A_L é obtido quando ocorre um aumento linear da concentração da molécula hóspede em função da concentração de ciclodextrina. O A_P ilustra um desvio positivo na linearidade e o A_N um desvio negativo da linearidade. Os diagramas do tipo B dividem-se em 3 perfis: o B_S e o B_I . O B_S é relativo a complexos de inclusão de solubilidade limitada e o B_I quando ocorre a formação de complexos de inclusão insolúveis.^[47]

A estequiometria do complexo de inclusão representa o número de moléculas que interagem com a CD. A estequiometria mais habitual é a 1:1, em que para cada molécula encapsulada existe uma molécula de CD. No entanto, a mesma ciclodextrina pode interagir com duas ou mais moléculas (1:2) e a molécula hóspede pode ser encapsulada por mais do que uma CD (2:1).^[48]

Quando o complexo é de primeira ordem em relação à ciclodextrina e de primeira ou de ordem superior em relação à molécula hóspede obtém-se o diagrama A_L . Se o complexo for de primeira ordem em relação à molécula hóspede e de segunda ou ordem superior em relação à CD obtém-se o perfil A_P . Para diagramas com o perfil A_L e A_P , o declive é inferior a 1. Relativamente aos perfis de A_N , estes podem ser de difícil compreensão. O desvio negativo na linearidade pode ser associado a mudanças induzidas pela ciclodextrina na constante dielétrica da solução aquosa e mudanças na solubilidade do complexo.^[41]

O método de Higuchi e Connor permite avaliar qualitativamente os complexos formados e ajuda na determinação das constantes de equilíbrio do sistema.^[49]

A constante de estabilidade (K) do complexo de inclusão pode ser calculada através da equação 1:^[46]

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

Onde:

m – declive da reta da molécula hóspede -CD no diagrama de fase

S_0 – solubilidade da molécula hóspede sem que a CD esteja presente

Existem vários métodos para a avaliação do encapsulamento em ciclodextrina tais como:^[50]

- Espetrofotometria no Ultravioleta Visível (UV/VIS);
- Espetrofluorimetria;
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Ensaio eletroquímico;
- Microscopia de força atômica (AFM);
- Microscopia de varrimento por efeito túnel (STM);
- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção por espectroscopia de massa;
- Deteção do índice de refração;

Estes métodos permitem a caracterização da formação do complexo, no que toca à estequiometria e geometria e fornecem informação qualitativa e quantitativa sobre os complexos formados.^[50]

3.4 Encapsulação de biocidas

O uso de biocidas deve ser reduzido devido ao risco toxicológico que estas substâncias apresentam para o ambiente.^[51] Com a finalidade de se obterem melhorias nas capacidades biológicas e nas características físico-químicas dos biocidas, tem-se recorrido a uma tecnologia muito promissora, a microencapsulação, que permite imobilizar substâncias únicas que podem estar no estado sólido, líquido ou gasoso. A microencapsulação oferece proteção à substância que é encapsulada e pode permitir igualmente que a sua libertação seja mais lenta ao longo do tempo ou que seja libertada apenas durante um determinado período. A proteção que é conseguida com o encapsulamento pode evitar a degradação do composto devido à exposição solar, ao oxigénio ou retardar a evaporação do mesmo.^[49]

A encapsulação de biocidas em materiais inorgânicos nanoporosos e a sua utilização na preparação de revestimentos, tem sido uma das formas sustentáveis encontradas do uso destas substâncias para controlar o seu funcionamento e a sua toxicidade no meio ambiente.^[52] A encapsulação dos biocidas nestes materiais faz com que a proteção da superfície do material seja mais longa uma vez que as interações de adsorção entre o biocida e a superfície tornam o biocida menos predisposto a reagir.^[51]

Vários estudos relacionados com o encapsulamento de biocidas usam diferentes moléculas hospedeiras.^[52] Como moléculas hospedeiras podemos destacar: as nanopartículas, as micropartículas porosas de sílica, zeólitos e as ciclodextrinas.

Com o objetivo de se formarem partículas na escala dos nanómetros e dos submicrons (inferior ao micron) e que apresentem características biodegradáveis, foi utilizada a microencapsulação de biocidas para aplicações antiincrustantes. As características biodegradáveis são obtidas quando são utilizados polímeros que sejam suscetíveis e que tenham na sua constituição uma estrutura que se adapte à hidrólise como os polímeros alifáticos. Como exemplo desses polímeros foi utilizado o ácido polilático (PLA), sendo um polímero biodegradável e biocompatível, que já foi usado em vários estudos de encapsulação e já se encontra clinicamente testado e aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (EUA).^[53]

O PLA tem uma elevada temperatura de transição vítrea (T_g) o que permite a encapsulação de diversos biocidas. Os escolhidos para as aplicações antiincrustantes foram o Irgarol 1051, o Econeá e Piritionato de zinco (ZPT).^[53]

O Irgarol 1051 é um composto da família das s-triazinas não metálico, presente principalmente em tintas de navios, que apresenta propriedades algicidas e compromete o meio ambiente aquático devido à sua toxicidade e à rápida propagação neste. A encapsulação deste biocida é feita com o objetivo de diminuir a sua concentração nas tintas dos navios mas ao mesmo tempo manter a sua função antiincrustante e controlar o processo de lixiviação.^[53]

O Econeá é um biocida orgânico não metálico à base de Clorfenapil também usado nas tintas dos navios. Com capacidade para substituir o cobre, o Econoa é um biocida promissor no que toca a produtos antiincrustantes embora seja muito suscetível à hidrólise. A

facilidade de hidrólise, quando o biocida se encontra na água do mar, faz com que a sua degradação e a função anti incrustante diminua. A encapsulação foi assim uma solução encontrada para este biocida quando a tinta onde ele se encontra é à base de água.^[53]

O ZPT é um sal organometálico com várias aplicações principalmente em produtos farmacêuticos e em produtos cosméticos devido às suas características antifúngicas, antibacterianas e antimicrobianas. É sensível à fotólise e a sua degradação em compostos menos tóxicos é muito rápida. Para o estudo do PLA, a opção pelo ZPT deve-se à sua larga aplicação e à fácil degradação.^[53]

A metilisotiazolinona (MI), pertence à família das isotiazolinonas e é um biocida que está presente em cosméticos, processos de tratamento de água, tintas de navios, entre outros. Devido à sua alta solubilidade em água, o MI pode, facilmente, sofrer processos de lixiviação que trazem como consequência o aumento da sua concentração em água e problemas ambientais. Como forma de combater este problema, foi feita a sua microencapsulação em materiais mesoporosos de sílica.^[51]

Os materiais mesoporosos de sílica têm sido largamente usados para a encapsulação de diversas substâncias ativas. Estes materiais, devido à sua geometria única, tornam-se muito atrativos para a encapsulação porque favorecem os processos de adsorção.^[51]

Assim, os materiais mesoporosos de sílica foram utilizados para a encapsulação do MI, sem comprometer as suas funções biocidas e estabilizando-o. Neste trabalho foi demonstrada a localização precisa do biocida dentro da molécula de sílica e provou-se que nenhuma alteração estrutural foi apresentada pelo MI após os processos de adsorção.^[51]

Um outro estudo foi feito ao PVC plastificado. Este produto é muito danificado por microorganismos, nomeadamente os fungos, e devido à larga aplicação que o polímero tem, esta característica não é fiável do ponto de vista económico e ambiental. Os plastificantes são adicionados ao PVC para aumentar a sua flexibilidade e extensão mas ao mesmo tempo tornam-no menos resistente aos ataques de microorganismos. A biodeteriorização é definida como a mudança de propriedades físicas ou químicas de um material quando sujeito à ação de microorganismos que é o que acontece ao PVC plastificado. Uma das formas para evitar a biodeteriorização é a adição de biocidas encapsulados à estrutura do PVC plastificado.^[49]

A encapsulação dos biocidas em materiais inorgânicos nanoporosos permite a proteção destes através das interações de adsorção entre o biocida e o meio onde o material se encontra reduzindo o potencial de lixiviação do biocida. Materiais nanoporosos de sílica ou zeólitos foram avaliados como potenciais moléculas hospedeiras para os biocidas através da técnica de espectrofotometria de infravermelho.^[52]

Os biocidas do grupo da isotiazolinona, fazem a sua ligação aos materiais nanoporosos através da interação com os grupos silanol (SiH_3OH). Para este efeito foi utilizado o encapsulamento do biocida OIT em sílica calcinada e zeólitos de 2nm para controlar a ação do biocida no ambiente e ao mesmo tempo proteger o PVC plastificado.^[53]

4. Parte Experimental

Neste capítulo serão descritos todos os procedimentos experimentais que foram utilizados e serão abordadas as técnicas utilizadas, os reagentes, os solventes, o material e o equipamento usado na determinação da solubilidade e complexação do biocida BIT com as diferentes ciclodextrinas.

4.1 Reagentes e Solventes

O biocida BIT bem como as três ciclodextrinas utilizadas neste estudo foram adquiridos à TCI Chemicals e à Sigma-Aldrich Química S.A., respectivamente. Os restantes reagentes utilizados ao longo do trabalho laboratorial foram adquiridos à Merck e eram de pureza analítica (p.a.), não tendo sido submetidos a qualquer tipo de purificação antes da sua utilização.

4.2 Equipamento e Material

No decorrer do trabalho experimental utilizaram-se diversos equipamentos analíticos de diferentes origens.

Na pesagem dos reagentes, recorreu-se a uma balança analítica, marca KERN com o modelo ABJ-NM/ABS-N.

Na preparação das soluções, todos os balões volumétricos, eram de classe A ou equivalente.

Para as medições de volumes pequenos, foram usadas micropipetas de capacidade variável 10 – 100 microlitros(μL) e de 100-1000 μL da marca Eppendorf Research.

Para a filtração, foram usados filtros de seringa da marca Chromafil, Xtra PTFE 45/25 com uma porosidade de 0,45 micrómetros(μm).

Nos estudos de solubilidade foi usado um agitador orbital, marca IKA, modelo KS 4000 i control.

Para a dissolução das substâncias, utilizou-se um banho de ultrassons da marca VWR USC, modelo 100TH.

Para as determinações espectrofotométricas foi usado um espectrofotómetro de UV/Visível da marca Shimadzu, modelo UV-1800 PharmaSpec. A aquisição de dados foi realizada através do software “UVProbe 2.42”.

Nas análises por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) foi usado um calorímetro Netzsch DSC 204.

4.3 Preparação e Caracterização dos Complexos de Inclusão

4.3.1 Estudos Prévios

Como o biocida BIT é pouco solúvel em água foi necessário fazer um estudo da solubilidade deste em mistura de solventes. Os dois solventes testados foram o dimetilsulfóxido (DMSO) e o etanol optando-se por este último para o desenvolvimento deste estudo uma vez que o DMSO pode interferir nas leituras espectrofotométricas no intervalo de comprimentos de onda entre 200 e 400 nm.

Para o estudo da solubilidade foram testadas diferentes proporções etanol:água. Para tal, preparou-se uma solução de BIT com concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ e traçou-se o espectro de UV-Vis no intervalo entre 200 e 400 nm.

4.3.2 Curva de calibração

Para a obtenção da curva de calibração foi necessário preparar uma solução-mãe de BIT. Iniciou-se o processo com a pesagem rigorosa de cerca de 150 mg de biocida e procedeu-se à sua dissolução em etanol, com ajuda do ultrassons, de forma a obter uma solução de concentração $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$.

De seguida procedeu-se à diluição da solução-mãe e traçaram-se os espectros de UV/Vis das diferentes soluções padrão para o intervalo de comprimentos de onda entre 200 e 400 nm.

Para isso, mediram-se os volumes correspondentes de solução padrão mãe e transferiu-se para um balão de 10,00mL completando-se o volume com uma mistura etanol:água (8:2). (Tabela 6)

Tabela 6 - Concentração da solução padrão para os diferentes fatores de diluição

Volume de solução mãe (μL)	Concentração da solução padrão (mol/dm ³)
100	1×10^{-5}
200	2×10^{-5}
400	4×10^{-5}
600	6×10^{-5}
800	8×10^{-5}
1000	1×10^{-4}

4.4 Estudos de solubilidade

Os estudos de solubilidade foram efetuados usando três CD diferentes: a β -CD, a HP- β -CD e a Metil- β -CD.

A escolha pela utilização destas três ciclodextrinas, a β -CD e os seus derivados, prende-se com as diferentes solubilidades de cada uma. Foi preparada uma solução-mãe de ciclodextrina de concentração $7,99 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ em β -CD e $3,00 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ de HP- β -CD e Metil- β -CD.

4.4.1 Estudo da complexação com CDs

Os estudos da solubilidade nas CDs começaram pela preparação de uma solução-mãe de CD. Num balão volumétrico de 100,0mL, pesou-se a massa de CD correspondente à concentração que se pretende obter, dissolveu-se e perfez-se até à marca com 100,0mL de água desionizada. Para ajudar a dissolver melhor a CD, a solução foi introduzida num banho ultrassons durante 5 minutos.

Posteriormente, em matrizes de 100mL, efetuou-se a preparação de soluções pesando-se 150mg de BIT (em excesso) e adicionam-se volumes crescentes da solução-mãe de CD, ou seja, concentrações crescentes, perfazendo-se em seguida o volume até 25,00mL com água desionizada. Foram assim obtidas soluções saturadas de BIT em soluções de ciclodextrinas entre $0,00 \text{ mol/dm}^3$ e o valor da concentração da solução-mãe de CD preparada. As soluções foram introduzidas num agitador orbital a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a 100 rpm. Após atingido o equilíbrio (48 horas) filtraram-se as soluções com filtros de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e realizou-se a diluição apropriada utilizando como solvente uma mistura de 80% de etanol e 20% de água. A concentração de BIT foi determinada espectrofotometricamente a 226 nm.

4.4.2 Estudo da complexação com β -CD

Na tabela 7 encontram-se os valores utilizados na preparação das soluções de BIT para o estudo em β -CD.

Tabela 7 - Preparação das soluções de BIT para o estudo em β -CD para análise por UV/Vis com um volume total de 25,00 mL

Matraz	m _{pesada} de BIT(g)	β -CD mol/dm ³	Volume CD (mL)	Volume Água (mL)
1	0,1507	0,0E+00	0,00	25,00
2	0,1502	1,00E-03	3,13	21,87
3	0,1508	2,00E-03	6,25	18,75
4	0,1512	3,50E-03	10,95	14,05
5	0,1505	5,00E-03	15,64	9,36
6	0,1513	7,99E-03	25,00	0,00

4.4.3 Estudo da complexação com HP- β -CD

Na tabela 8 encontram-se os valores utilizados na preparação das soluções de BIT para o estudo em HP- β -CD.

Tabela 8 - Preparação das soluções de BIT para o estudo em HP- β -CD para análise por UV/Vis com um volume total de 25,00 mL

Matraz	m _{pesada} de BIT(g)	HP- β -CD mol/dm ³	Volume CD (mL)	Volume Água (mL)
1	0,1508	0,00E+00	0,00	25,00
2	0,151	1,00E-03	0,83	24,17
3	0,151	5,00E-03	4,16	20,84
4	0,1504	1,00E-02	8,30	16,70
5	0,1503	2,00E-02	16,60	8,40
6	0,1505	3,00E-02	25,00	0,00

4.4.4 Estudo da complexação com Metil- β -CD

Na tabela 9 encontram-se os valores utilizados na preparação das soluções de BIT para o estudo em Metil- β -CD.

Tabela 9 - Preparação das soluções de BIT para o estudo em Metil- β -CD para análise por UV/Vis com um volume total de 25,00 mL

Matraz	m _{pesada} de BIT(g)	Metil- β -CD mol/dm ³	Volume CD (mL)	Volume Água (mL)
1	0,1552	0,00E+00	0,00	25,00
2	0,1545	1,00E-03	0,83	24,17
3	0,1552	5,00E-03	4,16	20,84
4	0,1543	1,00E-02	8,30	16,70
5	0,1554	1,50E-02	12,50	12,50
6	0,1545	2,00E-02	16,60	8,40
7	0,1542	2,50E-02	20,80	4,20
8	0,1542	3,00E-02	25,00	0,00

4.5 Preparação e caracterização do complexo de BIT/HP- β -CD

A preparação do complexo de inclusão BIT/HP- β -CD foi realizada por kneading.^[54] Pesaram-se quantidades equimolares de BIT e de ciclodextrina e foram colocadas num almofariz. Adicionaram-se algumas gotas de etanol até formar uma pasta e com o pilão triturou-se muito bem durante 1 hora. O sólido obtido foi transferido para um vial, envolveu-se com papel de alumínio e colocou-se no exsicador durante 24 horas sob pressão reduzida.

Analisou-se o complexo de inclusão sólido por espectrofotometria de UV/Vis e por DSC. A análise por DSC foi efetuada num intervalo de temperatura de 40 a 400 °C com uma rampa de aquecimento de 10°C/min e sob atmosfera de azoto, usando cadinhos de alumínio.

5. Resultados obtidos e discussão

5.1 Espectro UV e escolha do solvente

O biocida BIT apresenta uma reduzida solubilidade em água (1 g/L). Uma vez que esta substância é muito solúvel em etanol, preparou-se uma solução de BIT com uma concentração de $1,5 \times 10^{-2}$ mol/dm³, neste solvente e traçou-se o respetivo espectro UV/Vis (figura 18).

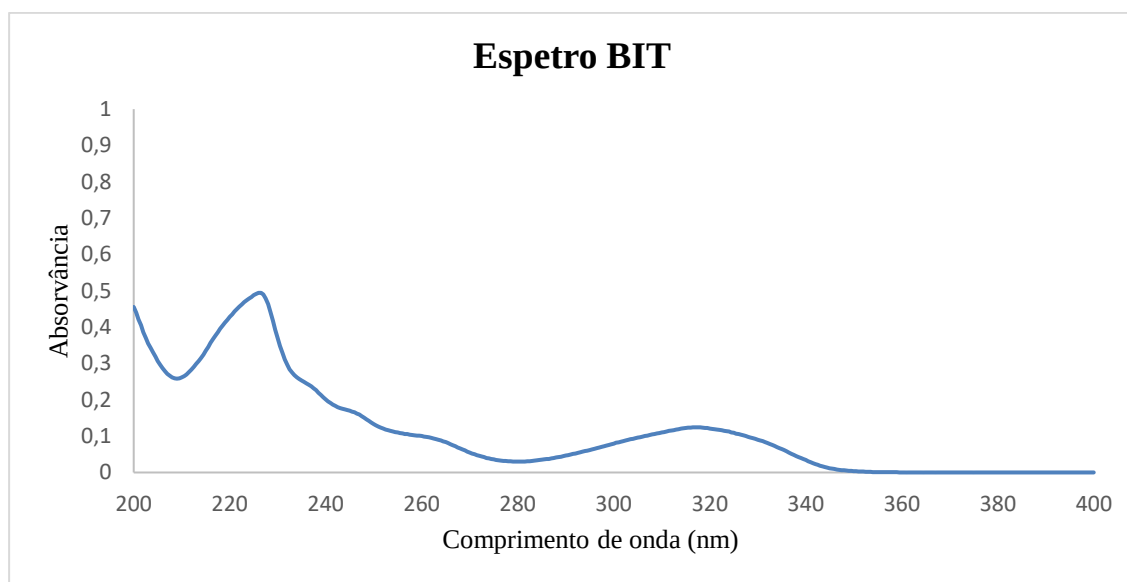


Figura 18 - Espectro do composto BIT

Verifica-se que o BIT apresenta absorção a 226 nm e 316 nm. Optou-se por fazer sempre as leituras a 226nm de forma a obter maior sensibilidade.

Uma vez que o estudo da solubilidade do BIT nas CDs é realizado usando água como solvente, foi efetuado um estudo com várias misturas etanol:água. Iniciou-se o estudo preparando uma solução de BIT de concentração $1,5 \times 10^{-2}$ mol/dm³ em 100% de etanol e prosseguiu-se o ensaio testando soluções equimolares preparadas usando diferentes misturas etanol:água (100:0 até 50:50). Foi traçado o espectro para cada uma das soluções de BIT e verificou-se que para as misturas com uma proporção de água superior a 20 (etanol:água 80:20) havia uma diminuição progressiva da absorvância medida, provavelmente devido à insolubilização do BIT. Assim, optou-se por usar uma proporção de 80% de etanol e 20% de água nos estudos subsequentes.

5.2 Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida através do traçado dos espectros das diferentes soluções-padrão de BIT com concentrações compreendidas entre $1,25 \times 10^{-5}$ mol/dm³ e $1,25 \times 10^{-4}$ mol/dm³ e num intervalo de comprimento de onda entre os 200 nm e os 400 nm.

Na Tabela 10 são apresentados os dados obtidos e na figura 19 está representada a curva de calibração.

Tabela 10 - Resultados da leitura das absorvâncias máximas para a obtenção da curva de calibração

[BIT] mol/dm³	Absorvância máxima (226 nm)
1,255E-05	0,200
2,511E-05	0,408
5,022E-05	0,805
7,533E-05	1,213
1,004E-04	1,615
1,255E-04	2,030

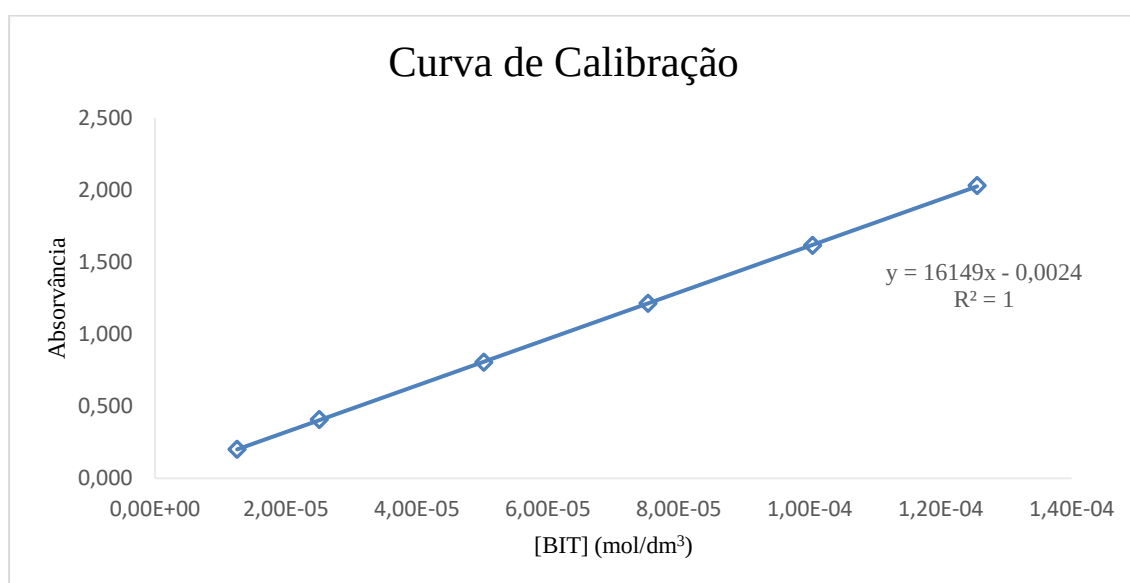


Figura 19 - Curva de calibração do biocida BIT para soluções de concentração entre 1×10^{-5} e $1,25 \times 10^{-4}$ mol/dm³

5.3 Estudo da complexação BIT com as diferentes ciclodextrinas

Seguindo o procedimento descrito no capítulo 4, estudou-se a solubilidade do BIT nas diferentes ciclodextrinas. Foram preparados matrizes contendo uma quantidade em excesso de BIT e concentrações crescentes de CD. Em tempos pré-definidos, retiraram-se alíquotas de cada um dos matrizes e determinou-se a concentração de BIT por interpolação usando a curva de calibração definida anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicados.

Os estudos realizados permitiram concluir que o equilíbrio, com qualquer das CDs estudadas, foi atingido ao fim de 48 horas. Assim, todos os resultados apresentados seguidamente referem-se às análises realizadas após este período de agitação.

Nas tabelas 11 a 13 são apresentados os resultados obtidos, ao final de 48 horas de agitação, para a β -CD, HP- β -CD e Metil- β -CD, respetivamente.

Tabela 11 - Resultados obtidos, absorvância e concentração de BIT médios para o estudo com a β -CD

β -CD mol/dm ³	Absorvância (226 nm)	[BIT] mol/dm ³
0,0E+00	0,509	7,91E-03
1,00E-03	0,536	8,34E-03
2,00E-03	0,604	9,39E-03
3,50E-03	0,631	9,80E-03
5,00E-03	0,681	1,06E-02
7,99E-03	0,779	1,21E-02

Tabela 12 - Resultados obtidos, absorvância e concentração de BIT médios para o estudo com a HP- β -CD

HP- β -CD mol/dm ³	Absorvância (226 nm)	[BIT] mol/dm ³
0,00E+00	0,516	8,02E-03
1,00E-03	0,547	8,51E-03
5,00E-03	0,691	1,07E-02
1,00E-02	0,860	1,34E-02
2,00E-02	1,235	1,92E-02
3,00E-02	1,638	2,54E-02

Tabela 13 - Tabela 12 - Resultados obtidos, absorvância e concentração de BIT médios para o estudo com a Metil- β -CD

Metil- β -CD mol/dm ³	Absorvância (226 nm)	[BIT] mol/dm ³
0,00E+00	0,413	9,75E-03
1,00E-03	0,414	9,73E-03
5,00E-03	0,496	1,17E-02
1,00E-02	0,663	1,53E-02
1,50E-02	0,827	1,96E-02
2,00E-02	0,943	2,20E-02
2,50E-02	1,080	2,52E-02
3,00E-02	1,221	2,86E-02

A partir dos resultados obtidos foram construídos os diagramas de solubilidade de fases apresentados nas figuras 20 a 22.

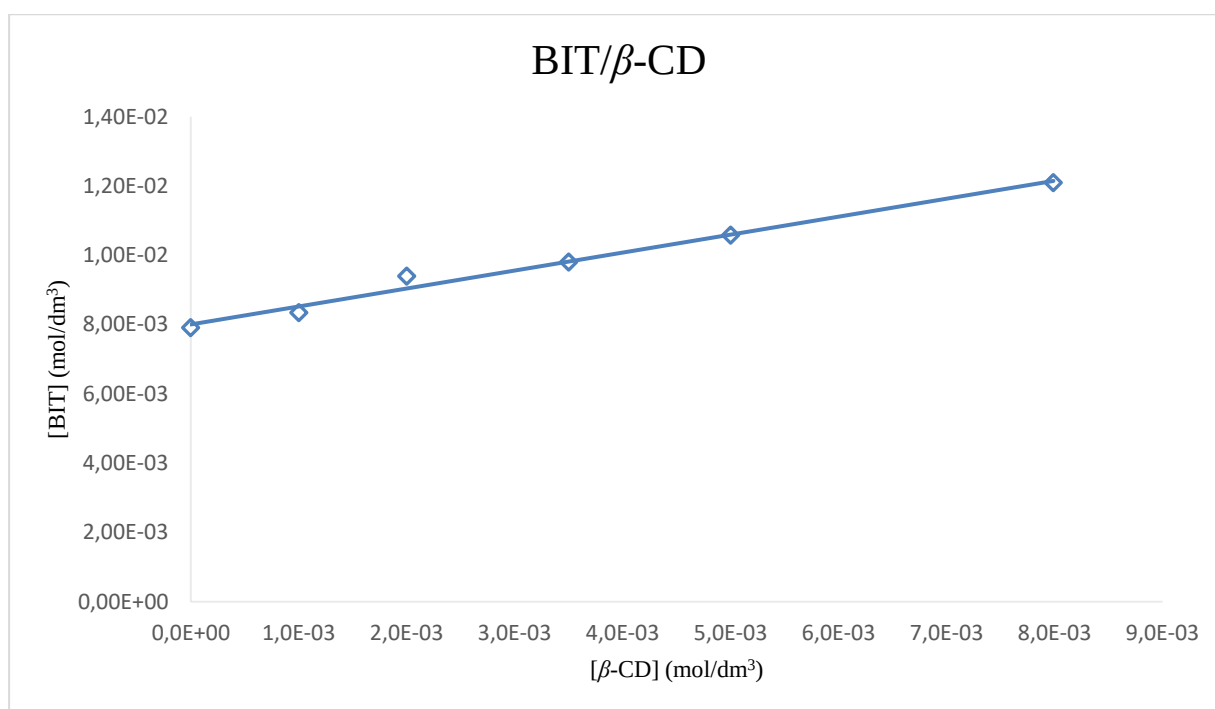


Figura 20 - Diagrama de solubilidade de fases em β -CD

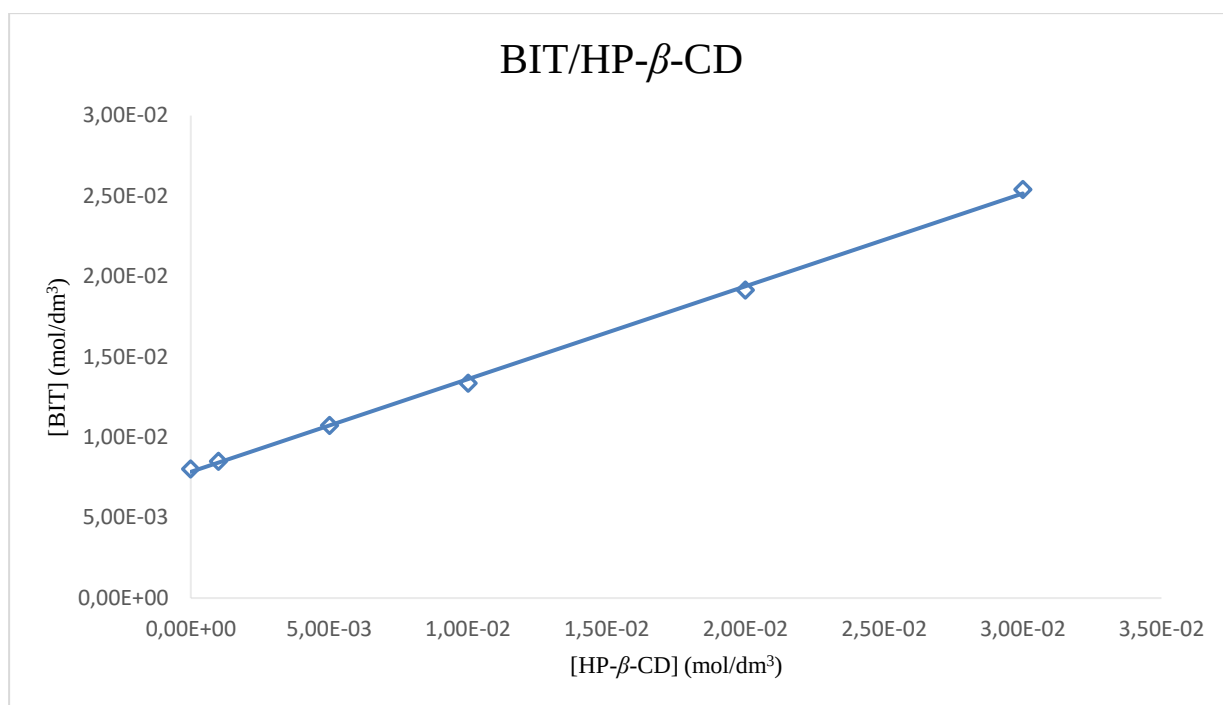


Figura 21 - Diagrama de solubilidade de fases em HP- β -CD

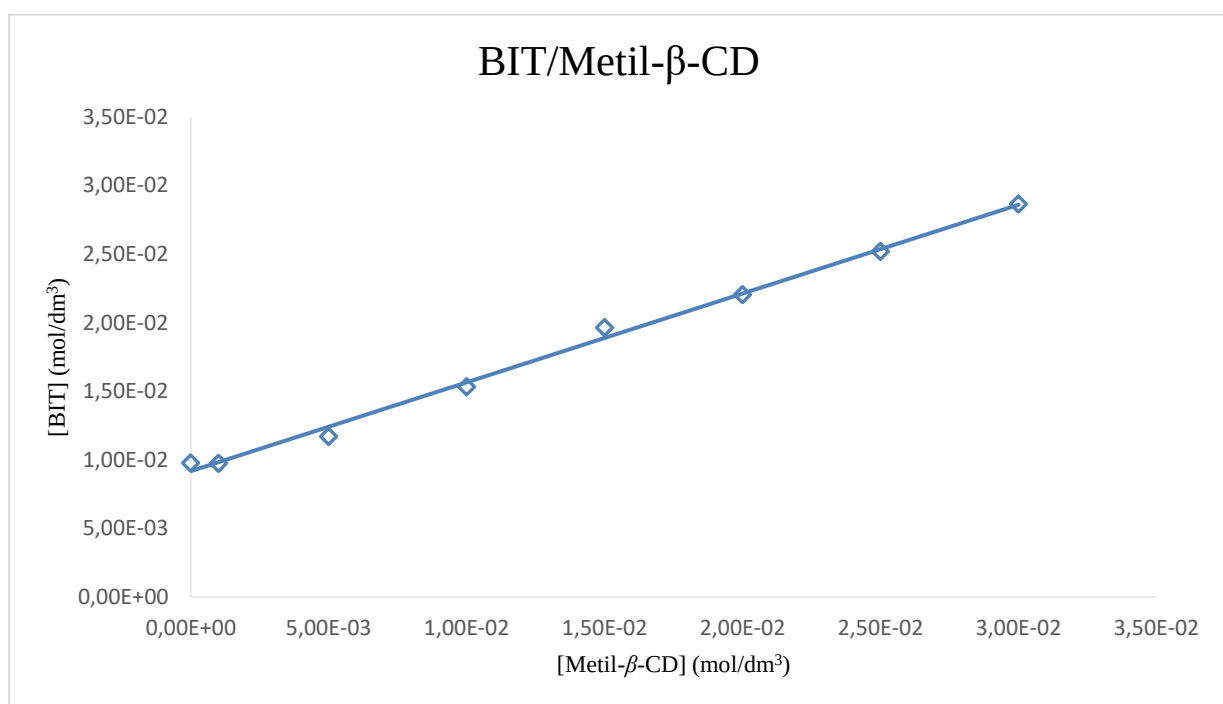


Figura 22 - Diagrama de solubilidade de fases em Metil- β -CD

Em todos os casos obtiveram-se diagramas do tipo A_L , verificando-se que a solubilidade do BIT aumenta linearmente com o incremento da concentração das ciclodextrinas. Uma vez que os declives obtidos são inferiores à unidade, pode-se afirmar que se formam complexos 1:1 com todas as CDs estudadas (Tabela 14). As constantes de estabilidade dos complexos (K), foram calculadas a partir da equação 1, apresentada na secção 3.3.4 (Tabela 14).

Tabela 14 - Resultados obtidos nos diagramas de solubilidade de fases da β -CD, HP- β -CD e Metil- β -CD

CDs	Declive $\pm \sigma$	$S_0 \pm \sigma$	R^2	$K \pm \sigma$ (M^{-1})
β -CD	$0,597 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,001$	0,986	197 ± 1
HP- β -CD	$0,592 \pm 0,014$	$0,0074 \pm 0,0003$	0,999	197 ± 4
Metil- β -CD	$0,655 \pm 0,01$	$0,0093 \pm 0,0003$	0,996	204 ± 3

As constantes de estabilidade, K, calculadas para os complexos de inclusão BIT/ β -CD, BIT/HP- β -CD e BIT/Metil- β -CD foram de $197 \pm 1 M^{-1}$, $197 \pm 4 M^{-1}$ e $204 \pm 3 M^{-1}$, respetivamente. Os resultados obtidos sugerem que a utilização de β -CDs substituídas (hidroxipropil- e metil-) não aumenta significativamente a solubilidade e a capacidade de complexação do BIT comparativamente à ciclodextrina nativa. De facto, as constantes de estabilidade encontradas para os complexos de inclusão estudados apresentam todas a mesma ordem de grandeza. O valor médio encontrado para a solubilidade intrínseca (S_0) de 1,2 g/L é semelhante à solubilidade em água descrita na literatura para o BIT (1,1 g/L a 20°C).^[55]

5.4 Caracterização do complexo de inclusão BIT/HP- β -CD

Uma vez que os estudos de solubilidade mostraram que o complexo de inclusão formado entre o BIT e as diferentes ciclodextrinas estudadas era semelhante, optou-se por preparar o complexo em estado sólido usando somente uma das CDs.

A avaliação da formação de um complexo de inclusão e a sua caracterização requer o uso de diferentes técnicas analíticas, cujos resultados devem ser avaliados em conjunto. Cada técnica explora uma característica particular do complexo de inclusão permitindo, assim, uma melhor compreensão das interações hóspede-CD.

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica simples e útil para estudar a formação de complexos hóspede-CDs em solução. Modificações do espectro UV de uma molécula hóspede na presença de CDs podem fornecer evidências da formação de um complexo de inclusão.

Após a adição de concentrações crescentes das ciclodextrinas (β -CD, HP- β -CD e Metil- β -CD), o máximo de absorção do BIT a 226 nm aumenta de intensidade, o que pode ser consequência da formação do complexo de inclusão. Os resultados obtidos para o BIT na ausência e presença de HP- β -CD são mostrados na figura 23.

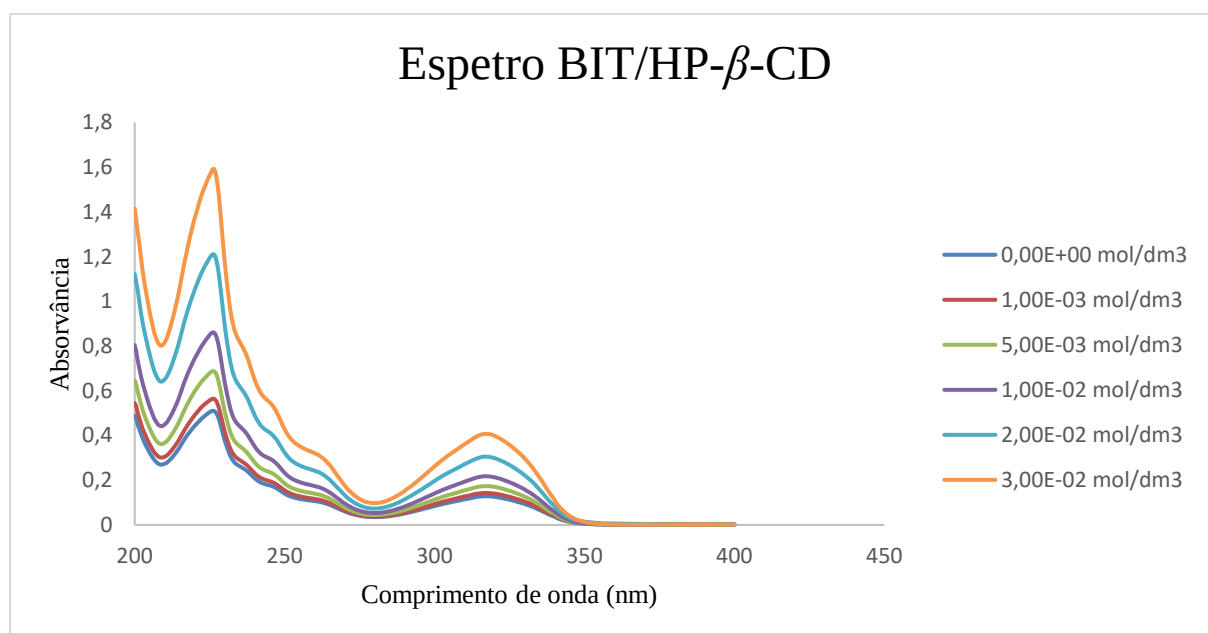


Figura 23 - Espectro do complexo BIT/HP- β -CD

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é o método térmico mais utilizado para a investigação de interações de estado sólido entre moléculas hóspede e CDs. Assim, procedeu-se à preparação do complexo de inclusão BIT/ HP- β -CD em estado sólido usando o método de kneading.^[54]

Os perfis de DSC dos componentes puros (BIT e HP- β -CD) e do complexo de inclusão são mostrados na figura 24. A curva térmica obtida para o BIT é típica de uma substância cristalina com um pico endotérmico acentuado a 158,3°C, correspondente ao ponto de fusão do biocida, seguido por um processo de degradação a 350°C. O pico endotérmico observado a cerca de 100°C para a HP- β -CD corresponde ao processo de desidratação,

seguido de um processo de degradação, que ocorre a cerca de 130°C. A curva térmica obtida para o complexo de inclusão sólido do BIT com a HP- β -CD não mostra o pico endotérmico do biocida a 158,3°C (figura 24). O desaparecimento completo do ponto de fusão do BIT no DSC correspondente ao complexo pode ser assumido como uma evidência da inserção da molécula do biocida dentro da cavidade da ciclodextrina.

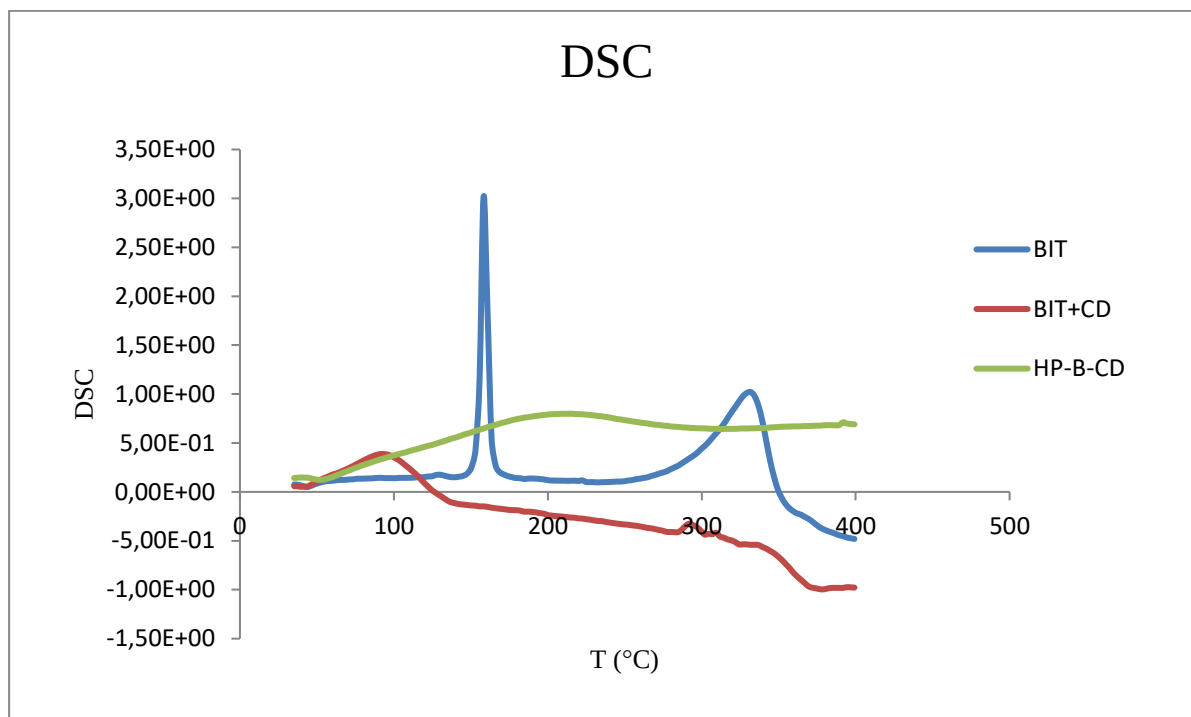


Figura 24 - Curvas térmicas obtidas por DSC do BIT, da HP- β -CD e do complexo BIT/HP- β -CD

6. Conclusões e sugestões de trabalho futuro

O uso de produtos biocidas tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos e a expectativa é que o seu consumo cresça ainda mais até 2050. Por esta razão há a necessidade de encontrar alternativas tecnológicas que permitam tornar os biocidas menos nocivos para o organismo humano e o meio ambiente.

Uma das formas que permite reduzir o impacto destes materiais e ao mesmo tempo aumentar a solubilidade destes envolve o uso da microencapsulação. A microencapsulação é uma técnica na qual substâncias são revestidas por um agente encapsulante obtendo-se partículas de dimensões microscópicas.

Com o objetivo de contribuir para a redução do impacto ambiental dos biocidas, neste estudo foi efetuado o encapsulamento do biocida benzisotiazolinona (BIT) em três ciclodextrinas diferentes: β -ciclodextrina (β -CD), a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e a metil- β -ciclodextrina (Metil- β -CD).

As constantes de estabilidade, K, dos complexos de inclusão BIT/ β -CD, BIT/HP- β -CD e BIT/Metil- β -CD foram de $197 \pm 1 \text{ M}^{-1}$, $197 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ e $204 \pm 3 \text{ M}^{-1}$, respetivamente. Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização de β -CDs substituídas (hidroxipropil- e metil-) não aumenta significativamente a solubilidade e a capacidade de complexação do BIT relativamente à ciclodextrina nativa.

Através da caracterização por espectrofotometria de UV-Vis e por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) do complexo BIT/HP- β -CD foi possível confirmar a formação do complexo BIT/HP- β -CD.

6.1 Trabalhos futuros

No seguimento dos estudos efetuados, considera-se que seria apropriado, para o caso do BIT, efetuar estudos das suas características recorrendo a outro tipo de técnicas como a análise por RMN e FTIR. Posteriormente poderiam ser efetuados ensaios que permitam a avaliação da fotoreatividade e toxicidade do composto face ao biocida livre.

Bibliografia

- [1] OCDE Environmental Outlook to 2050, 2012, “The Consequences of Inaction”, 353 pp. disponível em [http:// dx.doi.org/10.1787/9789264122246-en](http://dx.doi.org/10.1787/9789264122246-en) (acedido a 20 de julho de 2022)
- [2] <https://www.ods.pt/> (acedido a 20 de julho de 2022)
- [3] OCDE, Towards a Sustainable Use of Biocides, 2021. disponível em: [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-CBC-MONO\(2021\)4%20&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-CBC-MONO(2021)4%20&doclanguage=en) (acedido a 5 de dezembro de 2021)
- [4] Diretiva 98/8/CE, 1998 disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:31998L0008> (acedido a 5 de dezembro de 2021)
- [5] Regulamento (UE) N° 528/2012 disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0528&from=FR> (acedido a 5 de dezembro de 2021)
- [6] Chan C. Andrea, Cadena Marimar et al , 2017, Effective delivery of volatile biocides employing mesoporous silicates for treating biofilms, PubMed Central, National Library of Medicine. disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310729/> (acedido a 10 de dezembro de 2021)
- [7] ECHA, Tipos de produtos disponível em: <https://echa.europa.eu/pt/regulations/biocidal-products-regulation/product-types> (acedido a 10 de dezembro de 2021)
- [8] Decreto-lei nº140/2017 disponível em <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/140-2017-114177787> (acedido a 10 de dezembro de 2021)
- [9] Portaria nº17980, 30 setembro de 1960 disponível em: <https://dre.pt/dre/detalhe/portaria/17980-1960-514793> (acedido a 12 de dezembro de 2021)
- [10] Regulamento Delegado EU nº1062/2014 disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R1062&from=NL> (acedido a 12 de dezembro de 2021)
- [11] ECHA, Nova substância ativa disponível em: <https://echa.europa.eu/pt/regulations/biocidal-products-regulation/approval-of-active-substances/new-active-substances> (acedido a 10 de dezembro de 2021)
- [12] Kletskov, Alexey V. & Bumaginb, Nikolay A et al. (2019). Isothiazoles in the Design and Synthesis of Biologically Active Substances and Ligands for Metal Complexes, Thieme Connect. 159-188.
- [13] Alam, Dr. Md. Ashraful & Shimada, Kazuaki & Khan, Md Wahab & Hossain,.(2019). A Review on Isothiazoles and their Derivatives: Synthesis, Reactions and Pharmaceutical Importance. Medicinal & Analytical Chemistry International Journal. 3.

- [14] Isothiazole, Fisher Scientific disponível em: <https://www.fishersci.pt/shop/products/isothiazole-97-acros-organics-1/15529573> (acedido a 15 de janeiro de 2022)
- [15] Santos, Keriolaine Lima dos. 2020. Derivados tiazólicos : síntese, avaliação da atividade antitumoral in vitro e estudos de interação com DNA e albumina sérica bovina. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.
- [16] A. Stefani, Hélio. 2009. Introdução à Química de Compostos Heterocíclicos, 267pp.
- [17] <https://en.wikipedia.org/wiki/Isothiazolinone> (acedido a 15 de janeiro de 2022)
- [18] Silva V, Silva C, Soares P, Garrido EM, Borges F, Garrido J. (2020) Isothiazolinone Biocides: Chemistry, Biological, and Toxicity Profiles. Molecules. PubMed Central, National Library of Medicine
- [19] Garcia-Hidalgo E, Schneider D, von Goetz N, Delmaar C, Siegrist M, Hungerbühler K. (2018) Aggregate consumer exposure to isothiazolinones via household care and personal care products: Probabilistic modelling and benzisothiazolinone risk assessment. PubMed Central, National Library of Medicine
- [20] Su Y, Li H, Xie J, Xu C, Dong Y, Han F, Qin JG, Chen L, Li E. (2019) Toxicity of 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in the marine decapod *Litopenaeus vannamei*, PubMed Central, National Library of Medicine
- [21] Aerts Olivier, Lambert Julien et al. (2017) Contact allergy caused by isothiazolinone derivatives: an overview of non-cosmetic and unusual cosmetic sources, PubMed Central, National Library of Medicine, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28174143/> (acedido a 15 de Janeiro de 2022)
- [22] 1,2-Benzisothiazolinone preservatives: Environment tier II assessment, 2020, disponível em: https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/1%20C2-Benzisothiazolinone%20preservatives_%20Environment%20tier%20II%20assessment.pdf (acedido a 26 de janeiro de 2022)
- [23] HMDB, Showing metabocard for 1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one, disponível em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0034413> (acedido a 26 de janeiro de 2022)
- [24] National Library of Medicine, 1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one disponível em : https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-Benzisothiazol-3_2H_-one (acedido a 20 de março)
- [25] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/89/Benzisothiazolinone.svg/la ngfr-230px-Benzisothiazolinone.svg.png> (acedido a 20 de março de 2022)

- [26] As vantagens dos conservantes em lata, 2020, disponível em: <http://pt.sinotrustchem.com/news/the-advantages-of-in-can-preservatives> (acedido a 20 de março de 2021)
- [27] Zsuzsanna Varga, Edith Nicol, Stéphane Bouchonnet. 2020. Photodegradation of benzisothiazolinone: Identification and biological activity of degradation products, Elsevier, Volume 240.
- [28] Ang Li, Zhuo Chen, Qian-Yuan Wu, Man-Hong Huang, Zi-Ye Liu, Ping Chen, Lin-Chun Mei, Hong-Ying Hu. 2016. Study on the removal of benzisothiazolinone biocide and its toxicity: The effectiveness of ozonation, Chemical Engineering Journal, Volume 300, Páginas 376-383.
- [29] Feio , R. B, Ferreira , O. , et al. Microencapsulation of biocides: a new strategy for biofouling control. Universidade de Lisboa.
- [30] Aiassa V, Garnerio C, Longhi MR, Zoppi A. 2021 Cyclodextrin Multicomponent Complexes: Pharmaceutical Applications. Pharmaceutics. PubMed Central, National Library of Medicine.
- [31] <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:DL-Glucose.svg> (acedido em 26 de fevereiro de 2022)
- [32] Ciclodextrinas, disponível em: <https://www.infoescola.com/bioquimica/ciclodextrinas/> (acedido em 24 fevereiro de 2022)
- [33] Oliveira, Rita; Santos, Delfim; Coelho, Pedro. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica, 2009, disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/1271/2/70-83_FCS_06_-15.pdf (acedido a 24 fevereiro de 2022)
- [34] https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Representacao-esquematica-da-estrutura-tronco-conica-das-ciclodextrinas_fig1_288788237 (acedido a 19 março de 2022)
- [35] Szejtli, József. (2004). Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research. Pure and Applied Chemistry, Volume 76, Nº 10, pp 1825-1845.
- [36] Szenté L, Szejtli J. (1999) Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. PubMed Central, National Library of Medicine
- [37] 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Chemical Book, disponível em: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6204503.htm (acedido a 15 julho de 2022)
- [38] https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-methyl-b-cyclodextrin-Me-b-CD_fig5_257385653 (acedido a 19 de julho 2022)
- [39] https://br.fagron.com/sites/default/files/beta_ciclodextrina_mt_out-18.pdf (acedido a 19 de maio de 2022)

- [40] Silva, Ricardo José de Sousa. 2011. Complexos de inclusão de fármacos com ciclodextrinas e cucurbiturilos. Aplicações farmacoterapêuticas. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia. 76pp
- [41] Teixeira, Ana Carolina Lopes Simões. 2012. Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa. 78pp
- [42] Cosmetics, design.com. Cyclodextrin: an active carrier, stabilizer and solubilizer through encapsulation of your active cosmetics molecules, Março 2019 disponível em <https://www.cosmeticsdesign.com/Headlines/Promotional-Features/Cyclodextrin-an-active-carrier-stabilizer-and-solubilizer-through-encapsulation-of-your-active-cosmetics-molecules> (acedido a 5 junho de 2022)
- [43] https://www.researchgate.net/figure/Types-of-phase-solubility-diagrams-according-to-Higuchi-and-Connors-11-showing-how-the_fig2_325114971 (acedido a 26 de maio de 2022)
- [44] Saokham P, Muankaew C, Jansook P, Loftsson T. (2018) Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. PubMed Central, National Library of Medicine
- [45] Salustio, Paulo. Aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em complexos com a β -ciclodextrina, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 366pp.
- [46] Soares, Bruna de Paula. 2017. Medições de solubilidade de compostos pouco solúveis em água. Mestrado em Engenharia Química, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança. 79pp
- [47] Chopade Tanaii Abhiman, Anantrao Hrushikesh Joshi. (2017). Phase solubility studies of glimepiride with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in different pH. Indo American Journal Of Pharmaceutical Research
- [48] Risch. Sara J.. 1995. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques, Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, Capítulo 1, 2-7pp.
- [49] L. Coulthwaite, K. Bayley, C. Liauw, G. Craig, J. Verran. 2005. The effect of free and encapsulated OIT on the biodeterioration of plasticised PVC during burial in soil for 20 months, International Biodeterioration & Biodegradation, Volume 56, Tópico 2, Páginas 86-93
- [50] .Rodrigues, Tiago Leite. 2013. Utilização da Nanotecnologia para o desenvolvimento sustentável na indústria agro-alimentar. Mestrado em Energias Sustentáveis, Instituto Superior de Engenharia do Porto. 97pp
- [51] Mardones, Lucas, Roque, Leyanet Barberia et al. 2022. Encapsulation and controlled release of isothiazolinones in zeolite NaY (FAU), Journal of Environmental Chemical Engineering, Volume 10, Tópico 2, 107-277pp.

- [52] Mardones, Lucas, Legnoverde, María Soledad et al. 2016. Theoretical and experimental study of isothiazolinone adsorption onto ordered mesoporous silica, *Applied Surface Science*, Volume 389, Páginas 790-796
- [53] Kamtsikakis A, Kavetsou E, Chronaki K, Kiosidou E, Pavlatou E, Karana A, Papaspyrides C, Detsi A, Karantonis A, Vouyiouka S. (2017) Encapsulation of Antifouling Organic Biocides in Poly(lactic acid) Nanoparticles. PubMed Central, National Library of Medicine
- [54] Sanjeev Kumar et al. 2015. Enhancement of dissolution and bioavailability of fenofibrate by Solid Dispersion with sodium citrate, HPMC and sugar derivatives. Scholars Research Library, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Science and Technology India.
- [55] OCDE, Opinion on Benzisothiazolinone, 2012, disponível em: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_099.pdf (acedido a 27 setembro de 2022)