



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

LEONARDO MONTEIRO FRANCISCO DOS SANTOS

**DESENHO, SÍNTESE E ESTUDOS DE PRÓ-FRAGRÂNCIAS UTILIZANDO UM
SACARÍDEO COMO SUPORTE**

CAMPINAS

2023

LEONARDO MONTEIRO FRANCISCO DOS SANTOS

**DESENHO, SÍNTESE E ESTUDOS DE PRÓ-FRAGRÂNCIAS UTILIZANDO UM
SACARÍDEO COMO SUPORTE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Ljubica Tasic

ESTE TRABALHO CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO LEONARDO MONTEIRO
FRANCISCO DOS SANTOS NO DIA
27/10/2023, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. LJUBICA TASIC.

Campinas
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Sa59d Santos, Leonardo Monteiro Francisco dos, 1994-
Desenho, síntese e estudos de pró-fragrâncias utilizando um sacarídeo como suporte / Leonardo Monteiro Francisco dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Ljubica Tasic.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fragrâncias. 2. Precursores de fragrância. 3. Carreadores de moléculas. 4. Sistemas de entrega. I. Tasic, Ljubica, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Design, synthesis and studies of pro-fragrances using a saccharide as support

Palavras-chave em inglês:

Fragrances

Fragrance precursors

Molecule carriers

Delivery systems

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Ljubica Tasic [Orientador]

Airton Gonçalves Salles Junior

Silvana Aparecida Rocco

Data de defesa: 27-10-2023

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0004-4229-0373>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5424865841359561>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ljubica Tasic (Orientadora)

Prof. Dr. Airton Gonçalves Salles Junior (UNICAMP)

Dra. Silvana Aparecida Rocco (CNPEM)

A Ata de defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **LEONARDO MONTEIRO FRANCISCO DOS SANTOS**, aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de outubro de 2023.

“Medo da mudança? O que pode acontecer sem a mudança? O que então é mais agradável ou mais adequado à natureza universal? Alguma coisa útil pode ser realizada sem mudança?”

- Marco Aurélio

DEDICATÓRIA

Para os amantes da perfumaria, espero que este trabalho contribua no desenvolvimento de novas notas que estimulem o bem-estar das pessoas.

AGRADECIMENTOS

Obrigado à Deus pela vida e oportunidade de vislumbrar um pequeno instante das maravilhas do universo. Também agradeço aos momentos inexplicáveis de onde tirei forças para continuar o projeto enquanto trabalhava em período integral.

Obrigado aos meus pais, Silvana e Eduardo, por sempre apoiarem meus estudos, desde criança. Obrigado pela paciência, pelas refeições, por todo o suporte e pelo amor que me deram. Obrigado ao meu irmão Vitor pela paciência em minha ausência como irmão e pelos momentos de convívio, em que pude me divertir.

Obrigado à minha namorada Ingrid pela paciência quando me ausentei para estudar ou fazer experimentos, mesmo antes de iniciar oficialmente o mestrado. Obrigado pela sua presença em incontáveis sextas-feiras à noite, finais de semana e feriados em que você foi comigo ao laboratório me fazer companhia. Obrigado por todo o amor que me deu. Sua presença foi um porto seguro onde eu pude receber o carinho que precisava e desabafar em momentos difíceis. Obrigado a toda família da Ingrid: Elenir, Angelino, Anderson e Igor, pelo companheirismo, paciência e entenderem quantas horas tive que ficar na frente do computador ou na faculdade. Vocês nunca me criticaram e sempre me deram um ambiente prazeroso para eu ficar.

Obrigado aos meus avós Maria Helena e Álvaro, por terem me apoiado tanto nessa fase, por estarem interessados no meu projeto, pelas refeições, acolhimento e amor transmitidos. Vocês foram essenciais para que eu pudesse fazer muitos experimentos durante incontáveis noites, pois pude jantar e tomar banho em dias que precisava de um lugar calmo.

Obrigado aos meus amigos mais próximos, Cainan, Pumba, Daniel e Renan, que sempre me apoiaram em momentos difíceis. Vocês sempre estiveram muito presentes e aliviaram muito minha ansiedade e estresse. Obrigado por se preocuparem e sempre estarem com a mão estendida.

Obrigado ao Márcio Cragel, meu primeiro gestor na Takasago, que foi a primeira pessoa que falei sobre meu desejo de fazer o mestrado, sem certeza se ia conseguir por eu

trabalhar em período integral. Você não só me incentivou sem hesitar, mas me ajudou com toda parte burocrática interna para que isso fosse possível. Eu tenho uma gratidão enorme por ter confiado em mim para fazer esse projeto. Da mesma forma, agradeço à Patricia Karam e ao Adilson Azevedo, que participaram do processo de aceitação da empresa para que eu fizesse o mestrado. Obrigado ao Louis Lombardo, grande cientista e gerente da Takasago nos EUA, agradeço pela orientação na escolha desse tema do projeto.

Obrigado à Professora Ljubica, que foi a pessoa que me acolheu para fazer esse projeto tão bonito. Obrigado por todas as orientações, conselhos e suporte. Graças a você eu pude finalizar um capítulo muito especial da minha vida e por isso conte sempre comigo. Muito obrigado pela paciência e por respeitar meu tempo de trabalho na empresa.

Obrigado a todos do grupo de pesquisa da Professora, que sempre me ajudaram a achar materiais para fazer os experimentos. Obrigado Roney, Neidelênio e Symone por tantas ajudas no início do projeto, vocês tem um lugar muito especial na minha vida. Ao final do projeto, Gabriel, Gonzalo, Thyerre e Márcia, muito obrigado pelas ajudas, vocês foram essenciais.

Obrigado a todo quadro de funcionários do Instituto de Química da Unicamp, em especial à equipe de limpeza dos laboratórios e Instituto, zeladoria e manutenção. Ao agente de segurança (zeladoria) Cristiano Heiras Flausino, um agradecimento especial vai para você, que me acompanhou durante tantas noites em que fiz experimentos depois do trabalho, cansado e às vezes desmotivado. Nossas conversas me animaram muito e foram importantes para eu melhorar meu humor. Muito obrigado.

Obrigado à toda equipe da Takasago que estava torcendo por mim. Obrigado pela paciência nos dias em que me ausentei para dar andamento no projeto. Obrigado a todos os funcionários que torceram por mim, em especial à Amanda, Marina, Cleiton, Marcelo e Livia, meus companheiros de laboratório. Obrigado ao meu atual gestor, Messias Shimizu, por ter me dado a chance de manter o andamento nos experimentos durante alguns dias de trabalho, por ter decidido manter a proposta inicial de fazer esse projeto acontecer. Obrigado Midorikawa-San por eu sentir tanto apoio de sua parte. Obrigado Vanessa e Nadine por todo o suporte durante a fase do painel sensorial. Obrigado a todos os painelistas.

Obrigado ao Professor Leandro e ao Dr. Julian, que me deram o suporte necessário para fazer o experimento HS-SPME-GC-MS.

Obrigado ao Instituto de Química (IQ) da Unicamp e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - número do processo 2014/50867-3) por tornarem a pesquisa no Brasil mais viável e apoiarem esse projeto.

Um enorme agradecimento a todos os músicos, DJs, bandas e orquestras, pois consigo ter um foco muito maior ouvindo música enquanto estudo ou fazia experimentos. Graças a vocês, pude ter mais foco para fazer as atividades com mais fluidez e prazer.

RESUMO

Pró-fragrâncias são derivados químicos formados por um carreador que se liga covalentemente a uma fragrância de forma temporária, liberando-a de forma mais controlada. O projeto investiga a síntese, caracterização e estudo de estabilidade e liberação controlada de duas pró-fragrâncias formadas a partir do ácido D-glicurônico (GA) e das fragrâncias citronelol (CIT) e cis-3-hexen-1-ol (HEX). As pró-fragrâncias PRO-CIT e PRO-HEX foram obtidas através de uma esterificação utilizando catálise enzimática pela lipase EC 3.1.1.3, com 8,26% e 12,74% de rendimento, respectivamente, e foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Por espectroscopia no infravermelho uma banda carbonila-éster (1726 cm^{-1}) foi observada. Por espectrometria de massas, os produtos tiveram íons-alvos confirmados: $(M+Na)^+$; $(2M+Na)^+$; $(M+Na-H_2O)^+$; íon com sódio menos a porção da fragrância; íon com sódio menos a porção da fragrância e uma molécula de água; com módulos de erro menores que 2 ppm. Por ressonância magnética nuclear foi feita a caracterização das estruturas químicas, com ênfase no desaparecimento de sinal $-CH_2-$ ligado à hidroxila da fragrância livre (1H 3,42 ppm; ^{13}C 59,27 ppm para CIT; 1H 3,37 ppm; ^{13}C 62,91 ppm para HEX) e presença de sinal $-CH_2-$ ligado ao oxigênio-éster da pró-fragrância (1H 4,09 ppm; ^{13}C 63,21 ppm para PRO-CIT; 1H 4,05 ppm; ^{13}C 66,00 ppm para PRO-HEX). Estudos por termogravimetria mostraram que as pró-fragrâncias apresentaram maior estabilidade e liberação térmica controlada das fragrâncias, apresentando uma diferença de mais de 94 °C do início da volatilização das fragrâncias livres. Um estudo por microextração em fase sólida do espaço livre (*headspace*) com cromatografia gasosa e espectrometria de massas mostrou que a concentração relativa de fragrância livre no *headspace* foi menor para as pró-fragrâncias em relação às respectivas fragrâncias livres em uma matriz contendo a microbiota do antebraço humano. Por fim, um painel sensorial foi feito para avaliar a intensidade de fragrância sentida na pele ao longo de 120 min, comparando HEX com PRO-HEX, evidenciando que a partir de 60 min PRO-HEX apresentou maior intensidade. Embora o projeto visa estudar pró-fragrâncias, o tema está inserido no universo de pró-moléculas, de forma a não se restringir apenas no ramo de fragrâncias, abrindo a possibilidade para potenciais aplicações de novos pró-fármacos.

Palavras-chave: pró-fragrância, precursor de fragrância, carreador, entrega controlada.

ABSTRACT

Pro-fragrances are chemical derivatives formed by a carrier that covalently binds to a fragrance temporarily, releasing it in a more controlled manner. The project investigates the synthesis, characterization and study of stability and controlled release of two pro-fragrances formed from D-glucuronic acid (GA) and the fragrances citronellol (CIT) and cis-3-hexen-1-ol (HEX). The PRO-CIT and PRO-HEX pro-fragrances were obtained through an esterification using enzymatic catalysis by lipase EC 3.1.1.3, with 8,26% and 12,74% yield, respectively. The products were characterized by spectroscopic and spectrometric techniques. By infrared spectroscopy a carbonyl ester band (1726 cm^{-1}) was observed. By mass spectrometry the products had confirmed target ions: $(M+Na)^+$; $(2M+Na)^+$; $(M+Na-H_2O)^+$; sodium ion minus the fragrance portion; sodium ion minus the fragrance portion and one water molecule; with error modules smaller than 2 ppm. The chemical structures were characterized by nuclear magnetic resonance, with emphasis on the disappearance of the $-CH_2-$ peak linked to the hydroxyl of the free fragrance (1H 3.42 ppm; ^{13}C 59.27 ppm for CIT; 1H 3.37 ppm; ^{13}C 62.91 ppm for HEX) and presence of $-CH_2-$ signal linked to the oxygen-ester of the pro-fragrance (1H 4.09 ppm; ^{13}C 63.21 ppm for PRO-CIT; 1H 4.05 ppm; ^{13}C 66.00 ppm for PRO-HEX). Studies by thermogravimetry showed that the pro-fragrances presented greater stability and controlled thermal release of the fragrances, presenting a difference of more than $94\text{ }^{\circ}C$ from the beginning of the volatilization of the free fragrances. The relative concentration of free fragrance in the headspace was lower for the pro-fragrances compared to the respective free fragrances in a matrix containing the microbiota of the human forearm as measured using HS-SPME-GC-MS. Finally, a sensory panel evaluated the intensity of the fragrance felt on the skin over 120 min, comparing HEX with PRO-HEX, showing that from 60 min onwards PRO-HEX presented greater intensity of the fragrance. Although the project aimed to study pro-fragrances, the theme is inserted in the universe of pro-molecules, so as not to be restricted to the field of fragrances, opening up the possibility for potential applications of new prodrugs.

Keywords: pro-fragrance, fragrance precursor, carrier, controlled delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes modelos para imobilização de enzimas: (A) ligação covalente, (B) ligação covalente em múltiplos pontos, (C) ligação covalente em múltiplos pontos de enzima em suporte funcionalizado, (D) <i>cross-linking</i> , (E) aprisionamento em matriz, (F) encapsulação, (G) adsorção, (H) nanopartículas magnéticas, (I) nanoflores híbridas; adaptado de [15].....	23
Figura 2. Três estruturas químicas utilizadas como pró-moléculas de ligação covalente; adaptado de [16].....	24
Figura 3. Formação de pró-molécula do tipo Base de Schiff (Aurantiol), indicando estrutura molecular, pressão de vapor (20-25 °C) e descrição olfativa ^[17]	24
Figura 4. Formação de pró-molécula do tipo <i>cross-linking</i> (PSPA-PEG-Pt) em duas etapas; adaptado de [18].....	26
Figura 5. Deposição de microcápsulas (membrana de cor vermelha) com fragrância (cor amarela) durante lavagem de roupas: (1) produto de lavanderia com microcápsulas, (2) lavagem com produto, (3) microcápsulas depositadas nas fibras de tecido, susceptíveis a liberar fragrância; adaptado de [20].....	27
Figura 6. (a) Estrutura geral da ciclodextrina (os derivados α , β e γ são definidos por $n = 1, 2$ e 3 , respectivamente) e (b) representação esquemática da estrutura tridimensional, definidas pelo arranjo das unidades de glicose; adaptado de [23].....	28
Figura 7. Conceito de pró-fragrância: a) Concentração de fragrância em função do tempo; b) conceito de liberação controlada de fragrância via precursor; c) representação simplificada das fragrâncias em função do tempo (0-3).....	32
Figura 8. Representações simplificadas: I) liberação de fragrância vermelha; II) liberação controlada de fragrância verde, via precursor verde-azul; III) sistema I + II; IV) sistema III, onde a esfera azul também possui valor olfativo.....	33
Figura 9. Ciclamoxazolidina como pró-fragrância; adaptado de [37].....	34
Figura 10. Scentaurus Tonkarose [®] como pró-fragrância precursora da cumarina e 9-decen-1-ol; adaptado de [37].....	35
Figura 11. Formação de Haloscent D [®] como pró-fragrância e sua quebra na presença de ar, formando γ -damascona e aldeído láurico; adaptado de [37].....	35
Figura 12. Esterificação entre GA e CIT (esquema superior) e entre GA e HEX (esquema	

inferior), catalisada por enzima lipase, formando pro-citronelol (PRO-CIT).....	39
Figura 13. Estruturas primária (a), secundária (b), e terciária (c) da lipase.....	40
Figura 14. Esterificação catalisada por lipases. Tríade catalítica representada em preto; resíduo do buraco oxianion em azul; porção do ácido em vermelho; porção do álcool em marrom. (a) Ataque nucleofílico da hidroxila-serina ao carbono carboxílico do ácido; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da hidroxila-álcool; (d) intermediário tetraédrico; (e) formação do éster e regeneração da enzima livre; adaptado de [60].....	42
Figura 15. Fluxograma de processo para determinação do aspecto visual da solubilidade entre o carreador e solvente.....	52
Figura 16. Pró-fragrâncias PRO-CIT e PRO-HEX.....	54
Figura 17. FT-IR do citronelol (CIT), cis-3-hexen-1-ol (HEX), ácido glicurônico (GA), pró-fragrância PRO-CIT e PRO-HEX.....	55
Figura 18. Espectro de massas de PRO-CIT obtido no ObriTrap-MS. Modo <i>full scan</i> , campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,20-0,80.....	57
Figura 19. Comparação entre espectros - obtido (superior) e o simulado (inferior) para PRO-CIT . Modo <i>full scan</i> , campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,90.....	57
Figura 20. Espectro de massas de PRO-CIT obtido no ObriTrap-MS. Modo PRM (fragmentação) , energia 50 nce, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,2-0,8.....	58
Figura 21. Espectro de massas de PRO-HEX obtido no ObriTrap-MS. Modo <i>full scan</i> , campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,11.....	58
Figura 22. Comparação entre espectros - obtido (superior) e o simulado (inferior) para PRO-HEX . Modo <i>full scan</i> , campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,11.....	59
Figura 23. Comparação entre os espectros - obtido (superior) e o simulado (inferior) para PRO-HEX . Modo <i>full scan</i> , campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,11.....	59
Figura 24. Comparação entre os espectros - obtido l (superior) e o simulado (inferior) para PRO-HEX . Modo HCD (fragmentação do precursor 299 m/z) , energia 30 nce, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 1,15.....	60
Figura 25. Comparação entre espectros - real (superior) e simulado (inferior) de PRO-HEX .	

Modo HCD (fragmentação do precursor 299 m/z) , energia 40 nce, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 1,52.....	60
Figura 26. Sobreposição e atribuição de espectros HSQC, da amostra CIT (verde escuro) e PRO-CIT (verde claro) diluídas em DMSO-d ₆ . Valores em ppm do deslocamento químico de ¹ H e ¹³ C, respectivamente.....	61
Figura 27. Sobreposição e atribuição de espectros HSQC, da amostra HEX (rosa) e PRO-HEX (azul) diluídas em DMSO-d ₆ . Valores em ppm do deslocamento químico de ¹ H e ¹³ C, respectivamente.....	62
Figura 28. Atribuição de dados espectrais de ¹ H NMR da amostra PRO-CIT diluída em DMSO-d ₆	63
Figura 29. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra PRO-CIT diluída em DMSO-d ₆	63
Figura 30. Atribuição dos dados espectrais do espectro de ¹ H NMR da amostra PRO-HEX diluída em DMSO-d ₆	64
Figura 31. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra PRO-HEX diluída em DMSO-d ₆	64
Figura 32. Atribuição dos dados espectrais de NMR pelo <i>software</i> TopSpin 3.6.5. PRO-CIT na parte superior e PRO-HEX na parte inferior.....	66
Figura 33. Ilustração de dados obtidos em análise de CIT por TGA expressos em massa em função da temperatura	67
Figura 34. Ilustração de dados obtidos em análise de GA por TGA expressos em massa em função da temperatura	68
Figura 35. Ilustração de dados obtidos em análise de PRO-CIT por TGA expressos em massa em função da temperatura.....	69
Figura 36. Ilustração de dados obtidos em análise de CIT , GA e PRO-CIT por TGA expressos em massa em função da temperatura.....	69
Figura 37. Ilustração de dados obtidos em análise de CIT , GA e PRO-CIT por TGA expressos em massa em derivada da massa em função da temperatura.....	70
Figura 38. Ilustração de dados obtidos em análise de HEX por TGA expressos em massa em função da temperatura.....	71
Figura 39. Ilustração de dados obtidos em análise de PRO-HEX por TGA expressos em massa em função da temperatura.....	72

Figura 40. Ilustração de dados obtidos em análise de HEX , GA e PRO-HEX por TGA expressos em massa em função da temperatura.....	72
Figura 41. Ilustração de dados obtidos em análise de HEX , GA e PRO-HEX por TGA expressos em derivada da massa em função da temperatura.....	73
Figura 42. Relação das áreas obtidas do cromatograma parcial dos íons referentes às fragrâncias. A área é proporcional à concentração da fragrância livre no headspace.....	77
Figura 43. HS-SPME-GC-MS de CIT : a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 81,06988 Da ; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 9,49-10,30 min).....	78
Figura 44. HS-SPME-GC-MS de PRO-CIT : a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 81,06990 Da ; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 9,41-9,63 min).....	79
Figura 45. HS-SPME-GC-MS de HEX : a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05420 Da ; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,26-4,58 min).....	80
Figura 46. HS-SPME-GC-MS de PRO-HEX : a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05417 Da ; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,22-4,33 min).....	81
Figura 47. HS-SPME-GC-MS de PRO-HEX-2 (150 min) : a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05418 Da ; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,25-4,39 min).....	82
Figura 48. HS-SPME-GC-MS de HEX + GA : a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05415 Da ; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,31-4,50 min).....	83
Figura 49. Média e erro padrão (n-1) da intensidade de fragrância em função do tempo do painel sensorial.....	86
Figura 50. Porcentagem de votos para qual amostra é mais intensa em função do tempo do painel sensorial.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Opções de polissacarídeos e seus derivados como carreadores de fragrâncias.....	37
Tabela 2. Principais informações sobre a lipase utilizada ^[53, 55, 56]	44
Tabela 3. Principais informações sobre o suporte de imobilização da lipase ^[58]	45
Tabela 4. Amostras utilizadas para o estudo HS-SPME-GC-MS.....	48
Tabela 5. Resumo dos parâmetros cromatográficos usados na avaliação da fragrância por HS-SPME-GC-MS.....	49
Tabela 6. Formulações de deo colônia utilizadas para o painel sensorial. Porcentagem em massa/massa.....	50
Tabela 7. Escala de intensidade de fragrância para avaliação do painel sensorial.....	51
Tabela 8. Aspecto visual da solubilidade entre carreadores e solventes comumente utilizados na indústria de fragrâncias. Na última coluna, está o número das etapas referentes à Figura 15 em que a amostra se submeteu para atingir o aspecto visual. Em negrito estão evidenciados os testes mais promissores.....	53
Tabela 9. Valores experimentais e atribuição de massa para os íons formados em <i>full scan</i> MS e fragmentação MS/MS.....	56
Tabela 10. Atribuição dos dados espectrais de ¹ H NMR e 2D NMR, pelo <i>software</i> TopSpin 3.6.5.....	65
Tabela 11. Relação entre os íons selecionados de cada amostra com o início/fim do tempo de retenção (RT, do inglês <i>retention time</i>) do seu cromatograma, onde a área foi obtida em valor de intensidade e porcentagem.....	75
Tabela 12. Razão das áreas obtidas do cromatograma parcial dos íons referentes às fragrâncias. A área é proporcional à concentração da fragrância livre no <i>headspace</i>	76
Tabela 13. Média e erro (n-1) de intensidade em função do tempo e <i>p</i> -valores (três casa decimais) pelo Teste t <i>Student</i> do painel sensorial.....	85

LISTA DE ABREVIACÕES

CAL-B: lipase B de *Candida antarctica*

CIT: citronelol

CNC: nanocristais de celulose, do inglês *cellulose nanocrystal*

CNF: nanofibras de celulose, do inglês *cellulose nanofibers*

DPG: dipropilenoglicol

FT-IR: espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês *Fourier-Transform infrared spectroscopy*

GA: ácido D-glicurônico, do inglês *D-glucuronic acid*

HEX: cis-3-hexen-1-ol

HS-SPME-GC-MS: microextração em fase sólida do espaço livre acoplada com cromatografia gasosa e espectrometria de massas, do inglês *headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry*

MTD: direcionamento magnético de fármaco, do inglês *magnetic drug targeting*

MS: espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

NMR: ressonância magnética nuclear, do inglês *nuclear magnetic resonance*

PEG: polietilenoglicol

PG: propilenoglicol

PRO-CIT: pro-citronelol

PRO-HEX: pro-cis-3-hexen-1-ol

PSPA: copolímero com núcleo de poli[(*p*-iodometil)estireno] e braços de ácido poliacrílico

TGA: análise termogravimétrica, do inglês *thermogravimetric analysis*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. A indústria de fragrâncias.....	20
1.2. Do efeito <i>long lasting</i> ao universo das pró-moléculas.....	21
1.3. Motivação e justificativa projeto.....	22
1.4. Revisão da Literatura.....	22
1.4.1. Carreadores e Sistemas de <i>Delivery</i>	22
1.4.1.1. Ligação covalente.....	23
1.4.1.2. Reticulação (<i>Cross-linking</i>).....	25
1.4.1.3. Aprisionamento da matriz (<i>matrix entrapment</i>).....	26
1.4.1.4. Encapsulação.....	27
1.4.1.5. Adsorção.....	28
1.4.1.6. Nanomagneto.....	29
1.4.2. <i>Prodrugs</i>	29
1.4.3. Pró-fragrâncias.....	31
1.4.4. Polissacarídeos e seus derivados como carreadores.....	36
1.4.5. Esterificação catalisada pela lipase EC 3.1.1.3.....	38
2. OBJETIVOS.....	43
3. METODOLOGIA.....	44
3.1. Síntese das pró-fragrâncias.....	44
3.1.1. Materiais.....	44
3.1.2. Método.....	45
3.2. Caracterização.....	46
3.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	46
3.2.2 Espectrometria de massas.....	46
3.2.3 Ressonância magnética nuclear.....	47
3.3 Estudo de estabilidade e liberação controlada das pró-fragrâncias.....	47
3.3.1. Análise termogravimétrica.....	47

3.3.2. Microextração em fase sólida do espaço livre acoplada com cromatografia gasosa e espectrometria de massas.....	47
3.3.3. Painel sensorial.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. Estudo de solubilidade dos carreadores.....	52
4.2 Síntese de pró-fragrâncias.....	54
4.3. Caracterização de pró-fragrâncias.....	55
4.3.1 Dados de pró-fragrâncias por FT-IR.....	55
4.3.2 Dados de pró-fragrâncias por MS.....	55
4.3.3. Dados de pró-fragrâncias por NMR.....	61
4.4. Estudo de estabilidade e liberação controlada de pró-fragrâncias.....	67
4.4.1 Estabilidade e liberação térmica de pró-fragrâncias.....	67
4.4.2. Dados de pró-fragrâncias por HS-SPME-GC-MS.....	74
4.4.3. Painel sensorial.....	84
5. CONCLUSÃO.....	87
6. REFERÊNCIAS.....	89
7. MATERIAL SUPLEMENTAR (APÊNDICES).....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. A indústria de fragrâncias

A perfumaria é uma área em que a ciência, tecnologia e arte se encontram: desenvolver novas fragrâncias (não-comestíveis) e aromas (comestíveis) que possam provocar uma percepção olfativa adequada às pessoas que, mesmo sem se darem conta, estão cercadas por um série de fragrâncias e aromas na sua vida cotidiana^[1].

Durante o dia-a-dia, milhares de pessoas utilizam produtos perfumados, do momento em que acordam, até o momento em que vão dormir. Ao acordar, uma pessoa pode iniciar o dia tomando um banho, onde irá utilizar um sabonete, podendo ainda lavar seus cabelos com shampoos e condicionadores. Depois de se secar, pode passar um desodorante, um creme hidratante, filtro solar e, por último, finalizar com o perfume que mais gosta de passar o dia.

Todos esses produtos voltados para cuidados pessoais proporcionam uma pequena porção de prazer durante o dia de uma pessoa comum, trazendo junto uma pequena experiência que pode marcar a vida dela relacionando aqueles odores com uma fase de sua vida. Isso sem considerar os aromas de pastas de dente, as fragrâncias de amaciantes e lava-roupas que ficam nas roupas que utilizamos, o lava-louças que lavamos os pratos em que comemos e outros inúmeros produtos perfumados.

A indústria de fragrâncias tem um papel muito importante na forma como vivemos e experienciamos nossa vida atual, sem nos darmos conta. É papel das Casas de Fragrâncias, empresas responsáveis por criarem as fragrâncias e aromas, garantir que esses produtos tragam uma experiência prazerosa na vida das pessoas, com segurança e ética ambiental. Vale ressaltar que a fragrância é uma mistura de matérias-primas de valor olfativo, podendo ter mais de 100 moléculas diferentes em sua composição.

A química tem papel fundamental no desenvolvimento dessa área, permeando por todas as disciplinas: orgânica, analítica, físico-química, bioquímica, materiais etc; portanto, químicos, farmacêuticos e engenheiros químicos são especialmente essenciais para que essa indústria se sustente por longos anos.

A indústria de fragrâncias apresenta uma série de desafios, alguns nos quais estão em constante e progressivo desenvolvimento. Um desses desafios é o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem maiores performances, como o desenho e síntese de novas

moléculas olfativas, o aumento de tempo de retenção dela em uma superfície, o aumento de sua intensidade olfativa ou o aumento de sua estabilidade em uma base de produto, suscetível à processos de degradação ou oxidação.

1.2. Do efeito *long lasting* ao universo das pró-moléculas

Frequentemente, a eficiência de uma fragrância é medida pela sua duração na superfície onde foi aplicada – quanto maior o tempo de retenção (do inglês *long lasting*), maior eficiência^[2-6]. Dessa forma, algumas tecnologias são empregadas para procurar atender à essa recorrente demanda, tal como o uso de microcápsulas, ao qual utiliza-se de um mecanismo físico: uma casca polimérica na qual encapsula as moléculas olfativas as mantém mais estáveis e impedidas de evaporar/volatilizar. Após a desintegração de sua membrana, a fragrância é liberada, obtendo um maior controle de entrega da fragrância, aumentando o tempo de retenção na superfície aplicada^[7, 8].

Outro tipo de tecnologia empregada é o uso de pró-fragrâncias, também podendo ser encontrada com o nome de precursores^[9, 10] de fragrâncias, na qual a entrega da fragrância ocorre a partir de um mecanismo químico: a fragrância se liga a um carreador através de uma ligação covalente em que, quando exposta ao ambiente, se quebra e entrega a fragrância. Esse efeito confere ao usuário a possibilidade de sentir por mais tempo uma fragrância, na qual, além de trazer um valor olfativo, pode conter matérias-primas da aromaterapia, capazes de aprimorar a saúde física e mental, como caso do citral (com efeitos de alívio a estresse e depressão)^[11] e limoneno (efeitos anti-ansiedade e aprimoramento de aprendizagem e memória)^[12].

Da mesma forma que as pró-fragrâncias são moléculas que fazem uma entrega mais controlada da fragrância, existem diversas outras pró-moléculas que fazem a entrega mais controlada de sua molécula de interesse. Na verdade, as pró-fragrâncias estão incluídas no universo de pró-moléculas, um tema bastante abrangente, interdisciplinar e muito comum no contexto de entrega inteligente (do inglês, *smart delivery*) de bioativos. As pró-moléculas são capazes de liberar o ativo a partir de diferentes mecanismos, estimulados pelo aumento de temperatura, mudanças no pH, incidência de luz, reações redox, ação enzimática, hidrólise ou oxidação.

O estudo de pró-moléculas, portanto, permite explorar novas formas de entregar um bioativo, abrangendo: novas alternativas para sínteses; utilização de reagentes mais sustentáveis para síntese de pró-moléculas, utilização de resíduos como carreadores, agregando valor a esse material (como o agropecuário)^[13, 14]; liberação controlada de moléculas ativas, podendo haver mais de um benefício além da entrega controlada, como o aumento de sua estabilidade enquanto carreada. Dessa forma, é de interesse da indústria de fragrâncias explorar a tecnologia de pró-moléculas.

Pelo caráter abrangente, os conhecimentos adquiridos no projeto não se limitam à área de fragrâncias, podendo ser aplicados em outros setores, como síntese de pró-fármacos, suplementos alimentares, agroquímicos mais sustentáveis, controle de pragas, dentre outros. Também é de interesse da academia o desenvolvimento de estudos de pró-moléculas, visando uma aplicabilidade em diversos setores importantes para a sociedade.

1.3. Motivação e justificativa projeto

O projeto visa o estudo de duas pró-fragrâncias, formadas a partir da reação entre o ácido glicurônico (GA) com citrônolol (CIT) e com cis-3-hexen-1-ol (HEX). Para isso, serão investigadas três etapas: síntese, caracterização e estudos de estabilidade e liberação das fragrâncias. Tanto CIT quanto HEX são fragrâncias de amplo uso na indústria de fragrâncias.

O ácido glicurônico é um derivado da pectina e D-glicose que pode ter seu valor agregado nessa síntese, contribuindo para uma maior performance de fragrâncias contendo grupo hidroxila. Além disso, ele é um composto não-tóxico e biodegradável, podendo ser amplamente utilizado em produtos cosméticos e alimentícios. É importante ressaltar que o Brasil é líder mundial na produção de laranja, gerando uma grande quantidade de bagaço (resíduo da agroindústria), que contém a pectina como polissacarídeo majoritário, abrindo possibilidade para reutilização desse bagaço para agregar valor à indústria de fragrâncias.

1.4. Revisão da Literatura

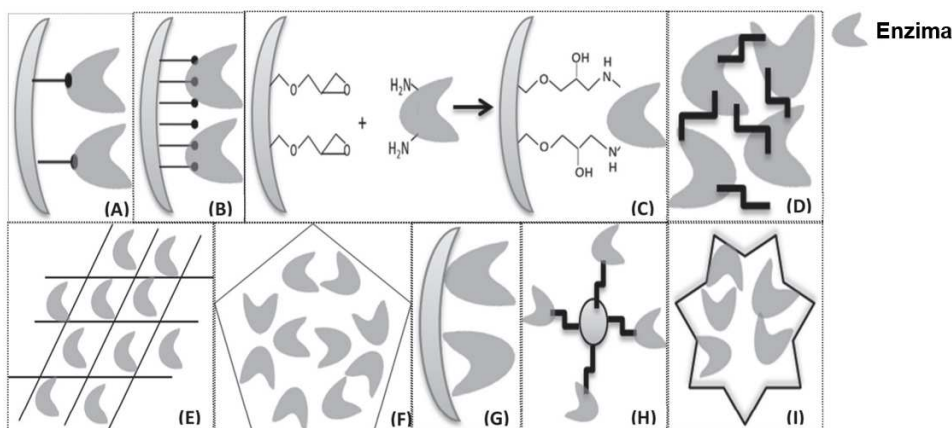
1.4.1. Carreadores e Sistemas de *Delivery*

Essencialmente, o projeto busca reduzir a volatilidade de fragrâncias, através de um sistema de *smart delivery* (do inglês entrega “inteligente”, mais controlada).

Utilizando um carreador é possível criar esse sistema de *delivery*. Existem diversos sistemas de *delivery* de moléculas (bio)ativas e a seguir serão descritos os principais modelos. O primeiro é baseado via ligação covalente e será o mais discutido, uma vez que é o modelo utilizado para construção de pró-fragrâncias.

Durante o projeto, é possível notar que existe uma similaridade entre esses sistemas de *delivery* com sistemas de imobilização de ativos, como enzimas, conforme ilustrado na Figura 1^[15]. A diferença entre eles é que na imobilização o ativo deve ter alta tendência de se manter nesse sistema durante todo o tempo, enquanto que no sistema *delivery* o ativo deve se manter por um tempo determinado.

Figura 1. Diferentes modelos para imobilização de enzimas: (A) ligação covalente, (B) ligação covalente em múltiplos pontos, (C) ligação covalente em múltiplos pontos de enzima em suporte funcionalizado, (D) *cross-linking*, (E) aprisionamento em matriz, (F) encapsulação, (G) adsorção, (H) nanopartículas magnéticas, (I) nanoflores híbridas; adaptado de [15]



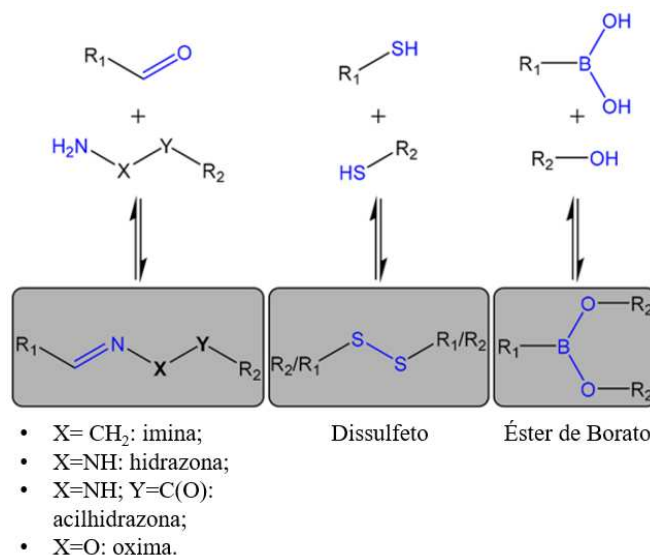
1.4.1.1. Ligação covalente

Nesse modelo, o composto químico é ligado covalentemente em um carreador, formando uma ligação relativamente estável, na qual deve quebrar no momento em que o ativo deve agir. Esse sistema de *smart delivery* é o que será utilizado nesse projeto, para formar pró-fragrâncias. O desafio desse modelo é formar uma ligação que seja estável, mas lábil quando deve entregar o ativo.

Sobre esse tipo de sistema, existe a chamada química covalente dinâmica (do inglês *dynamic covalent chemistry*), na qual estuda as reações reversíveis como forma de entregar bioativos de forma controlada. Alguns exemplos populares dessa química estão na

Figura 2. Observe que são reações de condensação reversíveis^[16].

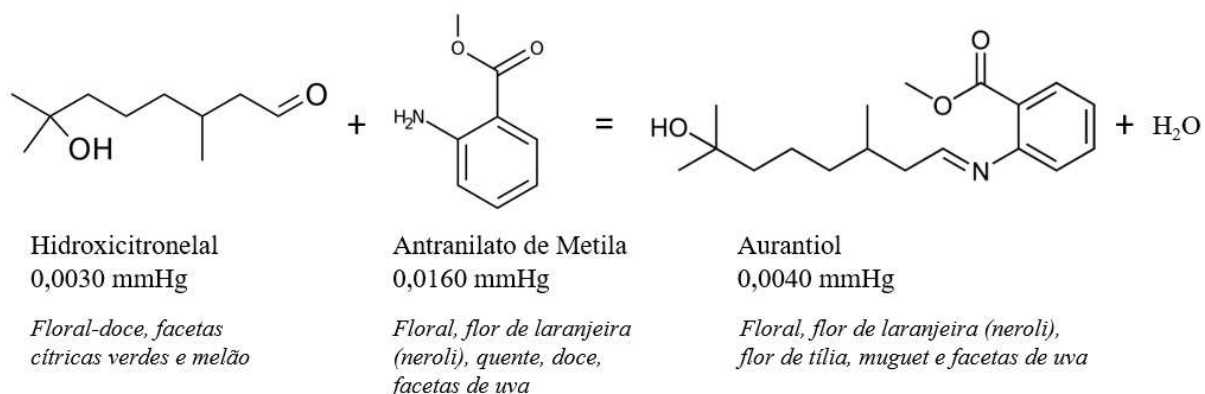
Figura 2. Três estruturas químicas utilizadas como pró-moléculas de ligação covalente; adaptado de [16]



Para o primeiro caso, à esquerda, é possível trabalhar com ativos aldeídos/cetonas ou aminas como bioativos, sendo um exemplo a formação de Bases de Schiff (aldeído mais amina primária); para o segundo caso, tióis e, para o terceiro, ácidos de boro ou álcoois.

As Bases de Schiff são amplamente utilizadas na indústria de fragrâncias, como o caso do Aurantíol: uma Base de Schiff formada a partir do hidroxicitronelal e antranilato de metila, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Formação de pró-molécula do tipo Base de Schiff (Aurantíol), indicando estrutura molecular, pressão de vapor (20-25 °C) e descrição olfativa^[17]



Conforme ilustrado, o antranilato de metila possui um vapor de pressão quatro vezes maior que o aurantiol. Como a pressão de vapor está diretamente relacionada à volatilidade, o aurantiol é bem menos volátil que o antranilato de metila.

O aurantiol é utilizado tanto quanto matéria-prima olfativa em si (sem necessidade de liberar seus reagentes) uma vez que tem valor olfativo, apresentando ótima performance em produtos para lavanderia (amaciantes e lava-roupas); quanto como uma pró-fragrância, já que pode sofrer hidrólise e liberar simultaneamente o hidroxicitronelal e antranilato de metila.

A ideia por trás da química covalente dinâmica é que conforme o ativo for sendo liberado, ele será consumido ou simplesmente retirado do sistema inicial (por exemplo ao ser evaporado/volatilizado), reduzindo sua concentração, favorecendo o deslocamento químico a favor de sua formação. Assim, ao longo do tempo, a reação vai ocorrendo de acordo com uma cinética regida pelas condições do ambiente (luz, presença de água, enzimas, oxigênio etc) e da interação com a matriz (pele humana, tecido de algodão, piso etc).

1.4.1.2. Reticulação (*Cross-linking*)

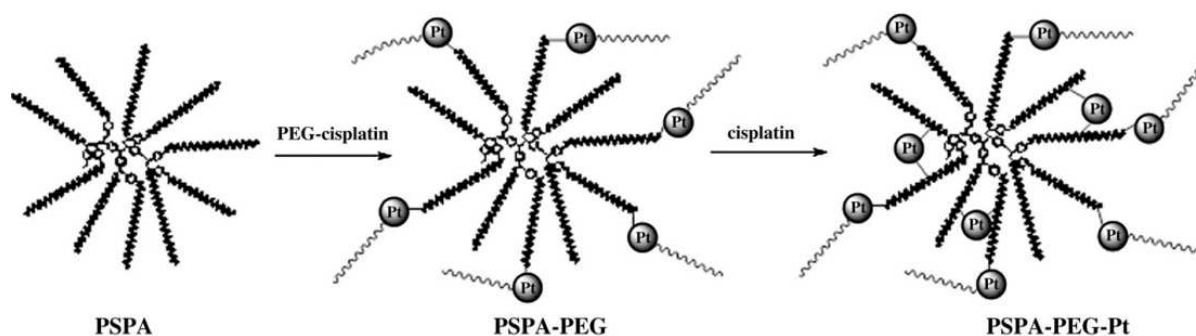
A reticulação (do inglês *cross-linking*) é a formação de ligações covalentes ou forças de van der Waals adicionais entre as moléculas de um sistema polimérico (composto de uma ou mais espécies químicas de polímeros). Essas ligações ou interações adicionais podem ocorrer entre as próprias moléculas do sistema polimérico ou sob ação de um agente reticulador adicionado. Isso resulta na criação de uma espécie de rede tridimensional, uma matriz, alterando as propriedades físico-químicas do material.

O *cross-linking* pode ocorrer naturalmente ou ser induzido por meio de processos químicos ou físicos, como emissão de calor, radiação ou inserir agentes de reticulação. É uma das técnicas utilizadas para a fabricação de materiais como plásticos, borrachas, adesivos e resinas, podendo oferecer maior resistência mecânica, durabilidade e estabilidade térmica.

Nesse tipo de *delivery*, o ativo é o agente de reticulação, formando ligações covalentes ou interagindo com certas cadeias dos polímeros nesse sistema. Assim, o carreador é o sistema polimérico, o ativo é o agente de reticulação e a pró-molécula é o sistema reticulado.

Um exemplo de pró-molécula desse tipo é o pró-fármaco PSPA-PEG-Cisplatina (PSPA-PEG-Pt), formado em duas etapas: (1) o ativo cisplatina é incorporado a um polímero de **polietilenoglicol** (PEG) como um ligante, que depois é integrada a um copolímero com núcleo de **poli[(*p*-iodometil)estireno]** e braços de **ácido poliacrílico** (PSPA); (2) o ativo cisplatina é adicionado em seguida como agente reticulador, interagindo entre as cadeias de PSPA, conforme a Figura 4^[18].

Figura 4. Formação de pró-molécula do tipo *cross-linking* (PSPA-PEG-Pt) em duas etapas; adaptado de [18]



A cisplatina (Pt) tem uma dupla atuação na estruturação desse pró-fármaco: como ligante entre PEG e PSPA (primeira etapa) e como agente de reticulação (segunda etapa). Em ambas as etapas, ele é parte integrante do sistema, fazendo ligações/interações entre polímeros.

A cisplatina é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de câncer, que apresenta efeitos colaterais significativos devido à sua toxicidade sistêmica em sua forma livre. Assim, a PEG-Pt e PSPA-PEG-Pt são uma alternativa para tratamentos com menor efeito colateral.

1.4.1.3. Aprisionamento da matriz (*matrix entrapment*)

No aprisionamento da matriz o ativo é incorporado dentro de uma matriz, como um sistema polimérico (normalmente reticulado), hidrogéis, lipossomas, microesferas ou nanopartículas. Essa matriz forma uma espécie de "rede" tridimensional, onde o ativo irá se acomodar/incorporar.

Um exemplo desse sistema é o uso de pró-fármacos na forma de nanogéis: poliglicerol hiper-ramificado e reticulado com ligações dissulfeto, biodegradáveis e biocompatíveis, que podem ser degradados sob condições intracelulares redutivas^[19].

1.4.1.4. Encapsulação

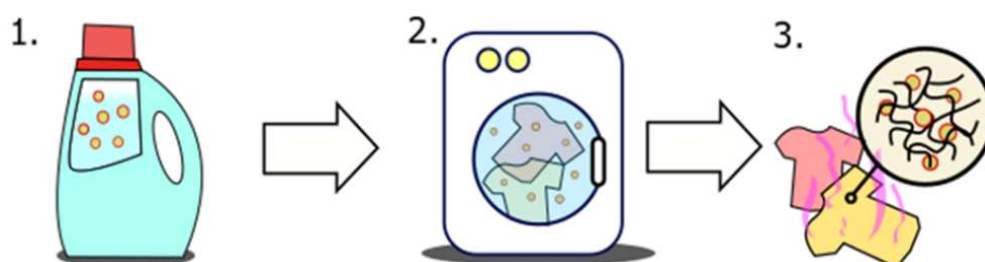
Nesse método, o ativo é totalmente envolvido por uma cápsula/membrana/casca/parede protetora, que impede sua liberação imediata. Essa cápsula pode ser feita a partir de diferentes materiais, mas normalmente é formada por polímeros. Além disso, pode ser em escala microscópica (microcápsulas) ou nanoscópica (nanocápsulas). Essa técnica pode ser utilizada em diversos setores, como alimentício, de fármacos e fragrâncias.

Na indústria alimentícia, os aromas têm seu sabor preservado em microcápsulas (normalmente feitas de amido), sendo liberados por força mecânica induzida ao ranger os dentes e hidrólise (pela saliva) durante a mastigação.

Na indústria de fragrâncias, é muito comum o uso dessa técnica para microencapsular composições de fragrâncias em formulações de amaciantes, que permitem a deposição dessas cápsulas nas fibras de tecidos das roupas. Essas microcápsulas podem ser formadas a partir de diferentes polímeros, como poliacrilatos, poliureia, quitosana, alginato e melamina.

Quando o tecido está seco e é aplicada força mecânica (atrito com o tecido), as cápsulas se rompem e a fragrância é liberada, permitindo o efeito *long lasting*. Se a roupa ficar guardada em uma gaveta comum, por exemplo, é possível que a fragrância fique protegida por meses dentro dessas microcápsulas. A Figura 5 ilustra esse cenário.

Figura 5. Deposição de microcápsulas (membrana de cor vermelha) com fragrância (cor amarela) durante lavagem de roupas: (1) produto de lavanderia com microcápsulas, (2) lavagem com produto, (3) microcápsulas depositadas nas fibras de tecido, susceptíveis a liberar fragrância; adaptado de [20]



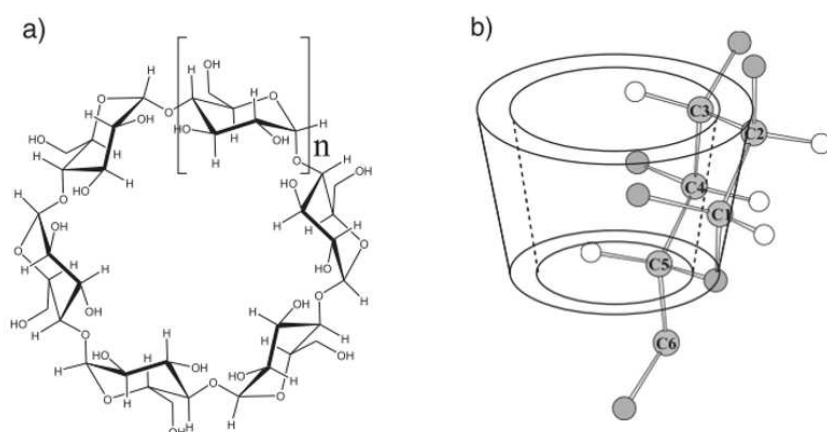
1.4.1.5. Adsorção

A adsorção é o resultado de interações intermoleculares (forças de van der Waals) entre o ativo e o carreador. O carreador pode ser composto de diferentes materiais, como resinas de poliacrilato, ciclodextrinas, sílicas e quitosana modificada.

Uma enzima lipase pode ser imobilizada em uma resina de poliacrilato macroporoso, como a Novozym® 435 (Lipase B de *Candida antarctica* CAL-B imobilizada em Lewatit® VP OC 1600). Esse processo facilita a separação da enzima após reação (bio)catalisada, reduz custos de processamento, permite possibilidade de reutilização, aumenta estabilidade frente a solventes orgânicos e altas temperaturas^[21].

A ciclodextrina pode ser utilizada como carreador para moléculas de fragrâncias, aumentando sua solubilidade em água e reduzindo sua taxa de evaporação, obtendo uma liberação mais controlada. As ciclodextrinas fazem parte de uma classe de oligossacarídeos cíclicos que contém uma cavidade central relativamente hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, permitindo interações entre fragrâncias e sua porção hidrofóbica. Este fenômeno é reversível e leva a um equilíbrio entre o ativo livre e imobilizado. A desvantagem do uso de ciclodextrinas para a indústria de fragrâncias é que normalmente esse equilíbrio não é facilmente controlado, de forma que muitas fragrâncias podem ser liberadas ainda dentro de um produto, ou seja, tendo sua estabilidade comprometida. Além disso, é comum que outras moléculas hidrofóbicas da composição do produto compitam entre moléculas de fragrâncias para interagir com a porção hidrofóbica da ciclodextrina, favorecendo ainda mais o equilíbrio para formação de fragrância livre^[22]. A Figura 6 mostra as três principais estruturas de ciclodextrinas (α , β e γ)^[23].

Figura 6. (a) Estrutura geral da ciclodextrina (os derivados α , β e γ são definidos por $n = 1, 2$ e 3 , respectivamente) e (b) representação esquemática da estrutura tridimensional, definidas pelo arranjo das unidades de glicose; adaptado de [23]



Alguns autores consideram o uso de ciclodextrinas como encapsulação, no entanto, diferentemente das cápsulas, a ciclodextrina não é um sistema que envolve totalmente o ativo, como descrito em 1.4.1.4 (encapsulação).

1.4.1.6. Nanomagneto

Nanomagnetos são uma classe de nanopartículas que são sensíveis a campos magnéticos. Comumente possuem dois componentes: um material magnético, geralmente feito a partir de ferro, níquel e cobalto, e um componente químico que possui funcionalidade^[24], que se liga ao ativo.

Um exemplo hipotético de nanomagneto pode ser formado de um núcleo feito de Fe_3O_4 , que tem propriedades superparamagnéticas (apresenta magnetização na presença de um campo magnético externo) e uma casca de SiO_2 ou de biopolímeros, como carboximetilcelulose e quitosana. A representação para esse sistema (núcleo mais casca) é escrito como $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Depois, ainda é possível adicionar ligantes, por exemplo contendo grupos de amina primária nos terminais externos (L-NH_2), que então, se liga a uma enzima. Assim, uma enzima é imobilizada por $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@-\text{NH}_2@enzima$. Ou seja, um nanomagneto pode ser representado como *material magnético@revestimento/casca@ligantes@ativo*.

Na área de pró-fármacos, os nanomagnéticos podem fazer o direcionamento magnético de fármacos (do inglês *magnetic drug targeting* - MDT), sendo estudo para desenvolvimento de diferentes tipos de tratamento para câncer e doenças arteriais, como a aterosclerose^[25]. A nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro é muito utilizada para desenho de pró-fármacos^[26].

1.4.2. Prodrugs

Um pró-fármaco, do inglês *prodrug*, é definido como um derivado químico que é farmacologicamente inativo até que seja convertido *in vivo* na porção ativa do fármaco^[27]. Por essa definição, uma *prodrug* não necessariamente utiliza um sistema de ligação covalente para entregar um ativo, conforme já visto em exemplos do tópico 1.4.1.

Os pró-fármacos são compostos que, após administrados, são metabolizados (convertidos pelo corpo) em um ativo farmacológico. Esse tipo de ação substitui a introdução

direta do ativo farmacológico, de forma que, ao ser liberado de forma controlada, há melhor absorção do ativo, possibilitando maior eficiência de tratamentos com menores dosagens de ativo aplicado^[28, 29]. Um exemplo de pró-fármaco é o ácido acetilsalicílico, a Aspirina (analgésico, antipirético e anti-inflamatório), desenvolvida por Felix Hoffman, pela empresa Bayer, em 1897: ela sofre uma reação de hidrólise, facilitada por enzimas esterases da região intestinal, liberando o ácido salicílico como produto ativo^[30]. Outros exemplos: Enalapril (tratamento de hipertensão) e Valacyclovir (antiviral para tratamento de herpes)^[27].

Para que os ativos farmacológicos exerçam sua ação, é comum que eles enfrentem diversos desafios antes de alcançarem o local específico onde devem atuar. Alguns exemplos desses desafios são: barreira intestinal, a barreira hematoencefálica e reações metabólicas que podem inativá-los^[27].

A maior parte dos fármacos se dispersa de forma aleatória pelo organismo, de forma que apenas uma pequena quantidade chega ao local de ação. Para que uma quantidade efetiva atinja o local desejado, sem causar efeitos colaterais sistêmicos graves, o medicamento deve possuir certas características físicas e químicas que facilitem sua passagem por várias membranas biológicas, evitando assim a inativação metabólica por enzimas e a retenção nos tecidos corporais que podem resultar em efeitos indesejados a longo prazo. Essas características físicas e químicas desejáveis nem sempre estão presentes em compostos farmacologicamente ativos. Uma estratégia que permite uma maior quantidade de ação do fármaco é aumentar a dosagem do medicamento, no entanto, isso pode aumentar os efeitos colaterais e o custo final da formulação do remédio^[27].

Uma *prodrug*, por outro lado, é uma forma de manter o ativo inativado (parcialmente ou totalmente), liberando o fármaco ativo dentro do organismo. Como existem diversos sistemas biológicos dentro de um corpo, é importante ressaltar que não existe um modelo único de *prodrug* que pode contemplar qualquer sistema biológico, sendo essencial estudar o local de liberação e quais barreiras biológicas a *prodrug* deve resistir. Portanto, existem vários mecanismos de ativação/liberação de *prodrug*. Dois exemplos comuns são: liberação metabólica mediada por enzimas presentes no sistema biológico e a hidrólise^[27].

As vantagens das *prodrugs* podem proporcionar: aumento da biodisponibilidade, alívio da dor no local da injeção, redução de sabor desagradável do remédio, diminuição da

toxicidade ou efeitos colaterais, diminuição da inativação metabólica, aumento da estabilidade química e ação prolongada do ativo^[27]. Seu benefício não se restringe apenas quando ingerida, já que pode facilitar processos, como formulação, manipulação e vida útil (estabilidade) do ativo farmacológico.

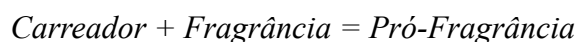
Considerando essa explicação, a seguir seguem algumas questões que devem ser consideradas ao desenvolver uma *prodrug*:

- Solubilidade adequada, como maior solubilidade em lipídios (importante por conta da bicamada lipídica celular) ou água;
- Estabilidade química, para que o fármaco possa ser formulado e tenha uma validade adequada;
- Biodisponibilidade adequada, a depender do sistema biológico alvo;
- *Design* molecular adequado, para ser liberado majoritariamente no local de tratamento.

Um fato interessante é que existem *prodrugs* naturalmente, como é o caso da pro-insulina^[27], sintetizada nas células beta do pâncreas.

1.4.3. Pró-fragrâncias

O termo pró-fragrâncias muito provavelmente veio das *prodrugs*, que possuem uma aplicabilidade mais antiga que as pró-fragrâncias. O conceito geral da tecnologia de pró-fragrância é centrado na ideia de realizar a imobilização temporária de uma molécula de valor olfativo através de um carreador, formando um precursor de fragrância, ou seja:



Pela literatura, o sistema de *delivery* de uma pró-fragrância é pela ligação covalente. Não é usual encontrar o termo *pró-fragrância* utilizando outros sistemas de *delivery*, diferentemente das *prodrugs* que utilizam outros sistemas de *delivery*. Considere *fragrância* uma molécula de valor olfativo.

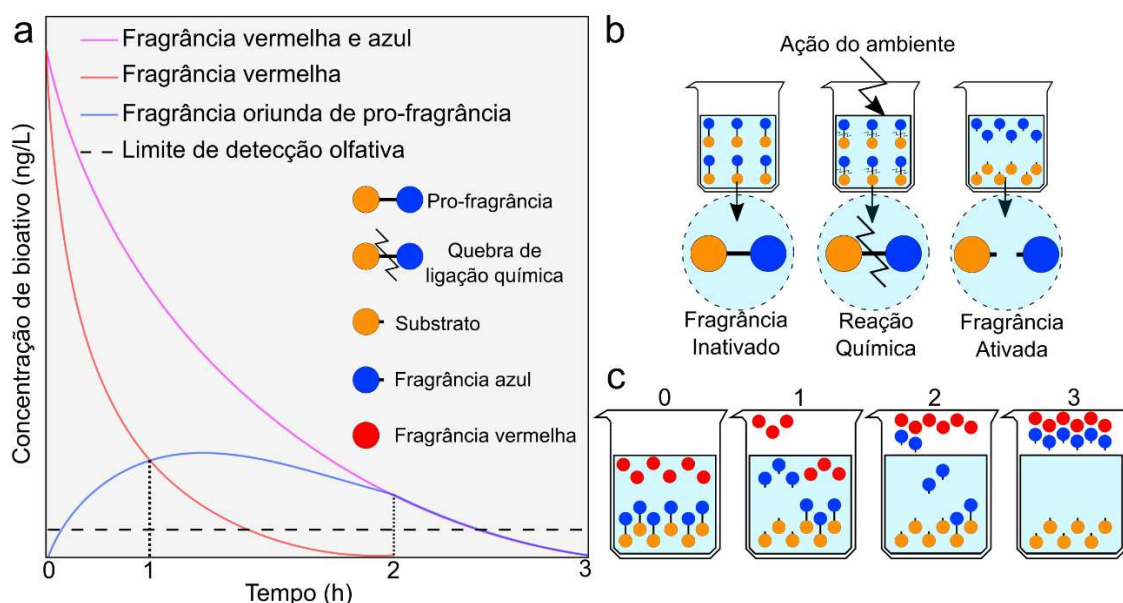
Após a reação de condensação entre o carreador e a molécula olfativa, o produto de maior massa molecular proporciona uma significativa redução na volatilidade, pois tem maiores interações intermoleculares (forças de Van der Waals) dipolo-dipolo ou diplo-induzido, devido à maior área superficial. A redução da volatilidade pode ser verificada

pela redução da pressão de vapor (que está diretamente relacionado com a volatilidade) entre a molécula de fragrância-alvo e a pró-fragrância.

Para que essa tecnologia tenha efeito, é necessário que ocorra a reação inversa após a exposição da pró-fragrância ao ambiente em que o usuário irá encontrar a fragrância. Ou seja, a ligação covalente entre o carreador e a molécula olfativa deve quebrar, acionando e liberando a fragrância, podendo ocorrer pelo aumento de temperatura, ação enzimática, mudança de pH ou presença de água/oxigênio (hidrólise/oxidação)^[2-6].

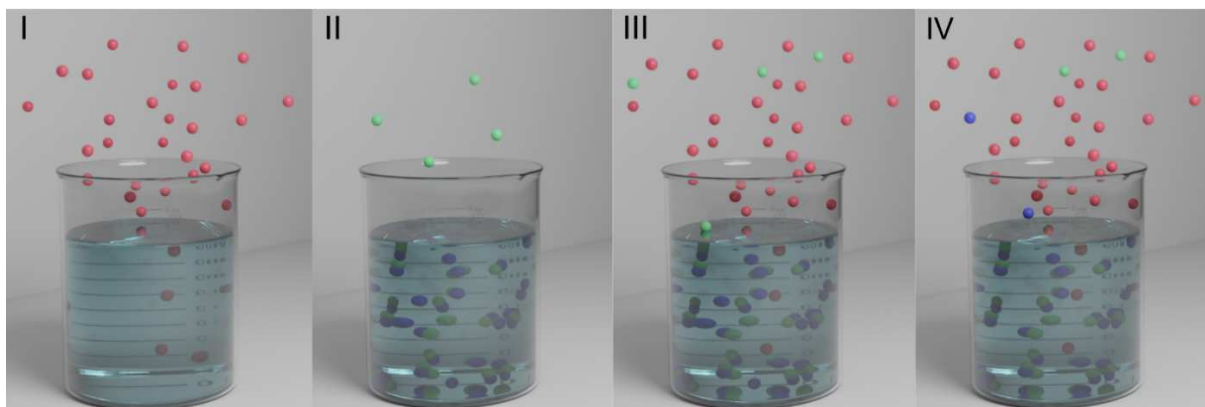
Para entender melhor qual é o efeito da pró-fragrância, é possível relacionar a concentração (mg mL^{-1}) de uma molécula olfativa em uma solução exposta à superfície de um sistema aberto em função do tempo (h), conforme representado pela Figura 7.

Figura 7. Conceito de pró-fragrância: a) Concentração de fragrância em função do tempo; b) conceito de liberação controlada de fragrância via precursor; c) representação simplificada das fragrâncias em função do tempo (0-3)



Uma outra maneira de compreender esses sistemas seria a possibilidade de verificar, em um único instante de tempo, a posição das moléculas olfativas, como uma “foto”, observado pela Figura 8. Para essa situação, podemos considerar um sistema aquoso, contendo fragrância, aberto e submetido à pressão atmosférica.

Figura 8. Representações simplificadas: I) liberação de fragrância vermelha; II) liberação controlada de fragrância verde, via precursor verde-azul; III) sistema I + II; IV) sistema III, onde a esfera azul também possui valor olfativo



O conceito de pró-fragrância pode ser observado na própria natureza, em que plantas podem modificar as fragrâncias para que tenham maior controle de sua liberação, que atuam como mensageiras entre plantas de espécies diferentes ou da mesma espécie^[31]. As moléculas olfativas devem ser voláteis, normalmente de baixa massa molecular, para que haja uma maior eficiência na sua evaporação e, portanto, em sua transmissão^[32], no entanto, isso causa uma dificuldade em manter essa fragrância por um tempo adequado no organismo. Além disso, essas moléculas comumente são hidrofóbicas, o que causa uma segunda dificuldade, dessa vez de transporte no organismo^[33]. Dessa forma, manter fragrâncias no organismo em sua forma livre, ou seja, sem carreador, é duplamente dificultoso.

Para liberar essas biomoléculas, como fragrâncias, feromônios e outros compostos sinalizadores, espécies de plantas mantêm sua fragrância modificada a partir de uma ligação covalente entre a molécula sinalizadora e um precursor/carreador (geralmente na forma de ácidos graxos, carotenoides, aminoácidos ou glicosídeos); formando uma molécula não-volátil. Depois, essa pró-fragrância é quebrada por uma reação enzimática, que permite um maior controle da liberação/evaporação do composto sinalizador^[31-33].

Existem inúmeros exemplos de pró-fragrâncias, algumas delas já abertamente comercializadas, sendo encontradas principalmente por duas empresas que são Casas de Fragrâncias: Givaudan e Firmenich (recentemente englobada pela DSM). Na Givaudan, a linha de pró-fragrâncias é chamada de Scentaurus® e na Firmenich de HaloScent®. A linha da Givaudan trabalha principalmente com pró-fragrâncias que são acordes, ou seja, é feita a

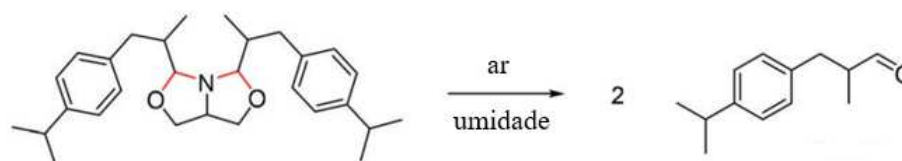
condensação de duas moléculas de valor olfativo com grupos funcionais reativos entre si, de forma que seja liberado duas fragrâncias simultaneamente. Atualmente, a Firmenich também trabalha com essa abordagem. No próprio *website* das empresas é possível encontrar essas informações.

A Hexarose® é uma pró-fragrância éster, formada a partir do geraniol (fragrância com hidroxila) e ácido palmítico. Essa molécula pode ser utilizada em formulações de detergente lava-roupas, que, durante a lavagem de roupas, é depositada nas fibras de tecido juntamente com enzimas lipases contidas em amaciantes. Após o contato das enzimas do amaciante com a pró-fragrância do lava-roupas, ela sofre uma hidrólise enzimática, liberando o geraniol^[7, 34].

Pró-fragrâncias do tipo acetal podem ser ativadas por hidrólise: fragrâncias com hidroxila (como geraniol e álcool fenetílico) podem condensar com um sal derivado de sal piridoxal (derivado da vitamina B6) e formar pró-fragrâncias^[35, 36].

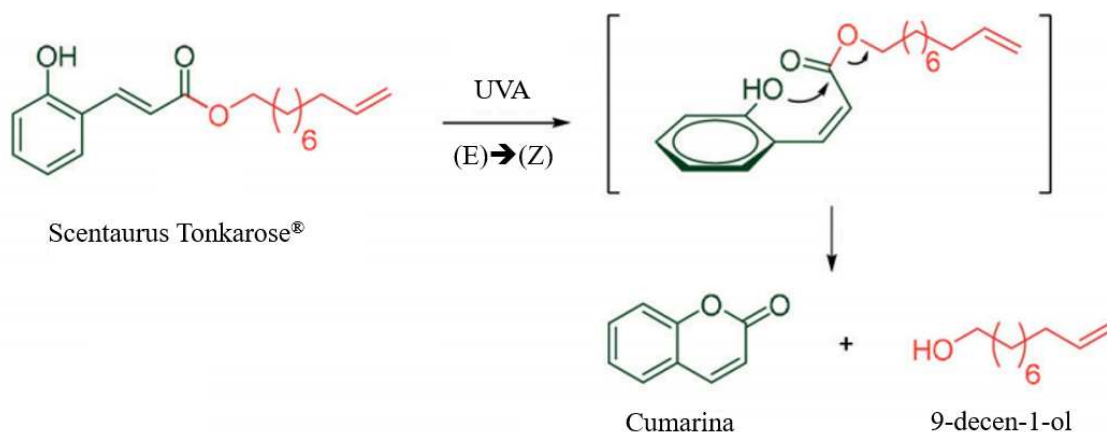
A ciclamoxazolidina é uma pró-fragrância do tipo oxazolidina bicíclica, utilizada para liberação de duas unidades de aldeído ciclamen, que possui nota floral-muguet. A Figura 9 mostra a pró-fragrância sendo liberada pelo contato com ar ou umidade (sofre hidrólise ou oxidação), para liberar duas moléculas de aldeído ciclamen^[37, 38].

Figura 9. Ciclamoxazolidina como pró-fragrância; adaptado de [37]



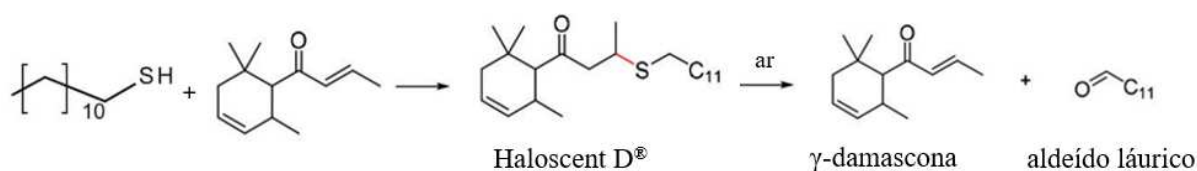
A Scentaurus Tonkarose® é uma pró-fragrância ativada pela presença de luz, que induz a isomerização trans (E) para cis (Z), seguida de lactonização espontânea, liberando a cumarina (doce, nuances de coco e feno recém-cortado) e 9-decen-1-ol (fresco, verde, graxoso, ceroso-floral-rosa). A lactonização é a formação de um éster cíclico, nesse caso ocorrendo através de uma esterificação intramolecular, espontânea por formar um anel estável (processo espontâneo quando a estrutura formada é de 5 ou 6 membros). A Figura 10 representa essa pró-fragrância^[37, 39, 40].

Figura 10. Scentaurus Tonkarose® como pró-fragrância precursora da cumarina e 9-decen-1-ol; adaptado de [37]



O Haloscent D® é um produto de adição conjugada entre o tiól dodecano e a fragrância γ -damascona, que possui uma carbonila α,β -insaturada. Após exposição ao ar (presença de umidade/água ou oxigênio) essa pró-fragrância pode ser ativada através de um mecanismo de retro-adição 1,4. As fragrâncias liberadas são γ -damascona (frutado, floral-rosa) e aldeído láurico (aldeídico, cítrico). A Figura 11 representa esse processo^[37, 41, 42].

Figura 11. Formação de Haloscent D® como pró-fragrância e sua quebra na presença de ar, formando γ -damascona e aldeído láurico; adaptado de [37]



Algumas patentes não se limitam no ramo de fragrâncias: como pró-fragrâncias é uma temática do conceito de pró-moléculas, a tecnologia pode se aplicar a diversos outros setores que buscarem interesse naquela estrutura molecular mínima patenteada (ex. fármacos, agroquímicos, preservastes, tintas, pesticidas entre outros).

Analisando as tecnologias já existentes descritas em patentes e artigos, esse projeto busca investigar uma forma alternativa de pró-fragrância, utilizando polissacarídeos ou seus derivados, como carreador. Dessa forma, além da investigação (teórica e experimental), o projeto possui teor inovador, buscando soluções alternativas para o desenho de pró-moléculas, mais especificamente, pró-fragrâncias. É importante ressaltar que embora o

projeto foque em pró-fragrâncias, todo o estudo não deve se limitar a apenas fragrâncias como ativos, uma vez que servirá de inspiração para outras áreas de aplicação.

1.4.4. Polissacarídeos e seus derivados como carreadores

Uma grande quantidade de resíduos da agroindústria é inutilizada como, por exemplo, no Brasil, onde existe uma expressiva atividade agrícola que contribui para uma grande quantidade de biomassa subutilizada. Por exemplo, a colheita de milho no Brasil ocupa uma área de 18-20 milhões de hectares (ha), com uma produção de 5-6 t.ha⁻¹, potenciais desperdícios da casca do milho. Outros exemplos de alta quantidade de biomassa residual são: bagaço da laranja, palha de cana e resíduos do café.

Em 2018, foi estimado que o Brasil produz uma média de 80 milhões de toneladas de resíduos de biomassa por ano, representando 8% de milho, 20% de açúcar e 32% de café produzido e fornecido globalmente. A maior parte dos resíduos do milho e cana são utilizados para produzir biogás e bioetanol, enquanto que do café são queimadas ou utilizadas como fertilizantes. Além disso, o Brasil representa a maior produção de laranja no mundo, gerando em torno de 8,5 milhões de toneladas de resíduos por ano, em que algumas indústrias utilizam para produção de paletas de polpa^[43].

Os resíduos de biomassa são potenciais fontes para produção de *commodities*, como combustíveis renováveis e materiais de origem natural (*bio-based*) – celulose, hemicelulose, pectina, lignina, entre outros. Esses materiais agregam valor aos resíduos e proporcionam valorização econômica aos cultivos no Brasil, por exemplo, na indústria de química fina. Um exemplo de valorização dessa biomassa é a obtenção de nanofibras de celulose (do inglês *cellulose nanofibers* – CNF) a partir de um tratamento em meio alcalino (NaOH em solução aquosa – rompe ligações de hidrogênio entre as fibras), seguido de tratamento com NaCl e extração com ácido oxálico, resultando em CNF de diâmetro entre 50 e 70 nm, com rendimentos de 38,5% para casca de milho e 24% para palha de cana. A indústria de fármacos já possui aplicações em que utilizam CNF e CNC (do inglês *cellulose nanocrystals*)^[13, 14].

O polissacarídeo quitosana é caracterizado por uma distribuição randomizada de monômeros de D-glucosaminas e N-acetil-D-glucosaminas, ligados de forma β -(1→4), sendo um dos materiais biodegradáveis mais abundantes no mundo, podendo ser obtidos pelo

exoesqueleto de organismos marinhos (ex. conchas de crustáceos e lulas), por fungos ou insetos. Suas aplicações são vastas devido, principalmente, à sua alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, sendo encontrada nos setores alimentício, cosmético, biomédico, farmacêutico e agrícola^[44].

Além da possibilidade de trabalhar com a funcionalização da quitosana^[45-47] e celulose, também é possível investigar monômeros desses polissacarídeos, como as glucosaminas no caso da quitosana, a glicose para o caso da celulose e o ácido glicurônico^[48, 49] para o caso da pectina.

Com a utilização desses compostos como carreadores de fragrâncias, é possível obter uma pró-fragrância (Tabela 1) em que existem possíveis caminhos para trabalhar no *design* dessa molécula.

Tabela 1. Opções de polissacarídeos e seus derivados como carreadores de fragrâncias

Polissacarídeo/ derivado	Carreador	Fragrância	Reação Química	Pró- fragrância
Celulose/ glicose	Hidroxila C6, C3 C2	Carbonila (aldeído/cetona)	Acetalização	Acetal/Cetal
Celulose/ glicose	Hidroxila C6	Hidroxila (álcool)	Glicosidação	Glicosídeo
Celulose oxidada	Carboxila C6	Hidroxila (álcool)	Esterificação	Éster
Quitosana/ glucosamina	Amina C2	Carbonila (aldeído)	Aminação redutiva	Amina secundária
Quitosana/ glucosamina	Amina C2	Carbonila (aldeído)	Iminação	Imina
Pectina/ ácido glicurônico	Carboxila C6	Hidroxila (álcool)	Esterificação	Éster

A pró-fragrância desejável para o projeto buscará:

- Ser um novo produto (nova molécula)
- Ser compatível/estável em matriz contendo etanol ou água;
- Ser solúvel em solventes comuns na indústria de fragrâncias (dipropilenoglicol e propilenoglicol);

- Síntese com poucas etapas;
- Síntese que permita fluxo de trabalho simples para escala industrial;
- Molécula não-patenteada;
- Boa solubilidade do carreador em dipropilenoglicol ou propilenoglicol, água e etanol;
- Reutilização de resíduos (do inglês *upcycling*) como carreadores e biocatálise são desejáveis.

Uma boa solubilidade do carreador nos solventes mencionados acima é altamente desejada, partindo da hipótese de que a pró-fragrância terá uma ligação relativamente lábil (ligação relativamente fraca e reversível), o que significa que se o produto final conter um pouco do carreador livre, ele estará solúvel na matriz e, portanto, não serão formados precipitados ou porções insolúveis. Além disso, caso o grau de pureza da pró-fragrância não seja tão alto (para viabilidade de custo), é importante que o carreador residual possa ser solúvel.

O projeto levou em conta o *design* de uma pró-fragrância obtida a partir de polissacarídeos ou seus derivados, mais especificamente com:

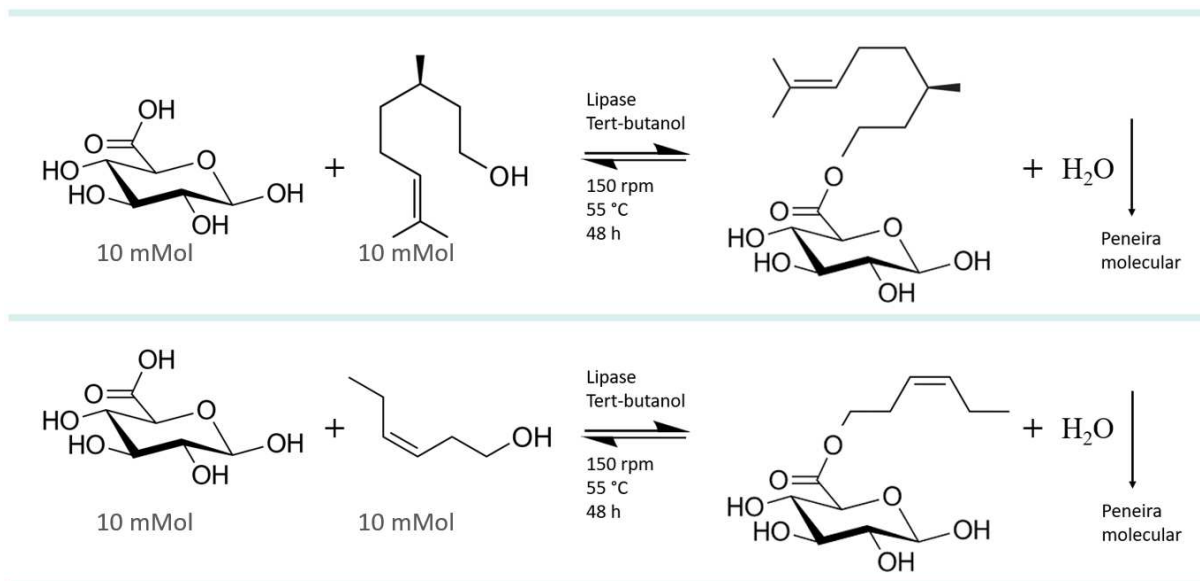
- Nanofibras de celulose (CNF, do inglês *cellulose nanofibers*);
- Nanocristais de celulose (CNC, do inglês *cellulose nanocrystals*);
- Quitosana ou glucosaminas;
- Pectina ou ácido glicurônico.

O ácido glicurônico foi escolhido como modelo de carreador para esse projeto, por ter uma melhor solubilidade nos principais solventes utilizados na indústria de fragrâncias e ter caráter inovador como carreador de fragrâncias.

1.4.5. Esterificação catalisada pela lipase EC 3.1.1.3

O citrônolol (CIT) e o cis-3-hexen-1-ol (HEX) são moléculas de grande valor olfativo para a indústria de fragrâncias, que possuem um grupo hidroxila, sendo álcoois primários, reativos ao carreador ácido glicurônico (GA). Uma reação de esterificação foi mediada biocataliticamente utilizando uma enzima lipase imobilizada e, além disso, facilitada por peneira molecular, deslocando o equilíbrio reacional na direção de formação do produto, na medida em que retém a água formada pela esterificação^[50, 51], conforme sugere a Figura 12.

Figura 12. Esterificação entre GA e CIT (esquema superior) e entre GA e HEX (esquema inferior), catalisada por enzima lipase, formando pro-citronelol (PRO-CIT)



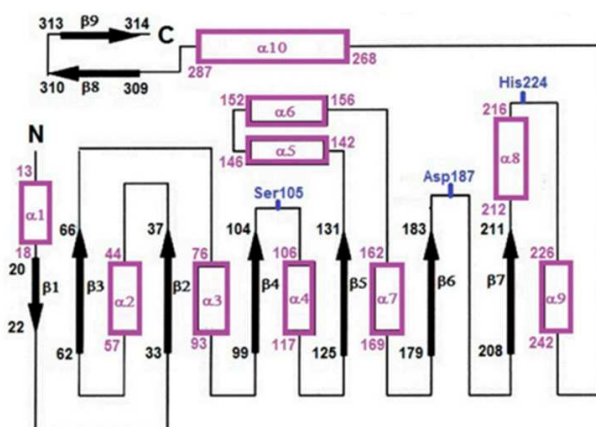
A lipase (E.C.3.1.1.3, BRENDA), é uma hidrolase (3), atua em ligação éster (3.1), hidrolase de éster-carboxílico (3.1.1) e lipase triacilglicerol (3.1.1.3). É uma enzima encontrada em diversos organismos, animais, plantas, fungos e bactérias. É uma lipase não-específica amplamente utilizada na área de pesquisa. Ela naturalmente atua na hidrólise de triglicerídeos, é estereoespecífica tanto na hidrólise quanto na síntese orgânica e tem uma aplicação potencialmente importante na síntese de glicolípídeos. É uma lipase que contém 9 folhas- β , 7 delas no núcleo; 10 α -hélices, em que três delas (α -5, α -6 e α -10) formam o sítio ativo. A conformação geral da estrutura é estabilizada por três ligações dissulfeto entre cisteínas Cys22-Cys64, Cys216-Cys-258 e Cys293-Cys31^[52].

A faixa otimizada de operação da lipase é de pH 5-9 e temperatura de 40-60 °C. O coeficiente de extinção (280 nm em água) é de 1,239 L g⁻¹ cm⁻¹ quando os resíduos Cys estão reduzidos^[53]. Se a reação catalisada for a hidrólise de um éster, é indicada a adição de água à mistura reacional, caso contrário a água provavelmente não é necessária, podendo ser prejudicial, como o caso da esterificação feita no projeto^[54].

A Figura 13 ilustra as estruturas primária, i.e. a sequência FASTA (direção N terminal a C terminal)^[53], secundária^[57] e terciária^[56].

Figura 13. Estruturas primária (a), secundária (b), e terciária (c) da lipase**a)**

LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPSVSKPILLVPGTGTGPQSFDNSW
 IPLSTQLGYTPCWISPPFMLNDTQVNT EYMVNAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGLV
 AQWGLTFFPSIRSKVDRLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQQTTSALTAL
 RNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVIDHA
 GSLTSQFSYVVGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAAALLAPAAA
 AIVAGPKQNCPEPDLMPYARPFVAVGKRTCSGIVTP

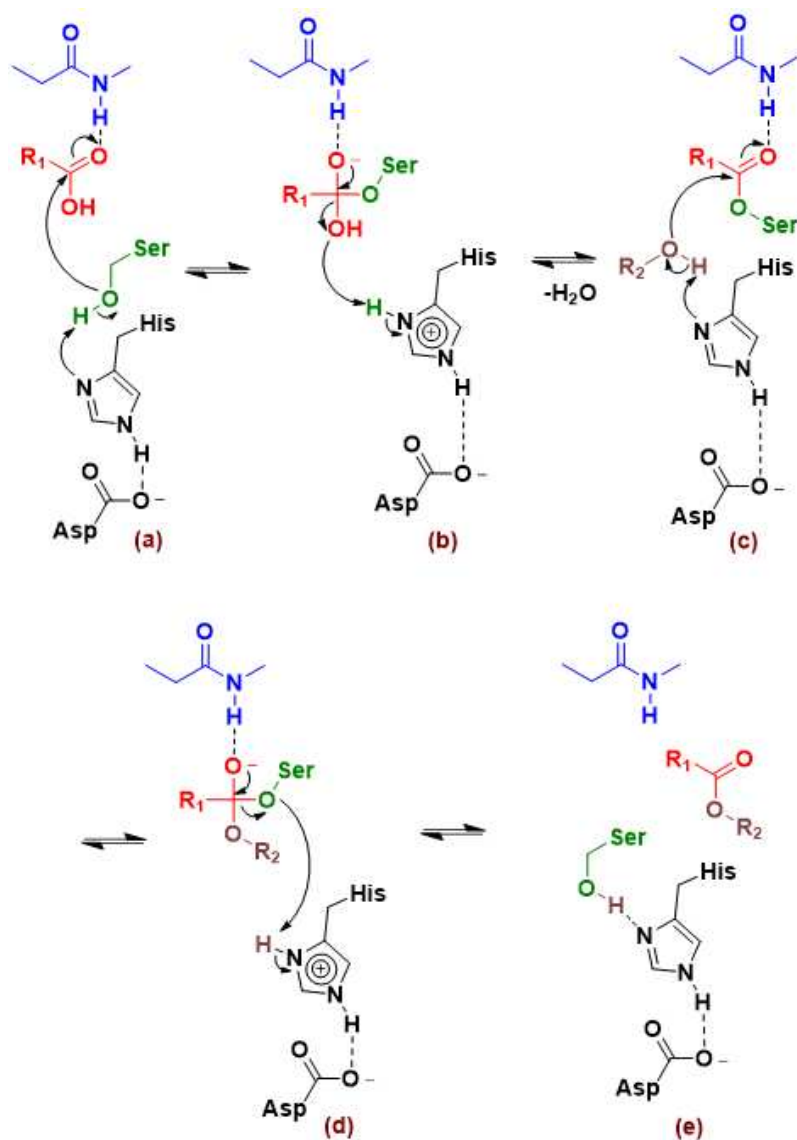
b)**c)**

A lipase atua na interface entre a fase aquosa (mais polar) e orgânica (menos polar) em um sistema bifásico, em que naturalmente atua na hidrólise de ésteres. O acesso ao sítio ativo é controlado pela abertura de uma proteção do sítio ativo formada pela α -hélice 5 (α -5, Figura 13 b) que, quando fechada, esconde a região de superfície hidrofóbica que envolve o sítio ativo. Essa proteção de cadeia polipeptídica se abre quando a enzima entra em contato com uma interface óleo-água (ativação interfacial), através da movimentação da α -5 em direção à α -10. Para que essa lipase atue na esterificação ao invés da hidrólise, o terc-butanol foi selecionado como solvente (um álcool terciário em que há baixa probabilidade de ocorrer esterificação), além de não adicionar água. Além disso, a formação de água formada pela esterificação foi removida com peneiras moleculares, uma vez que a água formada dificultaria a formação do produto-éster devido ao Princípio de Le Chatelier. Assim, é possível atribuir que o mecanismo de ação dessa esterificação ocorre de forma mais lenta, pela dificuldade dos reagentes entrarem em contato com o sítio ativo, pela presença da região fechada de cadeia polipeptídica, havendo menor propensão à ativação interfacial^[57, 58].

O sítio ativo onde ocorre a esterificação ou hidrólise inclui resíduos catalíticos de uma tríade catalítica de serina (Ser105), histidina (His224) e ácido aspártico (Asp187). A reação é favorecida devido à participação de resíduos do buraco oxiânion, uma região que circunda a tríade catalítica: os resíduos de aminoácidos de glutamina (Gln106) e treonina (Thr40), em que o grupo N-H atua na estabilização de intermediários tetraédricos e do próprio ácido glicurônico ao adentrar no sítio catalítico. O nitrogênio tem alta capacidade de atrair a nuvem eletrônica para si, causando uma deficiência eletrônica no hidrogênio N-H; dessa forma, os resíduos do buraco oxiânion N-H estabilizam a permanência do ácido glicurônico através de interações do tipo ligação de hidrogênio de N-H com o oxigênio carbonílico; além de estabilizar os intermediários tetraédricos formados, em que N-H interage com o oxigênio carregado negativamente. O mecanismo de reação é ilustrado na Figura 14^[59, 60].

O termo "buraco oxiânion" é usado para se referir a uma estrutura interna que fornece um espaço 3D que estabiliza e acomoda um átomo de oxigênio carregado negativamente no estado de transição. O oxiânion é uma espécie intermediária carregada negativamente formada durante reações catalisadas por enzimas. O prefixo "oxi" refere-se ao átomo de oxigênio do ânion. O "buraco" indica que existe um espaço disponível dentro do sítio ativo da enzima que acomoda e estabiliza esse intermediário.

Figura 14. Esterificação catalisada por lipases. Triáde catalítica representada em preto; resíduo do buraco oxiânion em azul; porção do ácido em vermelho; porção do álcool em marrom. (a) Ataque nucleofílico da hidroxila-serina ao carbono carboxílico do ácido; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da hidroxila-álcool; (d) intermediário tetraédrico; (e) formação do éster e regeneração da enzima livre; adaptado de [60]



2. OBJETIVOS

O projeto contém três principais objetivos: (1) síntese, (2) caracterização e (3) estudo de estabilidade e liberação de pró-fragrâncias.

1. Síntese

Esterificação entre o carreador ácido glicurônico (GA) e as fragrâncias citronelol (CIT) e cis-3-hexen-1-ol (HEX), via biocatálise.

2. Caracterização

Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês *Fourier-Transform infrared spectroscopy* - FT-IR); espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry* - MS); e ressonância magnética nuclear (do inglês *nuclear magnetic resonance* - NMR) de ¹H, coerência quântica única heteronuclear (do inglês *heteronuclear single quantum coherence* - HSQC) e de correlação de ligações múltiplas heteronucleares (do inglês *heteronuclear multiple bond correlation* - HMBC).

3. Estudo de estabilidade e liberação de pró-fragrâncias

Estudo de estabilidade e liberação térmica por análise termogravimétrica (do inglês *thermogravimetric analysis* - TGA); estudo de liberação por microextração em fase sólida do espaço livre acoplada com cromatografia gasosa e espectrometria de massas (do inglês *headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry* - HS-SPME-GC-MS); liberação avaliada em painel sensorial.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese das pró-fragrâncias

3.1.1. Materiais

Balão redondo 125 mL, peneira molecular (0,4 nm; 1,7 a 2,5 mm – MAIS QUÍMICA, Limeira/SP), álcool *terc*-butilico (Neon – VHTEX, Florianópolis/SC), enzima lipase ($\geq 5,000$ U/g, recombinante e expressa em *Aspergillus niger*, EC 3.1.1.3 BRENDA – lipase triacilglicerol) imobilizada em polímero acrílico macroporoso (L4777-10G – Sigma Cotia/SP), ácido glicurônico ($\geq 98\%$ -GC, G5269-25G – Sigma, Cotia/SP), citronelol (*Citronellol 950* – Takasago-Brasil, Vinhedo/SP), barra magnética, chapa de aquecimento, óleo de silicone para banho, refluxo alimentado por água corrente. A Tabela 2 resume as principais informações sobre a lipase, a Tabela 3 as principais informações sobre o suporte de imobilização.

Tabela 2. Principais informações sobre a lipase utilizada^[53, 55, 56]

Proteína	Lipase E.C.3.1.1.3 (hidrolase de triacilglicerol)
Código PDB	1LBT
Família	α/β -hidrolase
Organismo de origem	<i>Candida antarctica</i>
Massa Molecular	33,02 kDa
Número de aminoácidos	317
Ponto isoelétrico teórico	5,8
Composição	1472 carbonos, 2307 hidrogênios, 389 nitrogênios, 453 oxigênios, 10 enxofres. Total de 4631 átomos
Índice de instabilidade (II)	42,47 (> 40, instável)
GRAVY (do inglês <i>grand average of hydropathicity</i> - grande média de hidropaticidade)	0,037 (> 0, hidrofóbico)

Tabela 3. Principais informações sobre o suporte de imobilização da lipase^[58]

Nome comercial	Lewatit VP OC 1600 (empresa Lanxess)
Material	Resina de polímero acrílico macroporosa, em forma de partículas esféricas brancas e opacas
Matriz	Polimetacrilato reticulado com divinilbenzeno
Tamanho médio da partícula	315-1000 μm
Área superficial	130 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$
Diâmetro do poro	150 Å
Tipo de imobilização	Adsorção macroporosa (carreador hidrofóbico)

3.1.2. Método

10 mmol de GA e CIT foram diluídos em 50 mL de álcool *tert*-butilico dentro do balão reacional. Depois, foram adicionados 2,5 g de peneira molecular, a barra magnética e, por último, 0,5 g da enzima imobilizada. A suspensão se manteve em aquecimento a 55 °C durante 48 h, sob agitação a 150 rpm.

Em seguida, o produto foi filtrado sob pressão reduzida e foram adicionados 35 mL de água destilada ao filtrado, agitando a mistura a 150 rpm durante 2 min. Uma extração de quatro porções de 40 mL de diclorometano foi feita, seguindo com a evaporação rotativa sob pressão reduzida a 30 °C da fase orgânica. O líquido amarelo obtido foi utilizado para seguir com a purificação em sílica-gel: 3,5 wt% (do inglês *weight%*, massa%) de água destilada foram adicionadas em 40,5 g de sílica-gel (*mesh* 70-230); coluna empacotada com clorofórmio (contendo 0,5 wt% etanol); dimensões finais 22,0 x 2,5 cm. A fase móvel foi feita em gradiente de três fases de 50 mL de diferentes proporções clorofórmio:metanol: (1) 90:10 (v/v); (2) 80:20 (v/v); (3) 70:30 (v/v). Foram coletadas frações de 3 mL e o produto de interesse foi identificado por cromatografia em camada delgada (do inglês, *thin layer chromatography* - TLC).

O TLC foi composto de fase estacionária sendo placa Si-60 F₂₅₄; fase móvel clorofórmio:metanol:água na proporção 65:15:2 (v/v/v); revelador de 6,5 mmol L⁻¹ de Dicloridrato de *N*-(1-naftil)etilenodiamina, 3 vol% ácido sulfúrico em metanol. O resultado foi visto em luz UV antes de aplicar a solução reveladora; depois foi borrifada a solução

reveladora e a placa foi mantida a 100 °C durante 5 min em uma chapa de aquecimento. As frações contendo apenas o produto formado foram coletadas e o solvente foi evaporado em rotator evaporativo a pressão reduzida e 30 °C até sobrar 4 mL. Nitrogênio gasoso foi utilizado a baixa vazão para evaporar mais solvente e, por fim, o restante foi mantido em um dessecador por cinco dias até que a massa do produto se tornou constante.

Ambos os produtos finais são uma resina incolor a amarelo-claro. Após a purificação e obtenção das resinas (**PRO-CIT** de **pró-fragrância** de **citronelol**; **PRO-HEX** de **pró-fragrância** de **cis-3-hexen-1-ol**), foram feitas caracterizações por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

3.2 Caracterização

3.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Os experimentos foram realizados em um FT-IR Agilent Cary 630, equipado com reflexão total atenuada (do inglês *attenuated total reflectance* - ATR) de diamante monolítico (ATR). Cada espectro foi obtido acumulando 128 varreduras em uma resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de comprimento de onda de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹.

3.2.2 Espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry* - MS) foram realizadas em um Orbitrap Thermo Q-Exactive, com sistema de ionização por elétron-spray (ESI-MS-Alta Resolução). O experimento foi feito em dois modos: *full scan* (MS) e por fragmentação (MS/MS – AIF e PRM), ambos com infusão a 20 µL min⁻¹ (direta por bomba de seringa), modo de campo positivo (detecção de íons com carga positiva), resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV, faixa m/z de 50 a 750.

O experimento em AIF serviu para determinar a energia de ionização/cone, que foi selecionada com o valor de 50 nce, para o modo de fragmentação PRM do produto-éster. Em energias menores que 50 nce houve pouca fragmentação dos íons-alvo, por isso foi escolhido 50 nce. A concentração das amostras foi de 50 ppm em metanol. Antes de iniciar os experimentos, as amostras foram filtradas em um sistema de seringa com filtro de 0,22 µm.

Para HEX e PRO-HEX as análises foram semelhantes, com a diferença de que o experimento de fragmentação MS/MS foi feito em modo HCD.

O erro de massa foi calculado de acordo com a Equação 1, em que a m_{acurada} é a massa do íon obtido experimentalmente (acurada) e m_{exata} a massa exata/teórica calculada já considerando a perda de massa de um elétron (0,00055 Da) pela formação de íon com carga positiva. Um $|\text{Erro}| < 5$ foi considerado aceitável.

$$\text{Erro de Massa (ppm)} = [10^6 (m_{\text{acurada}} - m_{\text{exata}})/m_{\text{exata}}] \quad (1)$$

3.2.3 Ressonância magnética nuclear

As análises foram feitas em um Bruker Avance III 400 MHz, com amostrador automático de 16 posições (análise de solução), sonda de banda larga de ressonância dupla (BBI), ^1H (16 scans), e HSQC (12 scans) de acordo com os parâmetros da Figura S1, e HMBC (12 scans) de acordo a Figura S3. As amostras foram diluídas em DMSO- d_6 para análise (10 mg de amostra para 500 μL de DMSO- d_6). Como também, em um Bruker Avance III 500 MHz, com amostrador automático de 60 posições (análise de solução), sonda de banda larga de ressonância dupla (BBO), ^1H (16 scans), HSQC (6 scans), de acordo com os parâmetros da Figura S2, e HMBC (8 scans) de acordo com a Figura S3. As amostras foram diluídas em DMSO- d_6 para análise (20 mg de amostra para 500 μL de DMSO- d_6).

3.3. Estudo de estabilidade e liberação controlada da fragrância

3.3.1. Análise termogravimétrica

As análises foram realizadas em um TGA-DTA 6200 (Seiko), de acordo com os seguintes parâmetros:

- Temperatura inicial: 25 $^{\circ}\text{C}$;
- Temperatura final: 545 $^{\circ}\text{C}$;
- Taxa de aumento de temperatura: 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$;
- Gás: Ar (Argônio);
- Panela/Suporte: Alumina.

3.3.2. Microextração em fase sólida do espaço livre acoplada com cromatografia gasosa com espectrometria de massas

A amostra foi preparada utilizando um meio de cultura como matriz e uma alíquota da fragrância ou pró-fragrância. A matriz foi composta de uma representação da

microbiota do antebraço humano. Para preparar a matriz, um meio de caldo triptona de soja (do inglês *tryptic soy broth* – TSB) foi preparado (1,5 g de meio em 50 mL de água destilada) em um frasco de vidro (400 mL), que depois foi autoclavado a 120 °C, 15 psi durante 15 min juntamente com um erlenmeyer (250 mL) vazio. Depois, o meio foi transferido ao béquer e foi adicionada uma amostra *swab* coletada do antebraço humano (utilizando um cotonete convencional autoclavado a 120 °C, 15 psi, 15 min) e mantido em uma estufa de 37 °C para incubação durante 16 h.

Cinco amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 4. A amostra HEX + GA foi uma amostra de mistura física simples destes compostos. A amostra PRO-HEX foi analisada uma segunda vez, 100 min depois da primeira análise, e será tratada na discussão como PRO-HEX-2.

Tabela 4. Amostras utilizadas para o estudo HS-SPME-GC-MS

Amostra	Quantidade acurada	Matriz (mL)	Concentração (mol L⁻¹)
HEX	3,85 µL	2	0,0163
PRO-HEX	9,00 mg	2	0,0163
HEX + GA	3,85 µL (HEX) + 6,34 mg (GA)	2	0,0163
CIT	4,95 µL	2	0,0135
PRO-CIT	9,00 mg	2	0,0135

Para o HS-SPME, foi empregada uma fibra de divinilbenzeno/carboxen/(poli)dimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30 µm. A amostra foi incubada por 2 min antes da extração na temperatura de 33 °C. A agitação foi ajustada para 250 rpm e a dessorção na entrada do GC foi feita a 250 °C por 2 min. A temperatura e o tempo de extração foram ajustados nos valores de 33 °C e 30 min, respectivamente.

O GC-MS foi feito em um cromatógrafo gasoso TRACE 1310 acoplado com um espectrômetro de massas Q-Exactive FT-Orbitrap (ThermoFisher Scientific).

Os parâmetros inerentes ao método cromatográfico, como dimensões das colunas cromatográficas, vazão de gás de arraste e gás auxiliar, programas de temperaturas, entre

outros, encontram-se resumidos na Tabela 5. O cálculo do erro de massa foi o mesmo utilizado na seção 4.2.2.

Tabela 5. Resumo dos parâmetros cromatográficos usados na avaliação da fragrância por HS-SPME-GC-MS

Parâmetro	Valor
Gás de arraste	He
Vazão gás de arraste	1,0 mL min ⁻¹
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Resolução	120.000
Faixa <i>m/z</i>	50 - 300 Da
Temperatura da fonte de íons	250 °C
Programa de temperatura	60 °C a 200 °C, 10 °C min ⁻¹
Dimensões coluna	SLB-1ms 20 m × 0,18 mm-id × 0,18 µm

3.3.3 Painel sensorial

Um painel sensorial foi feito com o objetivo de avaliar comparativamente a intensidade de fragrância na região superior de cada pulso, ao longo do tempo. Para isso, foram preparadas formulações de deo colônia contendo HEX e PRO-HEX.

A formulação de deo colônia foi preparada da seguinte forma para PRO-HEX:

- I. A fragrância foi diluída em dipropilenoglicol (DPG);
- II. Essa diluição foi homogeneizada em água;
- III. A mistura II foi diluída em etanol.

A formulação de deo colônia foi preparada da seguinte forma para HEX:

- I. A fragrância foi diluída em dipropilenoglicol (DPG);
- II. Essa diluição foi homogeneizada em etanol;
- III. A mistura II foi homogeneizada com água.

O etanol utilizado é °96 GL (v/v) e a água é deionizada. A Tabela 6 mostra as formulações finais de deo colônia utilizadas no painel sensorial.

Tabela 6. Formulações de deo colônia utilizadas para o painel sensorial

Amostra	Fragrância% (m/m)	DPG% (m/m)	Água% (m/m)	Etanol% (m/m)
HEX 7,25%	0,725	9,275	10	80
PRO-HEX 20%	2	8	10	80

A amostra HEX 7,25% contém uma quantidade equimolar de HEX à quantidade de PRO-HEX 20%. As amostras utilizadas no painel sensorial foram preparadas até um dia antes da avaliação.

Com uma pipeta monocal, 40 µL de cada amostra foi aplicada na parte superior do punho de painelistas: em um dos punhos foi aplicado PRO-HEX 20% e, no outro, HEX 7,25%. Cada painalista foi instruído para avaliar comparativamente a intensidade de fragrância logo após ter sido aplicada e a cada 30 minutos, durante 120 minutos, de acordo com a *escala mista vertical*^[61] descrita na Tabela 7. Além disso, os painelistas deveriam indicar qual punho continha a fragrância mais intensa para cada instante de tempo.

Os painelistas ficaram em um ambiente comum de escritório, temperatura ambiente (25 °C), podendo utilizar computadores de trabalho e andarem pelo ambiente. Os painelistas não passaram produtos perfumados no corpo antes de iniciar o painel. O painel foi composto de oito *avaliadores selecionados*^[61] (duração mínima de um ano de curso de painalista para avaliação sensorial de fragrâncias), cada um podendo repetir a avaliação até três vezes. Os painelistas não foram informados qual amostra foi aplicada em qual braço. Apenas uma avaliação por período (manhã/tarde) foi permitida por painalista. Um total de 20 respostas (n=20) foram coletadas.

Tabela 7. Escala mista vertical de intensidade de fragrância para avaliação do painel sensorial

Nota	Intensidade
0	Sem fragrância
1	Muito fraca
2	
3	Fraca
4	
5	Moderada
6	Forte
7	
8	Muito forte
9	
10	Extremamente forte

Foram coletadas: média, erro e *p*-valor obtido pelo Teste t de *Student*, de acordo com as seguintes fórmulas do Excel:

- Média: =MÉDIA(valor 1:valor n)
- Erro: =DESVPAD.P(valor 1:valor n)/RAIZ(=CONT.NÚM(valor 1:valor n)-1)
- *p*-valor: =TESTE.T(valor 1:valor n;valor 1':valor n';2;2), onde *valor 1:valor n* são os valores de HEX e *valor 1':valor n'* os valores de PRO-HEX.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo de solubilidade dos carreadores

Tendo em vista a aplicação de pró-fragrâncias em meios de diferentes polaridades, foi desejável buscar o carreador de maior solubilidade nos principais solventes utilizados na indústria de fragrâncias, tais como dipropilenoglicol e etanol.

Para isso, uma mistura simples sob agitação magnética foi feita entre alguns carreadores em diferentes solventes, com o objetivo de verificar o aspecto visual da mistura, podendo ser insolúvel, parcialmente solúvel (turvo) ou solúvel (transparente/límpido), de acordo com o fluxograma da Figura 15. Os resultados estão resumidos na Tabela 8.

Figura 15. Fluxograma de processo para determinação do aspecto visual da solubilidade entre o carreador e solvente

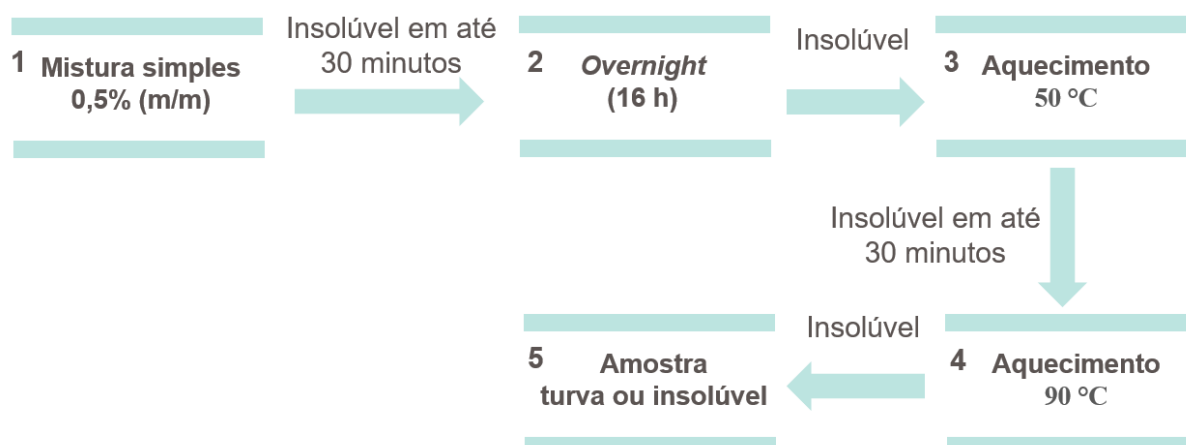


Tabela 8. Aspecto visual da solubilidade entre carreadores e solventes comumente utilizados na indústria de fragrâncias. Na última coluna, está o número das etapas referentes à Figura 15 em que a amostra se submeteu para atingir o aspecto visual. Em negrito estão evidenciados os testes mais promissores

Nº Teste	Amostra	Solvente	Dosagem (wt%)	Aspecto visual	Etapas
1	Pectina	H ₂ O	0,5	Turvo	5
2	Pectina	DPG**	0,5	Insolúvel	5
3	Pectina	PG***	0,5	Insolúvel	5
4	Ácido glicurônico monohidratado	H ₂ O	0,5	Transparente	1
5	Ácido glicurônico monohidratado	DPG	0,5	Transparente	1
6	Ácido glicurônico monohidratado	PG	0,5	Transparente	1
7	Ácido glicurônico monohidratado	EtOH	0,5	Transparente	1
8	Ácido glicurônico monohidratado	H ₂ O	1,0	Transparente	1
9	Ácido glicurônico monohidratado	PG	1,0	Transparente	1
10	Ácido glicurônico monohidratado	DPG	1,0	Transparente	2
11	Ácido glicurônico monohidratado	EtOH	1,0	Transparente	3
12	Ácido glicurônico monohidratado	CIT	0,5	Insolúvel	5
13	Ácido glicurônico monohidratado	IPM****	0,5	Insolúvel	5
14	Ácido glicurônico (≥ 98%-GC)	EtOH	0,5	Transparente	3
15	Ácido glicurônico (≥ 98%-GC)	EtOH	1,0	Transparente*	4
16	Ácido glicurônico (≥ 98%-GC)	H₂O	1,0	Transparente	1
17	Ácido glicurônico (≥ 98%-GC)	DPG	0,5	Transparente	3
18	Ácido glicurônico (≥ 98%-GC)	DPG	1,0	Transparente	4
19	Ácido glicurônico (≥ 98%-GC)	PG	0,5	Transparente	2
20	Ácido glicurônico (≥ 98%-GC)	PG	1,0	Transparente	2

*Formaram-se precipitados após 2 dias

** Dipropilenoglicol (DPG)

*** Propilenoglicol (PG)

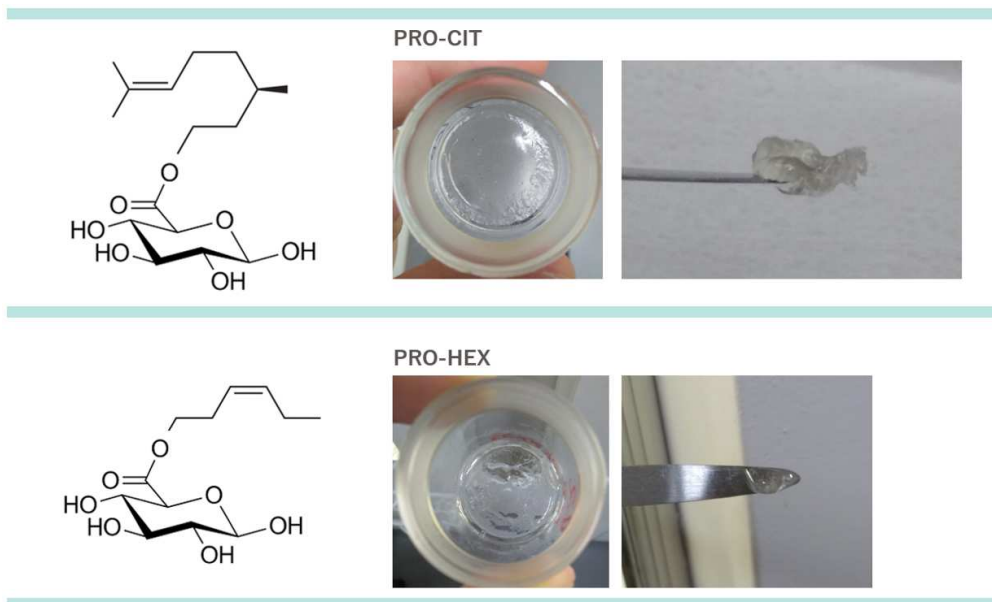
**** Miristato de isopropila (IPM)

Como pôde ser observado, o ácido glicurônico é solúvel a 1% em propilenoglicol (PG) e dipropilenoglicol (DPG), sendo que em PG não é necessário aquecer para solubilizar. Considerando que DPG e PG são solventes muito utilizados para compor fragrâncias, o ácido glicurônico apresenta o melhor resultado entre os carreadores. O ácido glicurônico na sua forma monohidratada também apresenta boa solubilidade como um carreador promissor, no entanto, sua forma monohidratada não é interessante do ponto de vista reacional, em que a presença de água dificulta a formação do produto-éster.

4.2 Síntese de pró-fragrâncias

A esterificação utilizando a lipase foi feita, conforme descrito na Metodologia, obtendo PRO-CIT e PRO-HEX, com rendimentos de 8,26% e 12,74%, respectivamente. Uma resina incolor a amarelo-claro translúcida foi obtida. Para evitar a caramelização do produto, é importante mantê-lo o mínimo de tempo no rotator evaporativo e banho-maria após a purificação, utilizando condições brandas (mínimo 100 mbar e máximo de 30 °C). O produto apresentou a forma de uma resina incolor (Figura 16).

Figura 16. Pró-fragrâncias PRO-CIT e PRO-HEX

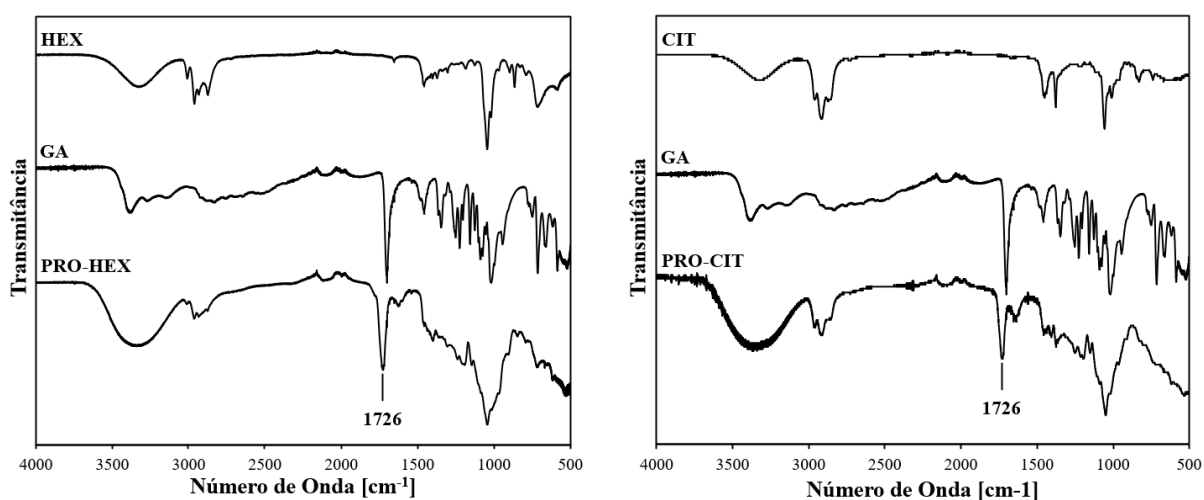


4.3. Caracterização de pró-fragrâncias

4.3.1 Dados de pró-fragrâncias por FT-IR

Os espectros FT-IR obtidos para amostras de produtos revelam uma banda característica de ligação éster (estiramento C=O de carbonila-éster) em 1726 cm^{-1} , sugerindo a presença da pró-fragrâncias PRO-CIT e PRO-HEX, conforme ilustrado na Figura 17. Já para a GA, podemos observar uma banda na região 1700 cm^{-1} , também referente a um estiramento C=O, mas nesse caso em uma região de carbonila-ácido carboxílico. É interessante observar que não há presença dessa banda nos produtos PRO-CIT e PRO-HEX, uma evidência de que não há ácido carboxílico residual detectado por essa técnica.

Figura 17. Espectros no infravermelho (FTIR) do citrônolol (CIT), cis-3-hexen-1-ol (HEX), ácido glicurônico (GA) e de pró-fragrâncias PRO-CIT e PRO-HEX



4.3.2. Dados de pró-fragrâncias por MS

Para calcular a massa teórica dos possíveis íons gerados nos experimentos em MS, os isótopos mais abundantes foram considerados^[62-64].

Os experimentos em MS revelaram m/z de íons-alvo esperados, tanto para os produtos, quanto para os reagentes, conforme sumarizado na Tabela 9. Os resultados em MS mostraram presença dos íons-alvo com módulo de erro de massa inferior a 2 ppm. Para as pró-fragrâncias, os experimentos de fragmentação também detectaram íons esperados com módulo de erro de massa inferior a 2 ppm, o que é um forte indicativo para formação dos produtos, uma vez que a fragmentação em MS também dá pistas sobre a estrutura molecular: ligações mais fracas, como o caso de ligações-éster, são mais suscetíveis a quebrar do que ligação C-C ou C-H, por exemplo.

Tabela 9. Valores experimentais e atribuição de massa para os íons formados em *full scan* MS e fragmentação MS/MS

Molécula/íon		Fórmula Molecular	m _{exata} (Da)	m _{acurada} (Da)	Erro de massa (ppm)
PRO-HEX	M	C ₁₂ H ₂₀ O ₇	276,1210	-	-
	(M+Na) ⁺	(C ₁₂ H ₂₀ O ₇ Na) ⁺	299,1102	299,1099	-0,97
	(2M+Na) ⁺	(C ₂₄ H ₄₀ O ₁₄ Na) ⁺	575,2312	575,2308	-0,63
	(M+Na-H ₂ O) ⁺	(C ₁₂ H ₁₈ O ₆ Na) ⁺	281,0996	281,0995	-0,43
	(M+Na-C ₆ H ₁₀) ⁺	(C ₆ H ₁₀ O ₇ Na) ⁺	217,0319	217,0321	0,97
	(M+Na-C ₆ H ₁₂ O) ⁺	(C ₆ H ₈ O ₆ Na) ⁺	199,0213	199,0215	0,90
HEX	M	C ₆ H ₁₂ O	100,0889	-	-
	(M+Na) ⁺	(C ₆ H ₁₂ ONa) ⁺	123,0781	123,0781	0,08
PRO-CIT	M	C ₁₆ H ₂₈ O ₇	332,1836	-	-
	(M+Na) ⁺	(C ₁₆ H ₂₈ O ₇ Na) ⁺	355,1727	355,1725	-0,62
	(2M+Na) ⁺	(C ₃₂ H ₅₆ O ₁₄ Na) ⁺	687,3562	687,3559	-0,48
	(M+Na-H ₂ O) ⁺	(C ₁₆ H ₂₆ O ₆ Na) ⁺	337,1616	337,1614	-0,65
	(M+Na-C ₁₀ H ₁₈) ⁺	(C ₆ H ₁₀ O ₇ Na) ⁺	217,0319	217,0321	0,97
	(M+Na-C ₁₀ H ₂₀ O) ⁺	(C ₆ H ₈ O ₆ Na) ⁺	199,0213	199,0217	1,91
CIT	M	C ₁₀ H ₂₀ O	156,1515	-	-
	(M+Na) ⁺	(C ₁₀ H ₂₀ ONa) ⁺	179,1407	179,1407	-0,39
GA	M	C ₆ H ₁₀ O ₇	194,0427	-	-
	(M+Na) ⁺	(C ₆ H ₁₀ O ₇ Na) ⁺	217,0319	217,0318	-0,41

Os resultados mais relevantes obtidos para compostos de partida estão ilustrados nas figuras S4-9. Já os resultados de MS e MS/MS obtidos para PRO-CIT estão sumarizados em Figuras 18-20. Foi possível verificar a presença de três íons de fragmentação do íon (M+Na)⁺: PRO-CIT após da perda de uma molécula de água (M+Na-H₂O)⁺, sem a porção da fragrância CIT (M+Na-C₁₀H₁₈)⁺ e sem uma água e porção CIT (M+Na-C₁₀H₂₀O)⁺. O íon de fragmentação sem a porção de fragrância é muito interessante, levando a hipótese que existe uma ligação mais fraca entre GA e CIT que é rompida com a energia de fragmentação, nesse caso sendo a ligação éster. O mesmo é observado para PRO-HEX, como ilustrado nas Figuras 21 a 23 de MS e Figuras 24 e 25 de MS/MS.

Figura 18. Espectro de massas de **PRO-CIT** obtido no ObriTrap-MS. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,20-0,80

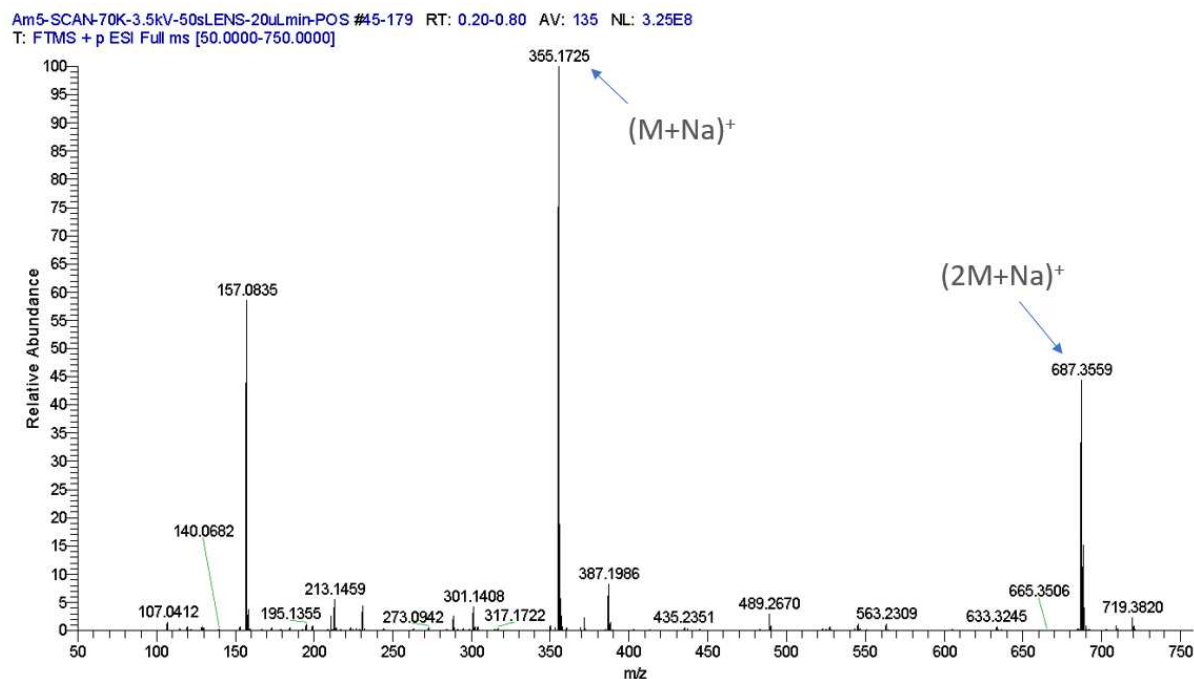


Figura 19. Comparação entre espectros - obtido (superior) e o simulado (inferior) para **PRO-CIT**. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,90

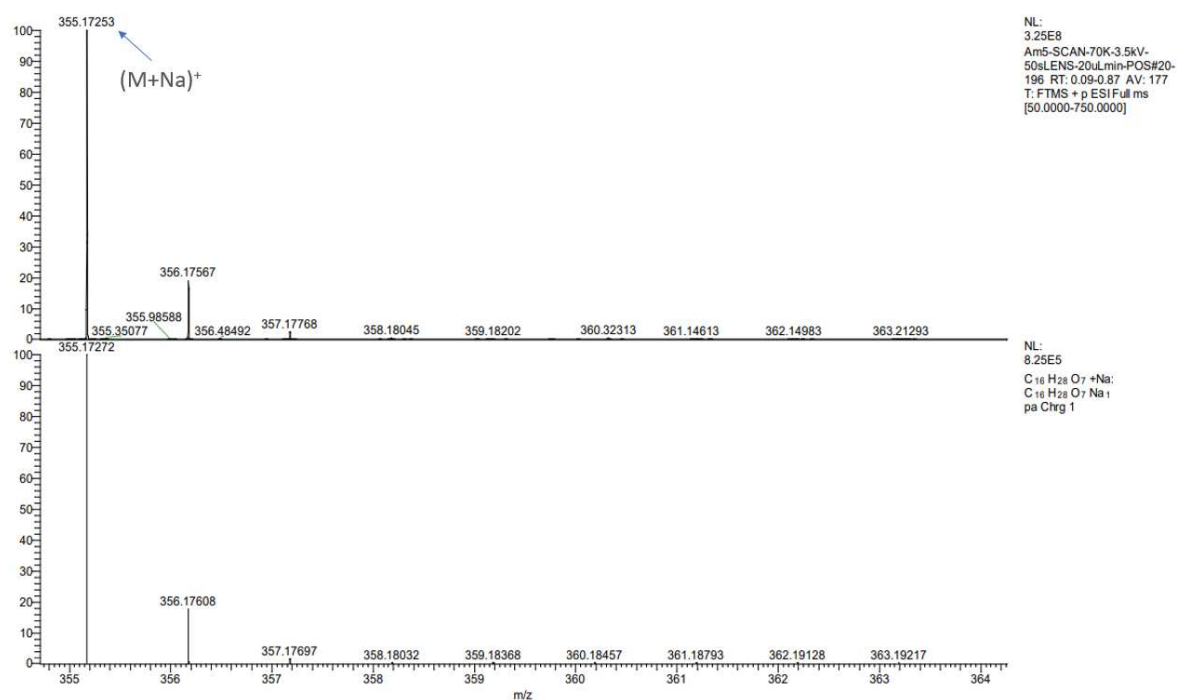


Figura 20. Espectro de massas de **PRO-CIT** obtido no ObriTrap-MS. Modo **PRM (fragmentação)**, energia 50 nce, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,2-0,8

Am5-PRM-50NCE-3.5kV-50sLENS-20uLmin-POS #134-550 RT: 0.20-0.79 AV: 47 NL: 1.38E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 687.3600@hcd50.00 [50.0000-720.0000]

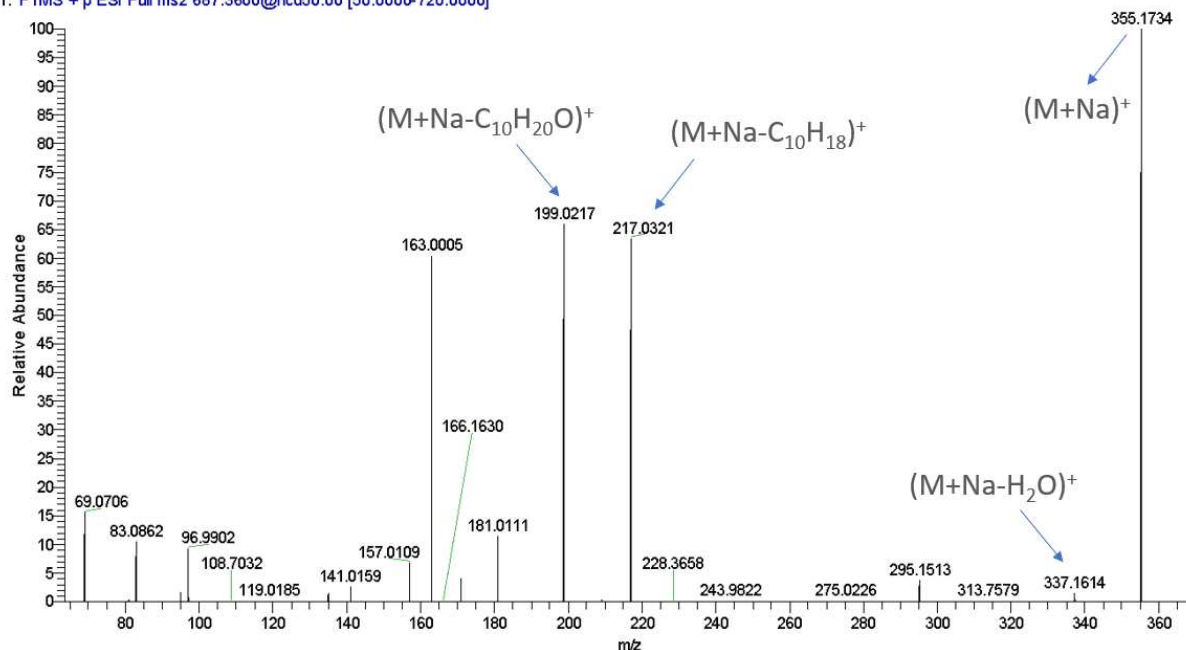


Figura 21. Espectro de massas de **PRO-HEX** obtido no ObriTrap-MS. Modo **full scan**, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,11

PRO-HEX-20x #7-13 RT: 0.06-0.11 AV: 7 NL: 3.35E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

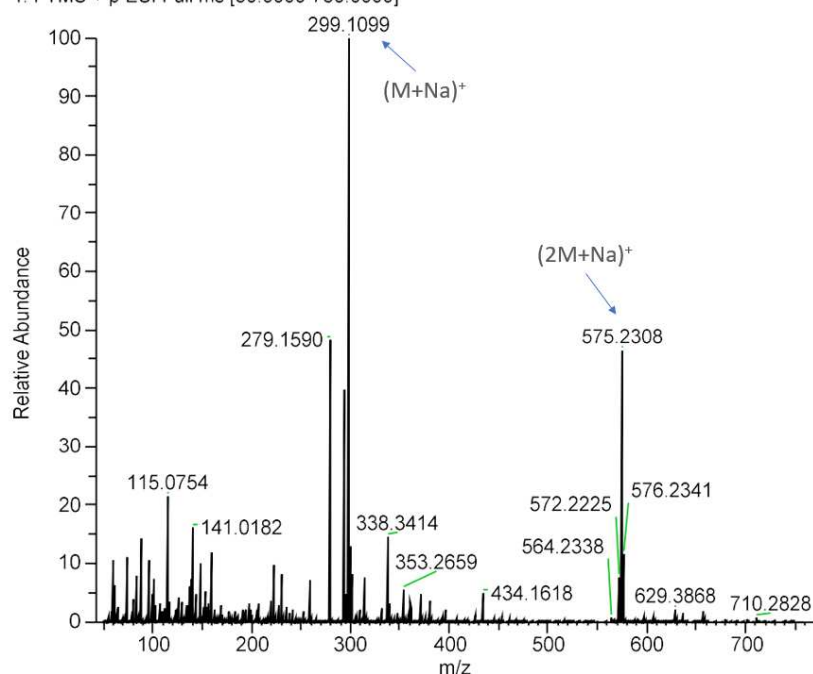


Figura 22. Comparação entre espectros - obtido (superior) e o simulado (inferior) para **PRO-HEX**. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,11

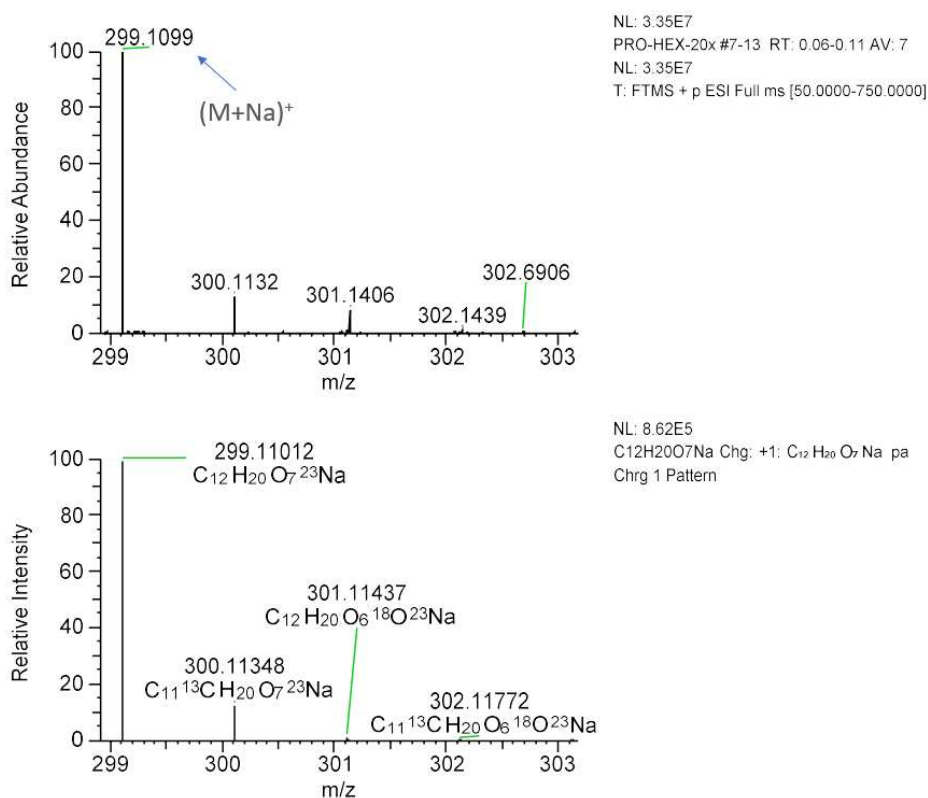


Figura 23. Comparação entre os espectros - obtido (superior) e o simulado (inferior) para **PRO-HEX**. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,06-0,11

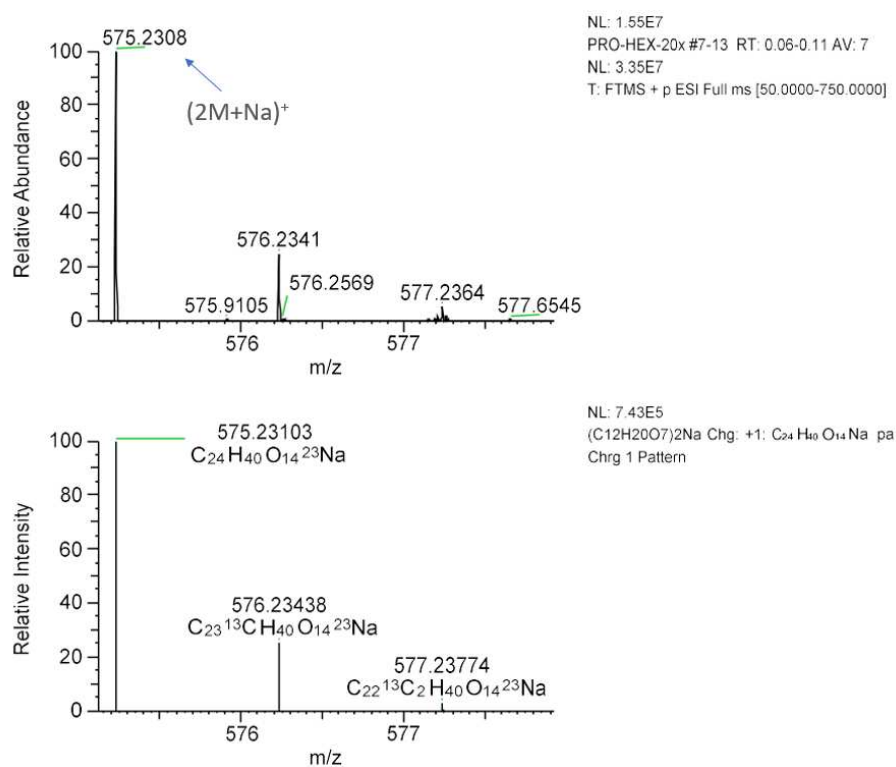


Figura 24. Comparação entre os espectros - obtido l (superior) e o simulado (inferior) para **PRO-HEX**. Modo **HCD** (fragmentação do precursor 299 m/z), energia 30 nce, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 1,15

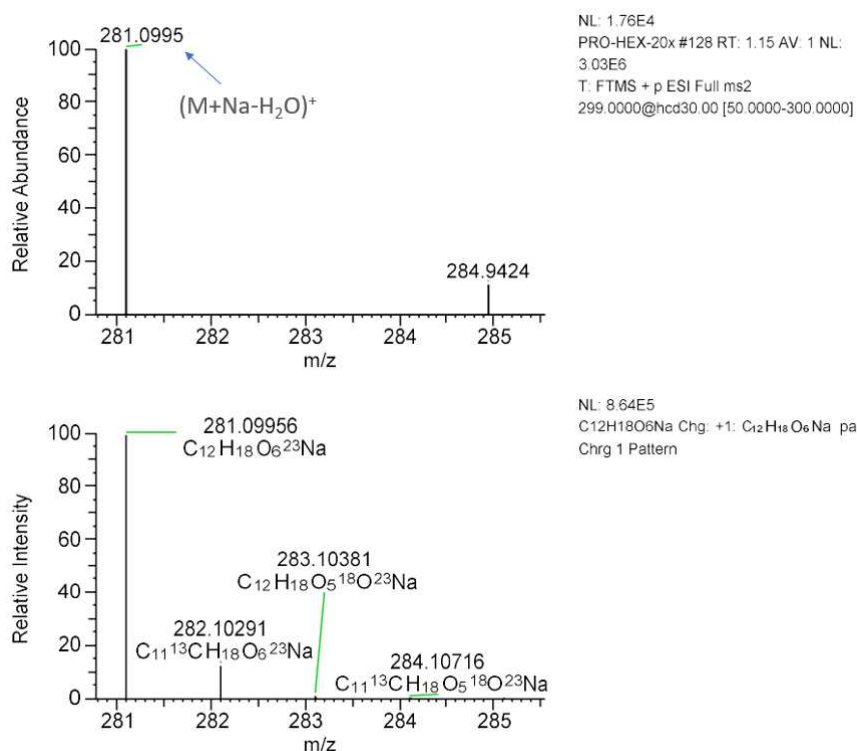
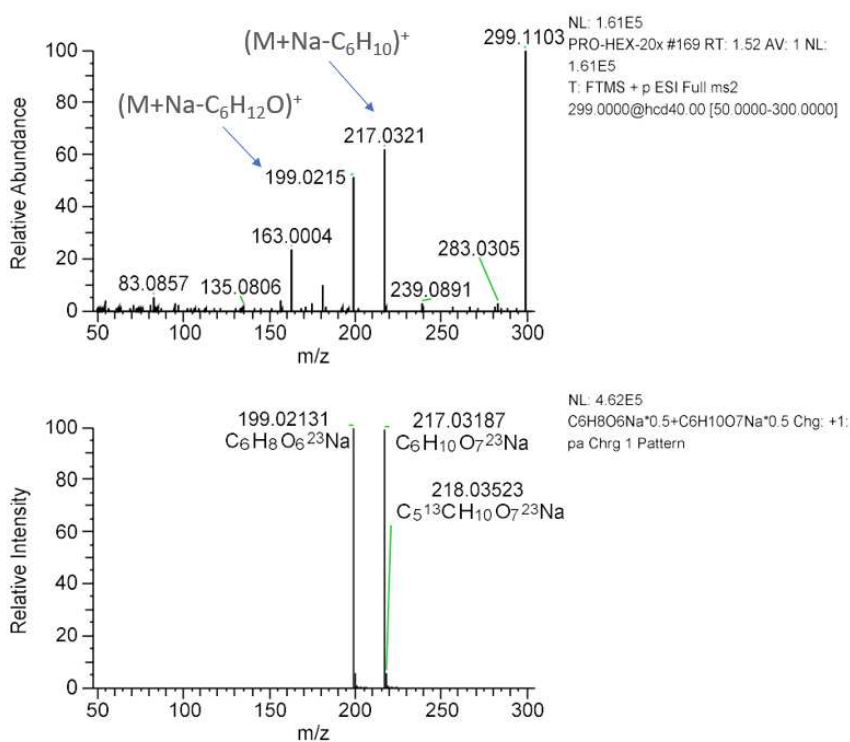


Figura 25. Comparação entre espectros - real (superior) e simulado (inferior) de **PRO-HEX**. Modo **HCD** (fragmentação do precursor 299 m/z), energia 40 nce, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 1,52



4.3.3. Dados de pró-fragrâncias por NMR

Os dados obtidos por NMR confirmaram a estrutura dos produtos PRO-CIT e PRO-HEX. Após uma comparação de dados de 2D HSQC, pode-se observar a perda da hidroxila dos reagentes CIT e HEX, e a formação das ligações éster. A Figura 26 ilustra essa comparação para PRO-CIT e CIT e a Figura 27 a comparação entre PRO-HEX e HEX. Muitos picos de espectros de NMR foram observados e nomeados como *a* e *a'*, devido aos carbonos assimétricos. Por exemplo, o carbono 1 apresenta a configuração α e β do ácido glicurônico: a posição equatorial dos hidrogênios α é sempre mais desprotegida do que a posição axial β .

Figura 26. Sobreposição e atribuição de espectros HSQC, da amostra CIT (verde escuro) e PRO-CIT (verde claro) diluídas em DMSO- d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , respectivamente

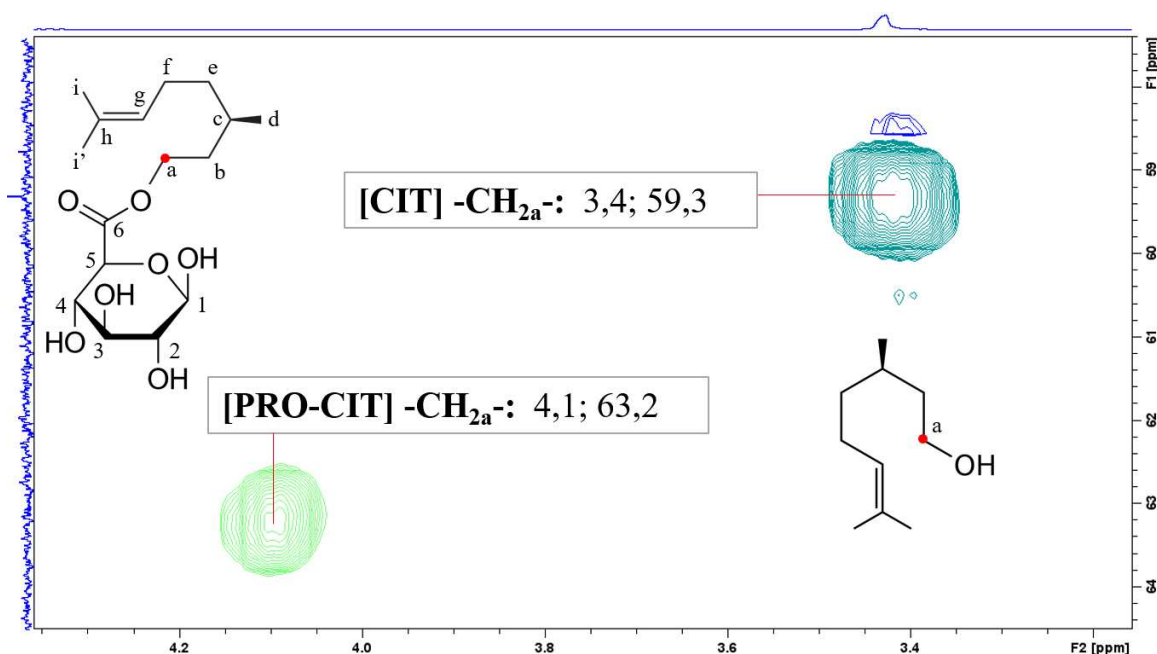
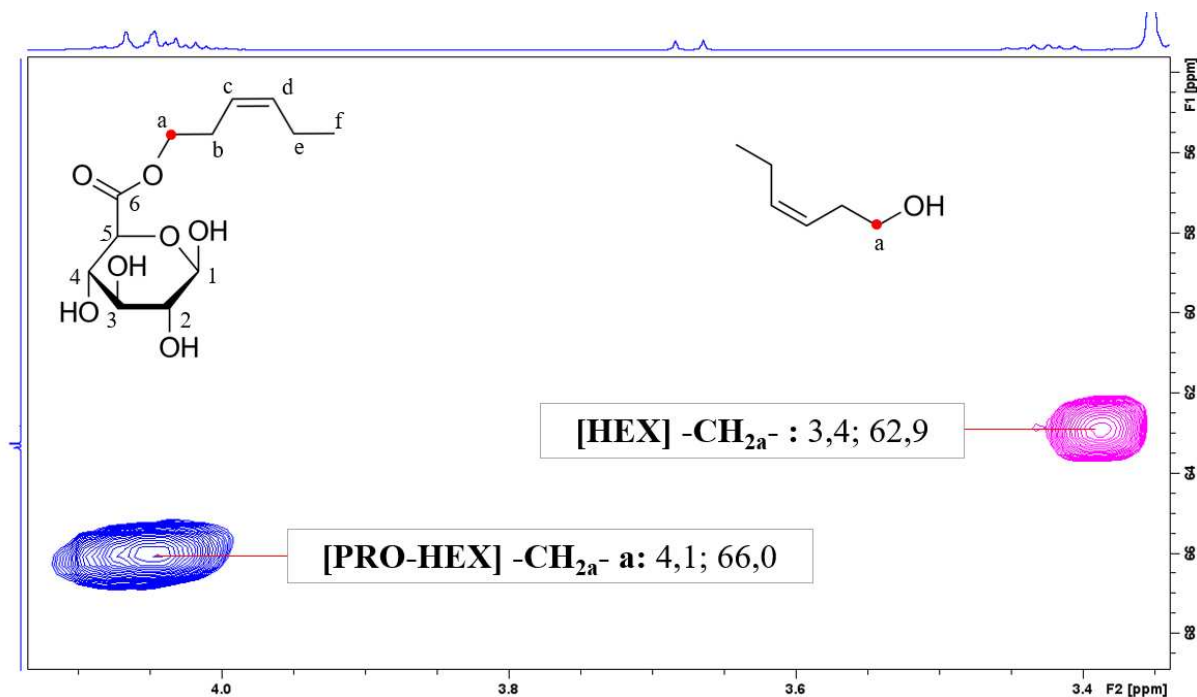


Figura 27. Sobreposição e atribuição de espectros HSQC, da amostra **HEX (rosa)** e **PRO-HEX (azul)** diluídas em DMSO- d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , respectivamente



As atribuições de sinais em ^1H NMR e 2D HSQC obtidos para PRO-CIT estão apresentadas nas Figuras 28 e 29, respectivamente. Para PRO-HEX, estão nas Figuras 30 e 31. Os valores atribuídos para cada sinal correspondente às estruturas das pró-fragrâncias estão dispostos na Tabela 10 e na Figura 32. Mais detalhes sobre os valores obtidos dos compostos sintetizados estão ilustrados nas Figuras S10-27, no material suplementar.

Figura 28. Atribuição de dados espectrais de ^1H NMR da amostra **PRO-CIT** diluída em DMSO-d_6

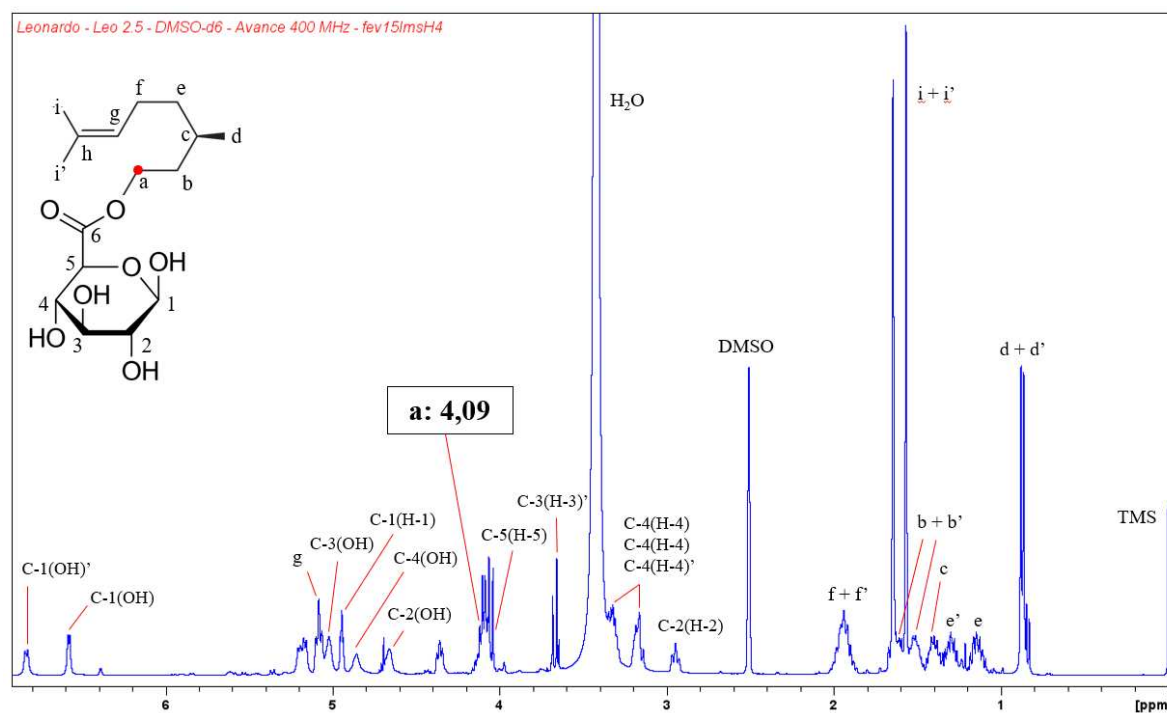


Figura 29. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra **PRO-CIT** diluída em DMSO-d_6

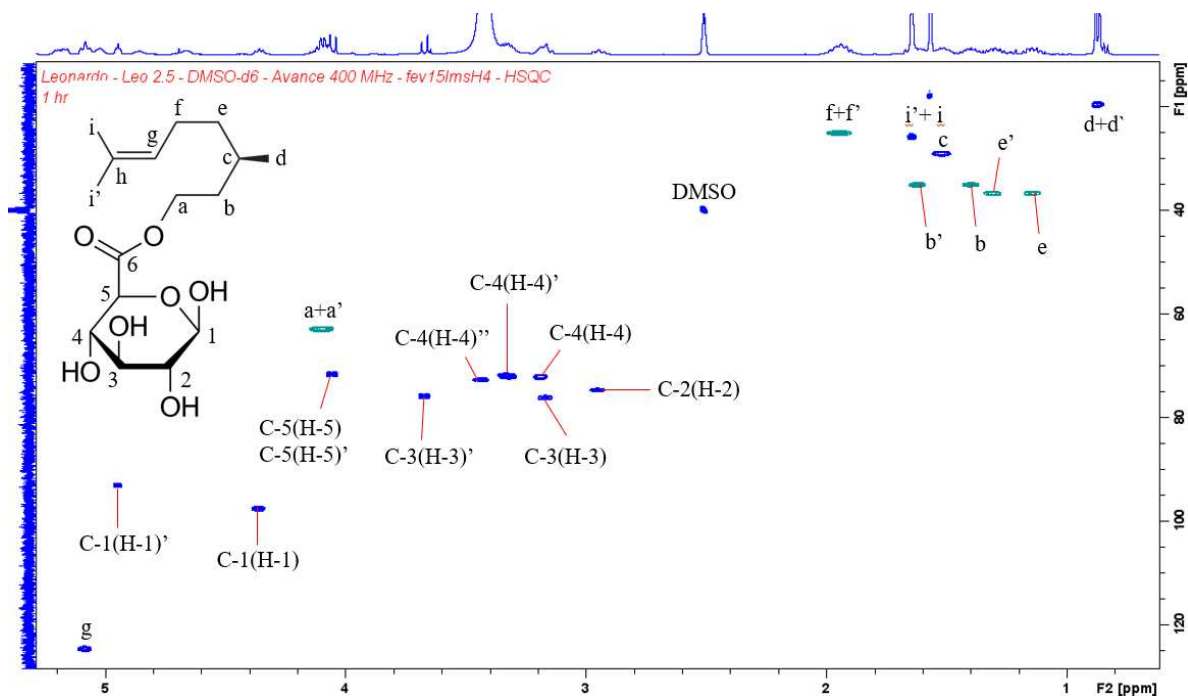


Figura 30. Atribuição dos dados espectrais do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6

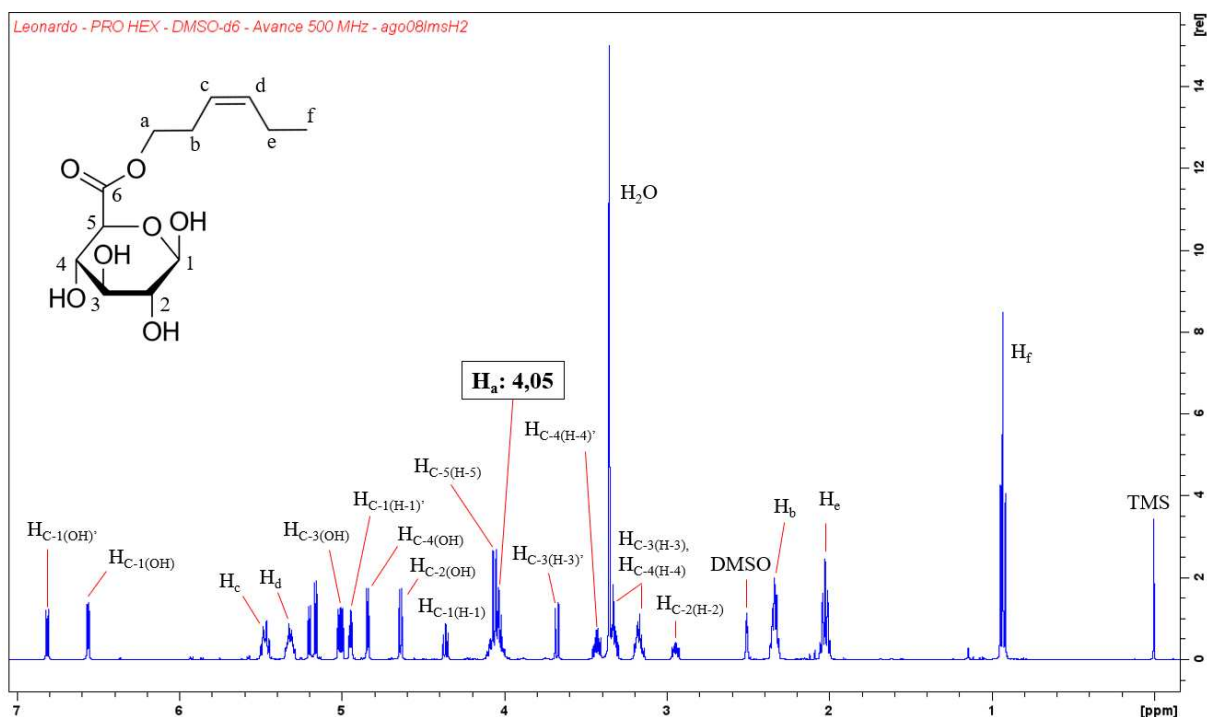


Figura 31. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6

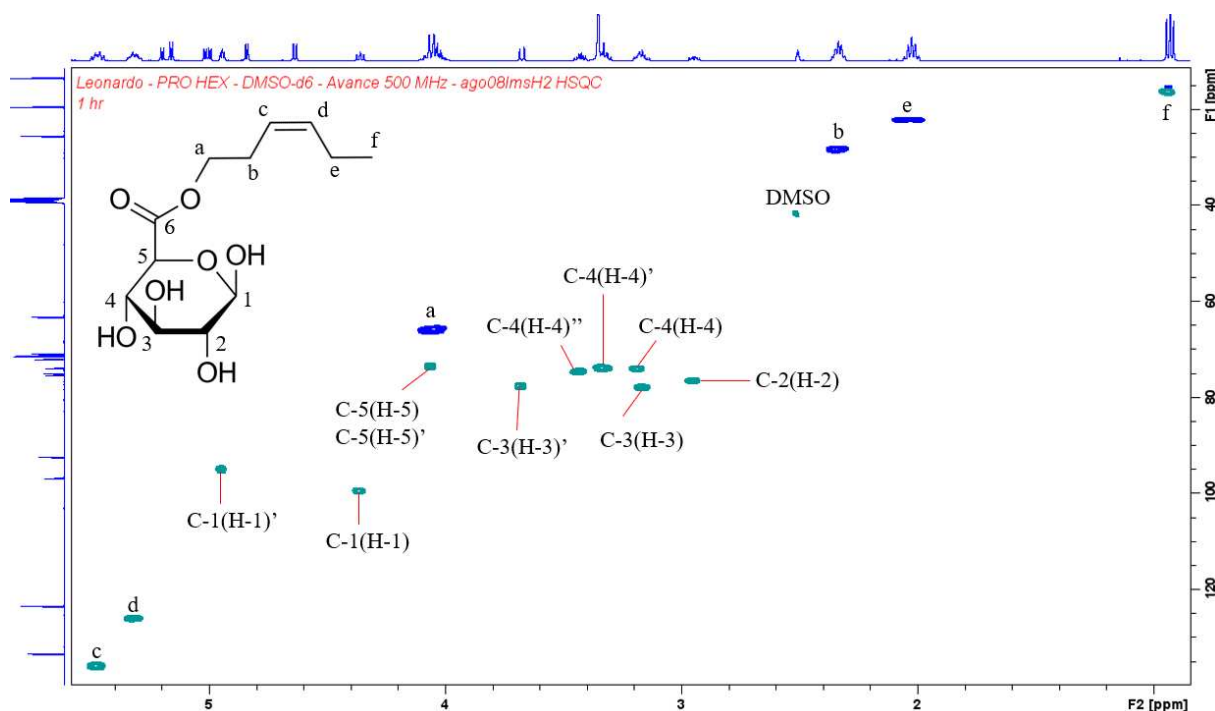
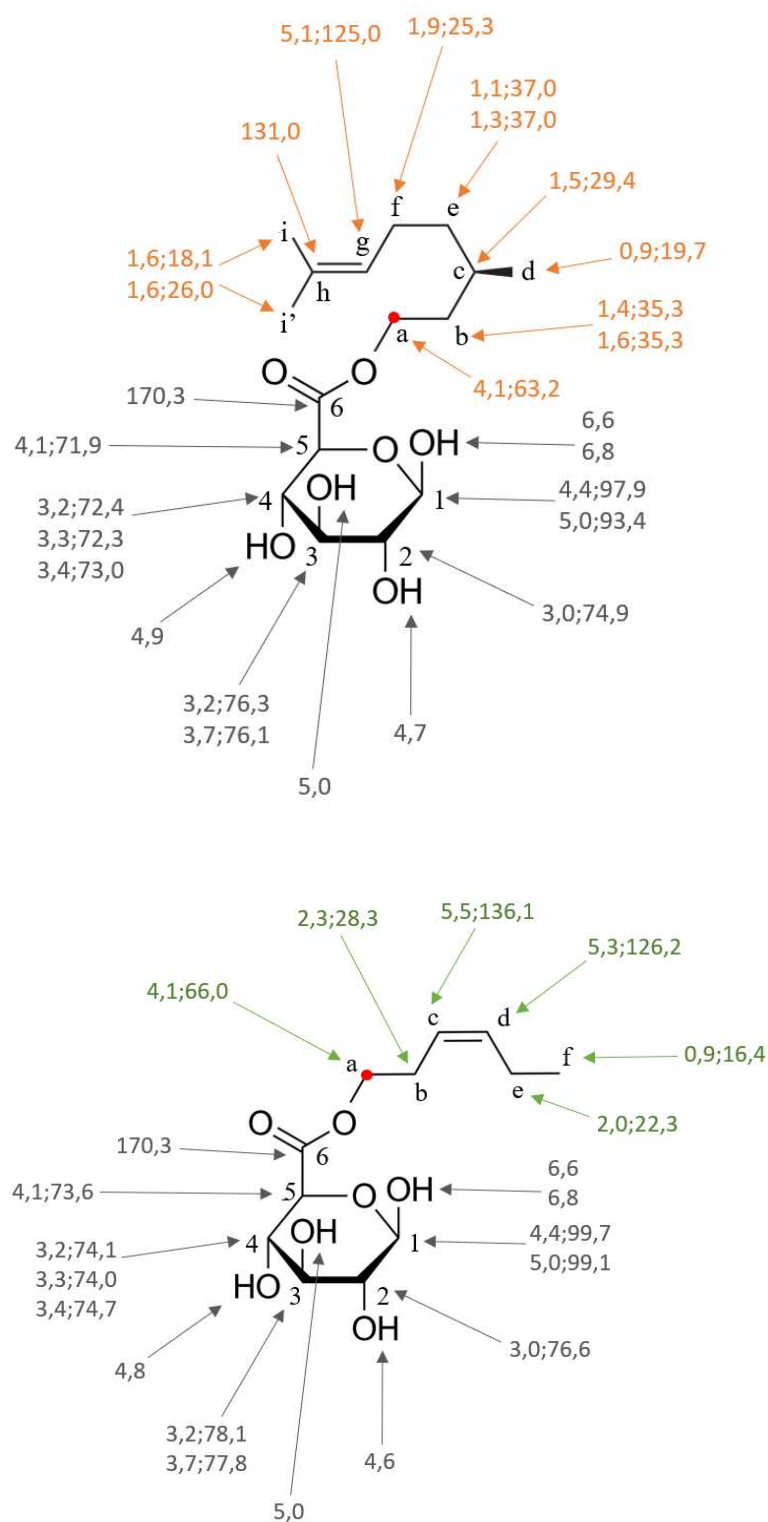


Tabela 10. Atribuição dos dados espectrais de ^1H NMR e 2D NMR pelo *software* TopSpin 3.6.5

PRO-CIT					PRO-HEX				
Posição	^1H			^{13}C	Posição	^1H			^{13}C
	δ	Mult.	J (Hz)			δ	Mult.	J (Hz)	
C-1(H-1) β	4,36	t	6,79	97,90	C-1(H-1) β	4,36	t	7,28	99,65
C-1(H-1)' α	4,95	t	3,74	93,36	C-1(H-1)' α	4,95	t	4,18	99,05
C-2(H-2)	2,95	t	8,30	74,90	C-2(H-2)	2,95	m	3,10	76,60
C-3(H-3)	3,17	m	8,91	76,31	C-3(H-3)	3,17	m	3,39	78,05
C-3(H-3)'	3,67	d	9,68	76,13	C-3(H-3)'	3,67	d	9,72	77,77
C-4(H-4)	3,19	m	8,91	72,44	C-4(H-4)	3,19	m	3,60	74,08
C-4(H-4)'	3,33	m	4,78	72,26	C-4(H-4)'	3,34	m	4,20	73,96
C-4(H-4)''	3,44	m	-	72,97	C-4(H-4)''	3,44	m	4,68	74,67
C-5(H-5)	4,06	d	9,77	71,91	C-5(H-5)	4,06	d	10,01	73,58
C-1(OH)	6,58	ds	4,41	-	C-1(OH)	6,56	d	4,77	-
C-1(OH)'	6,83	ds	6,41	-	C-1(OH)'	6,81	d	6,81	-
C-2(OH)	4,68	m	9	-	C-2(OH)	4,64	d	6,71	-
C-3(OH)	5,02	m	-	-	C-3(OH)	5,01	qua	5,05	-
C-4(OH)	4,86	m	-	-	C-4(OH)	4,84	d	5,15	-
C-6	-	-	-	170,30	C-6	-	-	-	170,30
a	4,1	m	5,77	63,21	a	4,05	m	3,53	66,00
b	1,4	m	6,2	35,34	b	2,34	qui	6,39	28,30
b'	1,62	m	5,44	35,34	c	5,48	m	-	136,10
c	1,52	m	5,28	29,37	d	5,33	m	1,90	126,17
d	0,87	d	6,51	19,7	e	2,02	qui	7,45	22,29
e	1,14	m	7,17	36,97	f	0,94	t	7,52	16,36
e'	1,31	m	4,78	36,97					
f	1,94	m	8,15	25,32					
g	5,09	t	4,37	125,01					
h	-	-	-	131,04					
i	1,57	s	-	18,11					
i'	1,64	s	-	26,03					

Figura 32. Atribuição dos dados espectrais de NMR pelo *software* TopSpin 3.6.5. PRO-CIT na parte superior e PRO-HEX na parte inferior



4.4. Estudo de estabilidade e liberação controlada de pró-fragrâncias

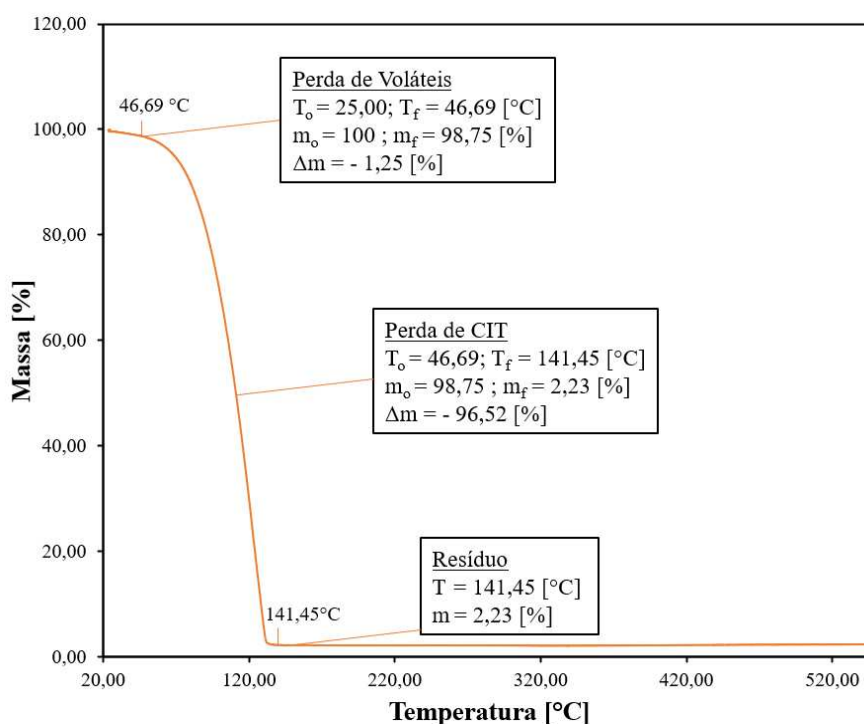
4.4.1 Estabilidade e liberação térmica de pró-fragrâncias

A estabilidade e liberação térmica pôde ser estudada por TGA, atribuindo a cada perda de massa em função da temperatura um evento, considerando o conteúdo da amostra já caracterizado e a estrutura molecular do seu composto majoritário.

Com as curvas derivadas da perda de massa em função da temperatura foi possível identificar com mais facilidade os momentos iniciais e finais de cada etapa de perda abrupta de massa. Do ponto de vista olfativo, verificar o início dessa maior taxa de evaporação é mais interessante do que analisar o ponto máximo da curva, como é de costume nas análises de derivadas TGA.

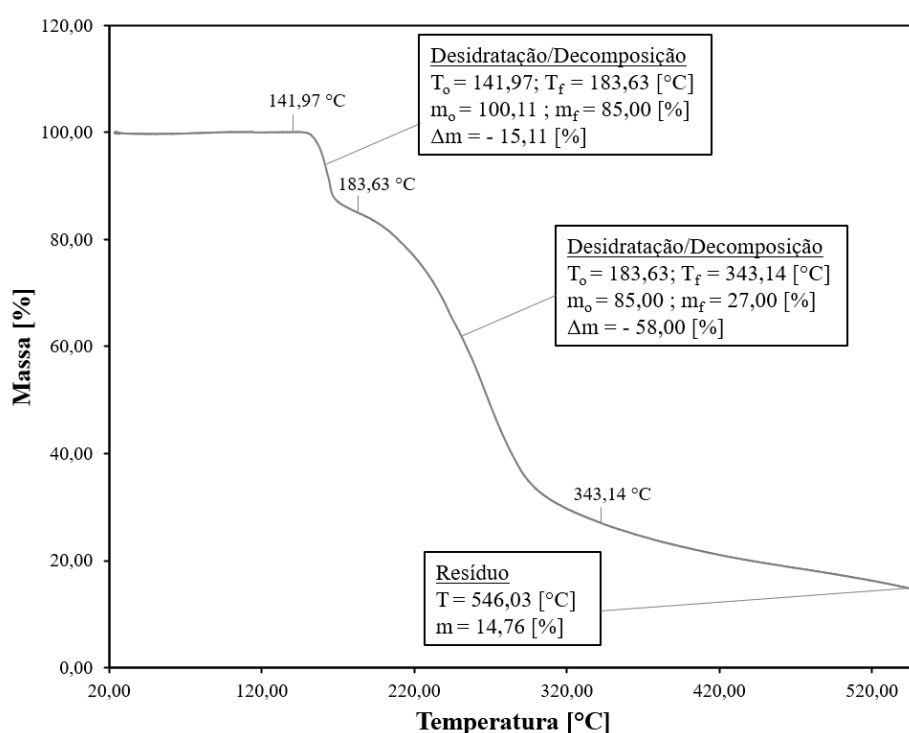
Os resultados de CIT (Figura 32) revelam que entre o início do experimento e 46,69 °C, houve uma perda de 1,25% de massa. Depois, entre essa temperatura e 141,45 °C, há uma perda de 96,52% de massa, atribuída à volatilização do citrônolol, sobrando apenas 2,23% de resíduo.

Figura 33. Ilustração de dados obtidos em análise de CIT por TGA expressos em massa em função da temperatura



Analizando os resultados obtidos de GA por TGA (Figura 33), pôde-se observar que entre 141,97 °C e 183,63 °C houve uma perda de 15,11% de massa. Depois, entre 183,63 °C e 343,14 °C houve uma perda de 58,00% de massa. Essas perdas foram atribuídas ao processo de desidratação do ácido, processo comum para moléculas de glicose e seus derivados. Depois de 343,14 °C, a perda de massa ocorreu de forma mais lenta e gradual, continuado pela desidratação e decomposição, sobrando, ao final do experimento, 14,76% de massa de resíduo.

Figura 34. Ilustração de dados obtidos em análise de GA por TGA expressos em massa em função da temperatura



Já analisando os resultados de PRO-CIT (Figura 34), foi observado que o composto tem uma perda de 8,24% de massa até atingir 139,62 °C, justificada pela perda de resíduos voláteis (água, citrônolol não-reagido ou solventes). Em seguida, entre essa temperatura e 264,66 °C houve uma perda significativa de massa atribuída à liberação térmica de CIT e desidratação/decomposição da porção de GA, representando uma perda de 54,95% de massa. Ao final do experimento, restou 14,76% de massa de resíduo.

As curvas obtidas de GA, CIT e PRO-CIT foram sobrepostas (Figura 35) para melhor visualização do momento da liberação térmica.

Figura 35. Ilustração de dados obtidos em análise de **PRO-CIT** por TGA expressos em massa em função da temperatura

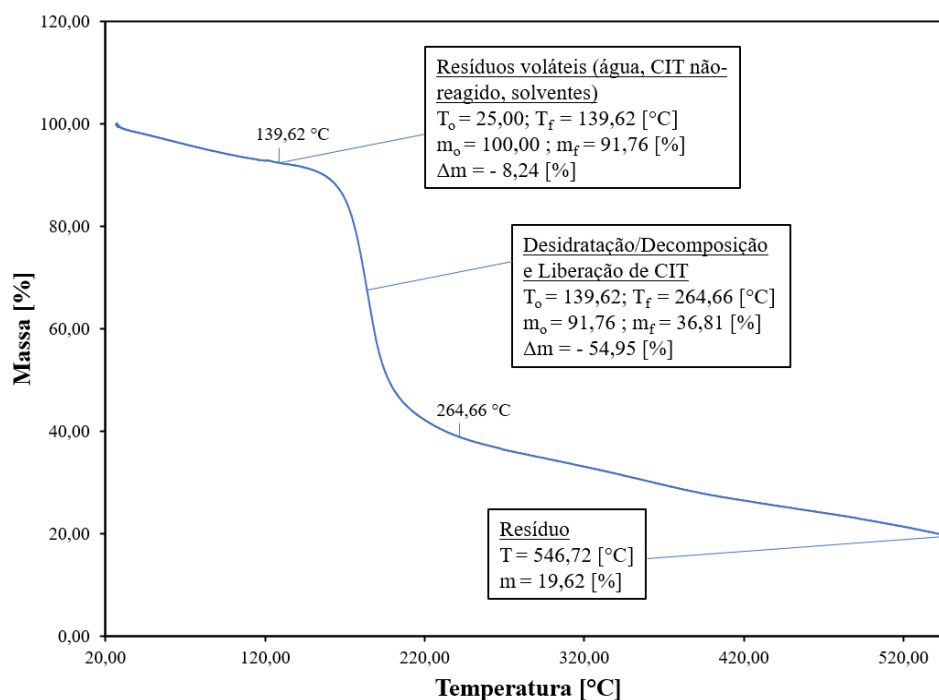
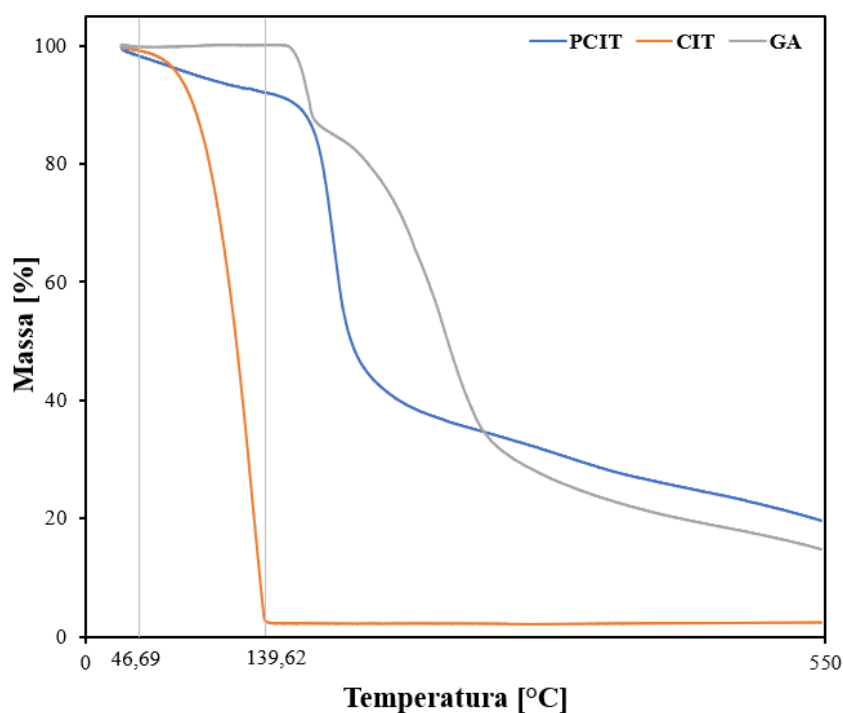


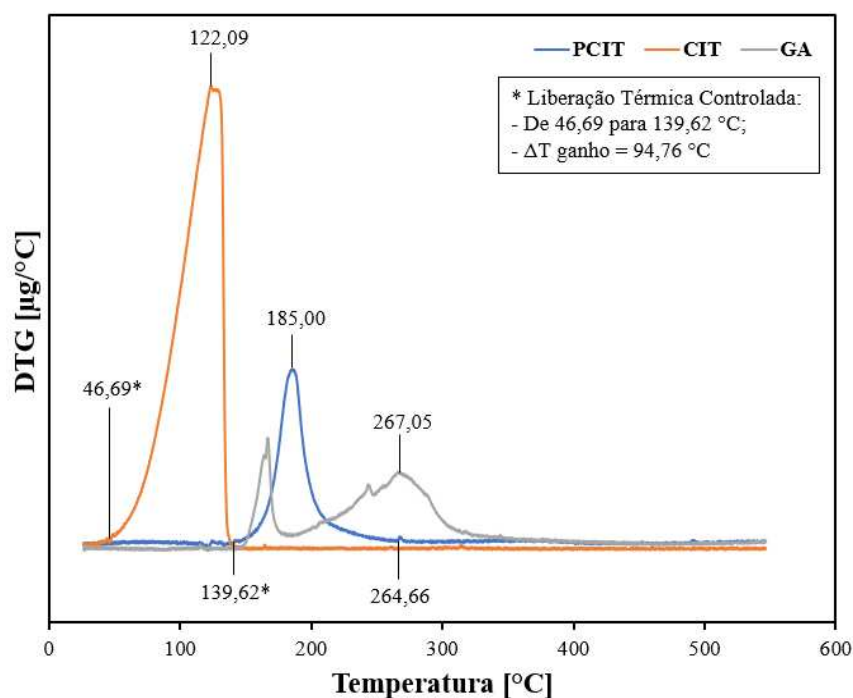
Figura 36. Ilustração de dados obtidos em análise de **CIT**, **GA** e **PRO-CIT** por TGA expressos em massa em função da temperatura



As curvas de derivada de massa em função da temperatura (Figura 36) sobrepostas de PRO-CIT mostram claramente que o perfil da perda significativa de massa de

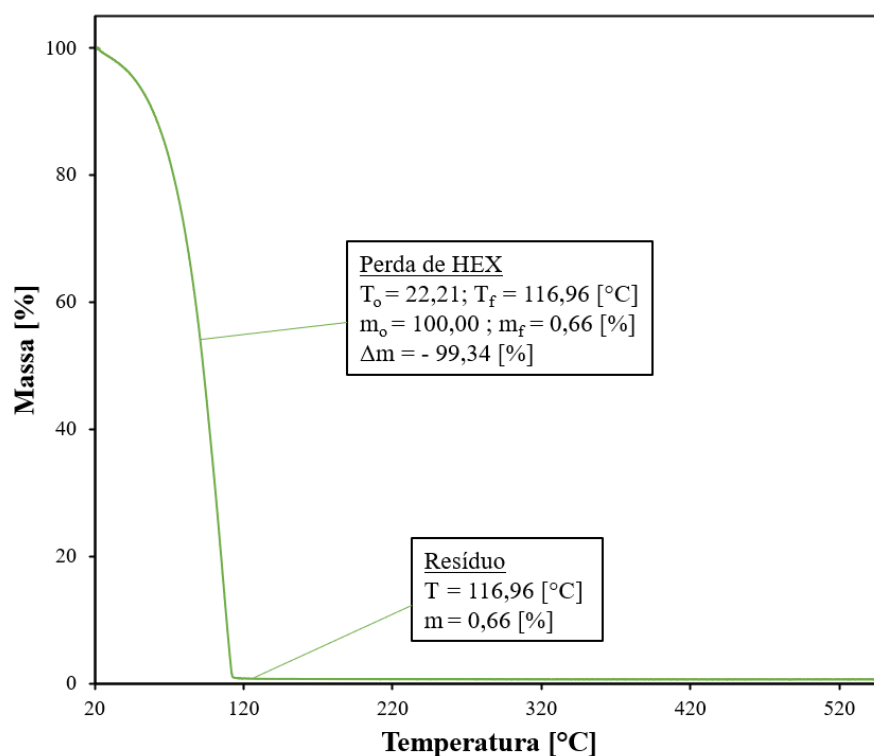
PRO-CIT é muito similar com a do citrônolol, com a diferença de ter acontecido 94,76 °C depois, representando uma liberação térmica mais controlada de CIT, através da quebra da ligação éster entre 139,62 °C e 264,66 °C. O ponto máximo de CIT é 122,09 °C e para PRO-CIT 185,00 °C, representando uma diferença de 62,91 °C.

Figura 37. Ilustração de dados obtidos em análise de CIT, GA e PRO-CIT por TGA expressos em massa em derivada da massa em função da temperatura



Analisando a outra fragrância, HEX (Figura 37), o composto demonstrou ser mais volátil que CIT, já havendo grande perda de massa desde o início do experimento. Da temperatura inicial até 116,96 °C, 99,34% da massa foi evaporada, restando 0,66% de massa de resíduo.

Figura 38. Ilustração de dados obtidos em análise de **HEX** por TGA expressos em massa em função da temperatura



O resultado de PRO-HEX (Figura 38) foi similar à PRO-CIT. Do início do experimento até 130,57 °C, 11,37% de massa evaporou, atribuída pela perda de resíduos voláteis (água, HEX não-reagido ou solventes). Dessa temperatura até 204,27 °C, a perda de 45,49% de massa foi atribuída pela liberação térmica de HEX e desidratação/decomposição da porção de GA. Ao final do experimento, sobrou 15,67% de resíduo.

As curvas obtidas de GA, HEX e PRO-HEX foram sobrepostas (Figura 39) para melhor visualização do momento da liberação térmica.

Figura 39. Ilustração de dados obtidos em análise de **PRO-HEX** por TGA expressos em massa em função da temperatura

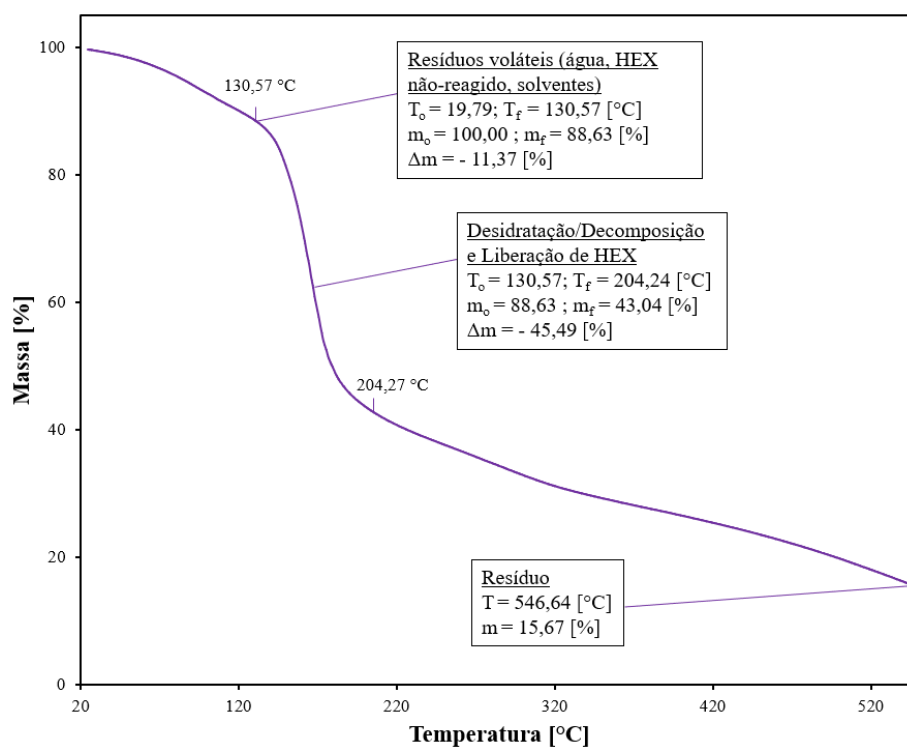
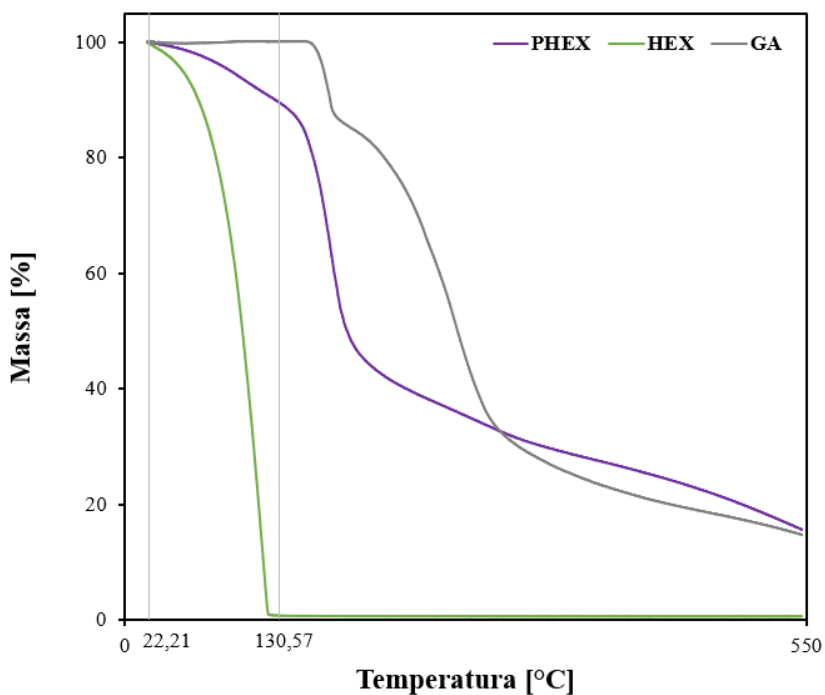


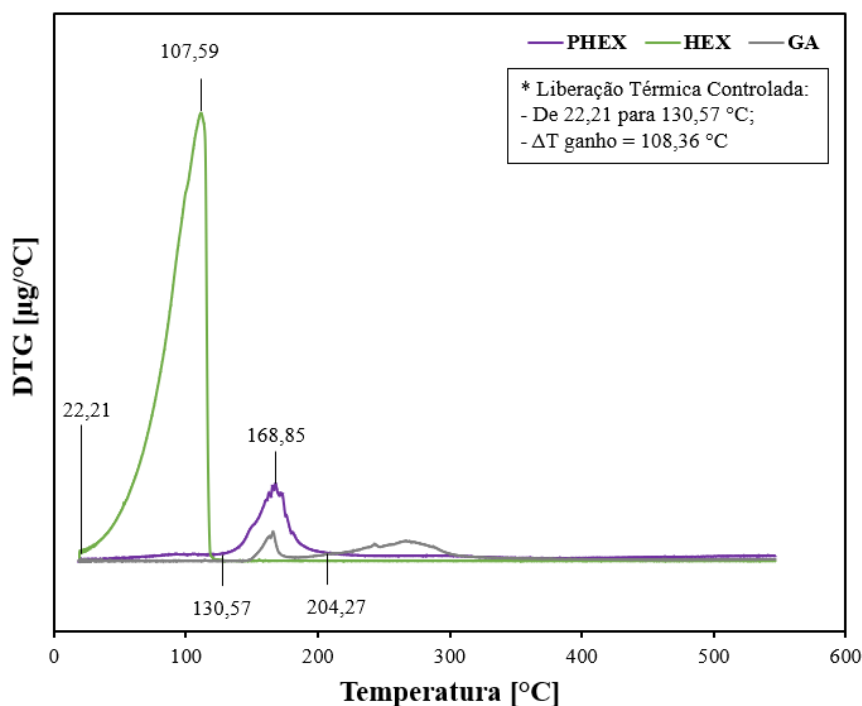
Figura 40. Ilustração de dados obtidos em análise de **HEX**, **GA** e **PRO-HEX** por TGA expressos em massa em função da temperatura



Assim como PRO-CIT, as curvas de derivada de massa em função da temperatura (Figura 40) sobrepostas também mostram claramente que o perfil da perda significativa de massa de PRO-HEX é muito similar com a de HEX, com a diferença de ter acontecido 108,36 °C depois, representando uma liberação térmica mais controlada de HEX, através da quebra da ligação éster entre 130,57 °C e 204,27 °C. O ponto máximo de HEX é 107,59 °C e para PRO-CIT 168,85 °C, representando uma diferença de 61,26 °C.

Os valores de diferença entre os pontos máximos de derivada entre CIT e PRO-CIT (62,91 °C), e entre HEX e PRO-HEX (61,26 °C) são muito próximos: uma diferença de 2,62%. Isso pode ser atribuído por tanto PRO-CIT quanto PRO-HEX terem uma mesma ligação química entre GA e a fragrância: a ligação éster. Esse é um resultado bastante interessante do ponto de vista termodinâmico sobre energia de quebra de ligações químicas relativamente lábeis.

Figura 41. Ilustração de dados obtidos em análise de **HEX**, **GA** e **PRO-HEX** por TGA expressos em derivada da massa em função da temperatura



É possível discutir uma relação entre a volatilidade do ativo/fragrância que se liga a um carreador e energia necessária para quebrar essa ligação. HEX (pressão de vapor 1,039000 mm/Hg a 25.00 °C)^[65] é um composto muito mais volátil que CIT (0,020000 mmHg

a 25.00 °C)^[66], portanto, existe uma maior tendência desse composto ir para o estado gasoso - nesse caso, atribuído pela menor massa molecular de HEX em relação à CIT. Em um experimento como o TGA em que há aumento gradual de temperatura, as moléculas e ligações químicas adquirem energia cinética e, portanto, agitação. Dessa forma, uma pró-fragrância contendo uma fragrância mais volátil que outra pode adquirir maior grau de agitação, havendo maior propensão a quebrar ligações químicas lábeis, como a do tipo-éster. Experimentos em TGA de diferentes pró-fragrâncias, de mesmo carreador (estudo de grupo substituinte), talvez poderiam revelar que existe uma relação matemática entre a sua volatilidade (pressão de vapor) e a energia de ligação química carreador-fragrância. Isso poderia ser uma ferramenta útil para o *design* de novas moléculas termoeestáveis ou com *delivery* térmico.

4.4.2. Dados de pró-fragrâncias por HS-SPME-GC-MS

Uma das propostas do projeto é mostrar que as pró-fragrâncias podem ser degradadas com facilidade, liberando a fragrância na pele humana. Dessa forma, foram executados experimentos na matriz que representa a microbiota da pele humana e através de um painel sensorial que será discutido no próximo tópico (4.4.3.). Como a microbiota da pele humana contém enzimas lipases, esse ambiente pode ativar a pró-fragrância do tipo éster.

A fragrância pode se encontrar: dentro da matriz (microbiota da pele), no *headspace* e na fase sorvente da fibra quando analisada por HS-SPME-GC-MS. Existe um equilíbrio entre a concentração da fragrância nessas três fases, que é atingida com o tempo. No entanto, para moléculas voláteis, é esperado que ocorra uma maior porcentagem de sua concentração no *headspace* e na fibra. Quanto maior a concentração de uma espécie química no *headspace*, maior a probabilidade de interagir com a fase sorvente da fibra e, portanto, maior será a concentração detectada.

No caso desse experimento, a concentração absoluta não foi calculada, pois para isso seria necessário desenvolver uma curva de calibração e pelo tempo do projeto isso não foi possível. No entanto, foi possível realizar medições relativas de uma mesma fragrância, relacionando a área da região do cromatograma responsável pelo íon *m/z* da fragrância HEX com PRO-HEX, por exemplo. Dessa forma, o resultado irá comparar HEX com PRO-HEX e

HEX + GA; e comparar CIT com PRO-CIT. Relembrando que HEX + GA irá discutir o efeito de interação entre o carreador GA e HEX sem ligação covalente entre eles.

Muitos íons poderiam ser escolhidos para o estudo, mas quanto maior for sua intensidade no espectro de massas, maior será sua área no cromatograma, o que facilita a comparação. Por tal motivo, foi escolhido o íon-base que no espectro de massas tem a maior intensidade. A região de maior sinal no cromatograma total foi selecionada para observar seu espectro de massas e verificar os principais íons detectados. O íon-base foi selecionado para verificar se ele é oriundo da fragrância da amostra. Para todos os casos, o íon-base correspondeu à fragrância da amostra, de acordo com a biblioteca digital webbook^[67, 68]. A Tabela 11 apresenta os íons-base selecionados para cada amostra, com erro menor que 3 ppm.

Em seguida, filtrando o cromatograma total com o íon-base selecionado, um cromatograma parcial foi gerado. Foi observado que esse cromatograma parcial possui o mesmo tempo de retenção do maior sinal do cromatograma total, evidenciando que a técnica permitiu a detecção da fragrância.

Tabela 11. Relação entre os íons selecionados de cada amostra com o início/fim do tempo de retenção (RT, do inglês *retention time*) do seu cromatograma, onde a área foi obtida em valor de intensidade e porcentagem

Amostra	Íon selecionado (m/z)	Início RT (min)	Fim RT (min)	Área	Área [%]
HEX	67,05420	4,18	4,70	$1,6 \times 10^{11}$	83,71
PRO-HEX	67,05417	4,18	4,72	$4,3 \times 10^{10}$	97,42
PRO-HEX-2	67,05418	4,18	4,72	$8,1 \times 10^{10}$	97,22
HEX + GA	67,05415	4,18	4,72	$1,7 \times 10^{11}$	78,43
CIT	81,06988	9,33	10,37	$5,1 \times 10^{11}$	97,85
PRO-CIT	81,06990	9,33	9,67	$9,0 \times 10^{10}$	85,86

A Tabela 12 e a Figura 42 resumem as principais comparações entre os valores de área obtidos. O experimento mostrou que a concentração relativa de HEX no *headspace* (representado por [HEX]) da amostra PRO-HEX representa 27,11% do valor na amostra HEX, o que pode ser atribuído pela imobilização via ligação covalente entre HEX e o carreador, ou seja, a pró-fragrância está retardando a volatilização de HEX.

PRO-HEX-2 foi a segunda análise de PRO-HEX: em PRO-HEX o tempo de interação da pró-fragrância com a matriz foi de 50 min e em PRO-HEX-2 150 min, ou seja, três vezes o tempo de interação. Nessa amostra, a [HEX] quase dobrou em relação à primeira análise, o que pode ser atribuído pela quebra da pró-fragrância. Esse resultado é um ótimo indicador de que o experimento funciona até esse tempo de análise, ou seja, a concentração da fragrância no *headspace* está, de fato, aumentando. Um experimento completo desse tipo ocuparia mais horas de uso do equipamento, o que não foi possível no momento do projeto. Haverá um momento em que o valor da área não irá mais alterar, quando o equilíbrio entre as três fases for atingido e toda a pró-fragrância tenha sido quebrada nesse equilíbrio. A expectativa é que comparando a fragrância livre com a pró-fragrância, o aumento da concentração da fragrância seja mais rápido quando ela estiver livre para todos os períodos de tempo. Esse experimento mostrou um aumento de concentração durante os primeiros 50 minutos para cada amostra e até 150 min para PRO-HEX.

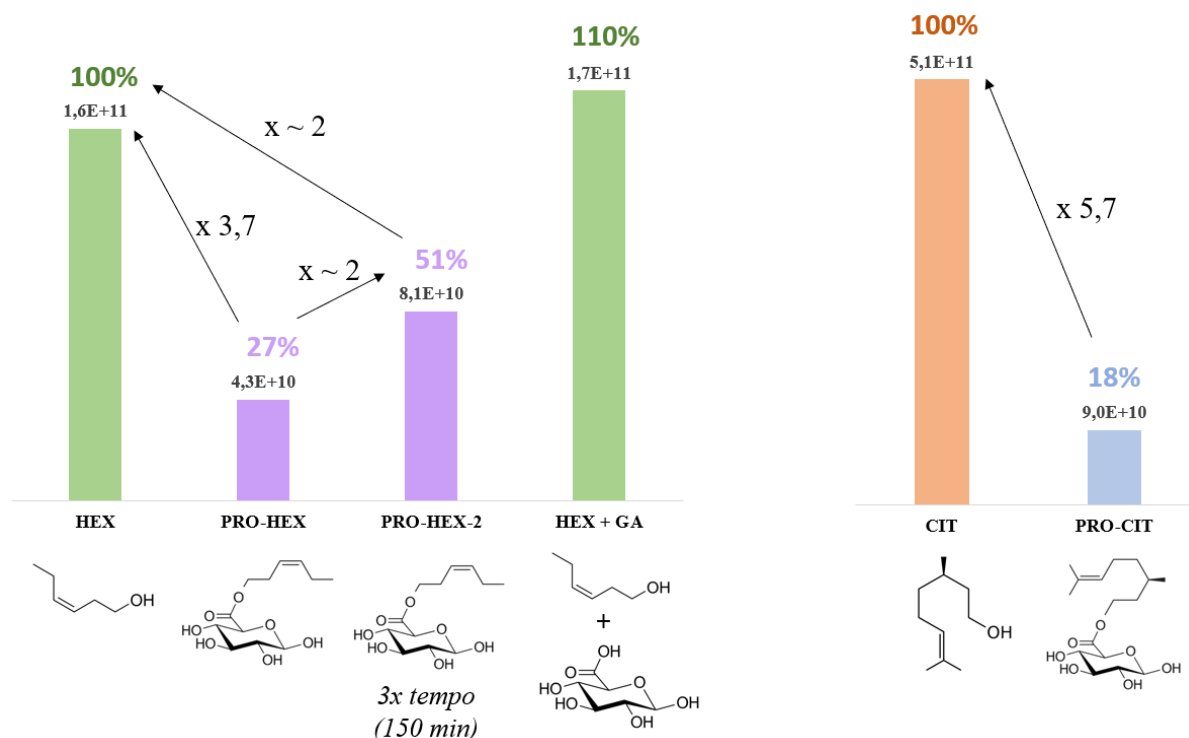
A amostra HEX + GA apresentou 10,27% [HEX] a mais que HEX, ou seja, um resultado relativamente próximo. A interação entre GA e HEX não representou uma redução na evaporação da fragrância, reforçando o efeito da ligação covalente PRO-HEX em relação às interações intermoleculares entre GA e HEX.

A concentração de *headspace* CIT da amostra PRO-CIT representa 17,47% do valor na amostra CIT, o que pode ser atribuído pela imobilização via ligação covalente entre CIT e o carreador, ou seja, a pró-fragrância está retardando a volatilização de CIT. Esse é um resultado semelhante ao caso entre HEX e PRO-HEX.

Tabela 12. Razão das áreas obtidas do cromatograma parcial dos íons referentes às fragrâncias. A área é proporcional à concentração da fragrância livre no *headspace*

Área(amostra 1) / Área(amostra 2)	Razão [%]
PRO-HEX / HEX	27,11%
PRO-HEX-2 / HEX	50,89%
PRO-HEX / PRO-HEX 2	53,26%
(HEX + GA) / HEX	110,27%
PRO-CIT / CIT	17,47%

Figura 42. Relação das áreas obtidas dos cromatogramas parciais dos íons-base referentes às fragrâncias. A área é proporcional à concentração da fragrância livre no *headspace*



Em geral, esse experimento faz um recorte dos primeiros 50 minutos de interação entre fragrâncias e pró-fragrâncias com uma matriz que representa a microbiota da pele humana, podendo comparar as concentrações relativas de fragrância no *headspace*. Fragrâncias livres apresentaram maiores concentrações no *headspace* em relação às pró-fragrâncias, o que pode ser atribuído pela ligação covalente entre GA e a fragrância. A microbiota da pele humana contém lipases capazes de hidrolisar a ligação covalente éster e, conforme o fazem, mais fragrâncias são liberadas na matriz líquida e, subsequente, para a fase gasosa e à fibra, de acordo com o equilíbrio termodinâmico das três fases.

Os resultados obtidos por HS-SPME-GC-MS estão apresentados nas Figuras 43-48: na parte superior o cromatograma total, na parte do meio o cromatograma parcial do íon selecionado e na parte inferior o espectro de massas da região de interesse selecionada do cromatograma total.

Figura 43. Os resultados obtidos para CIT por experimentos HS-SPME-GC-MS: a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 81,06988 Da; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 9,49-10,30 min)

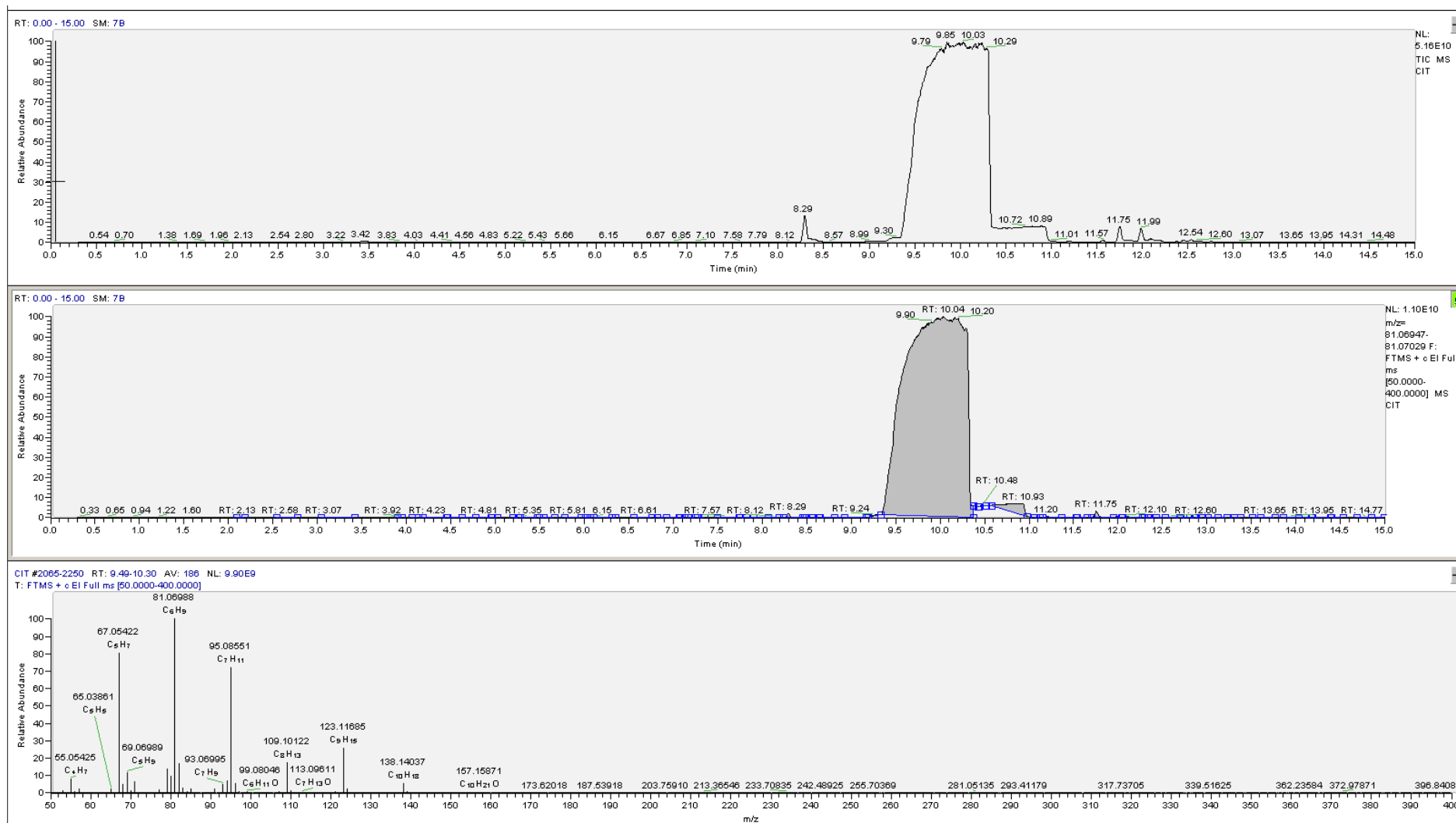


Figura 44. Os resultados obtidos para **PRO-CIT** por experimentos HS-SPME-GC-MS: a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 81,06990 Da; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 9,41-9,63 min)

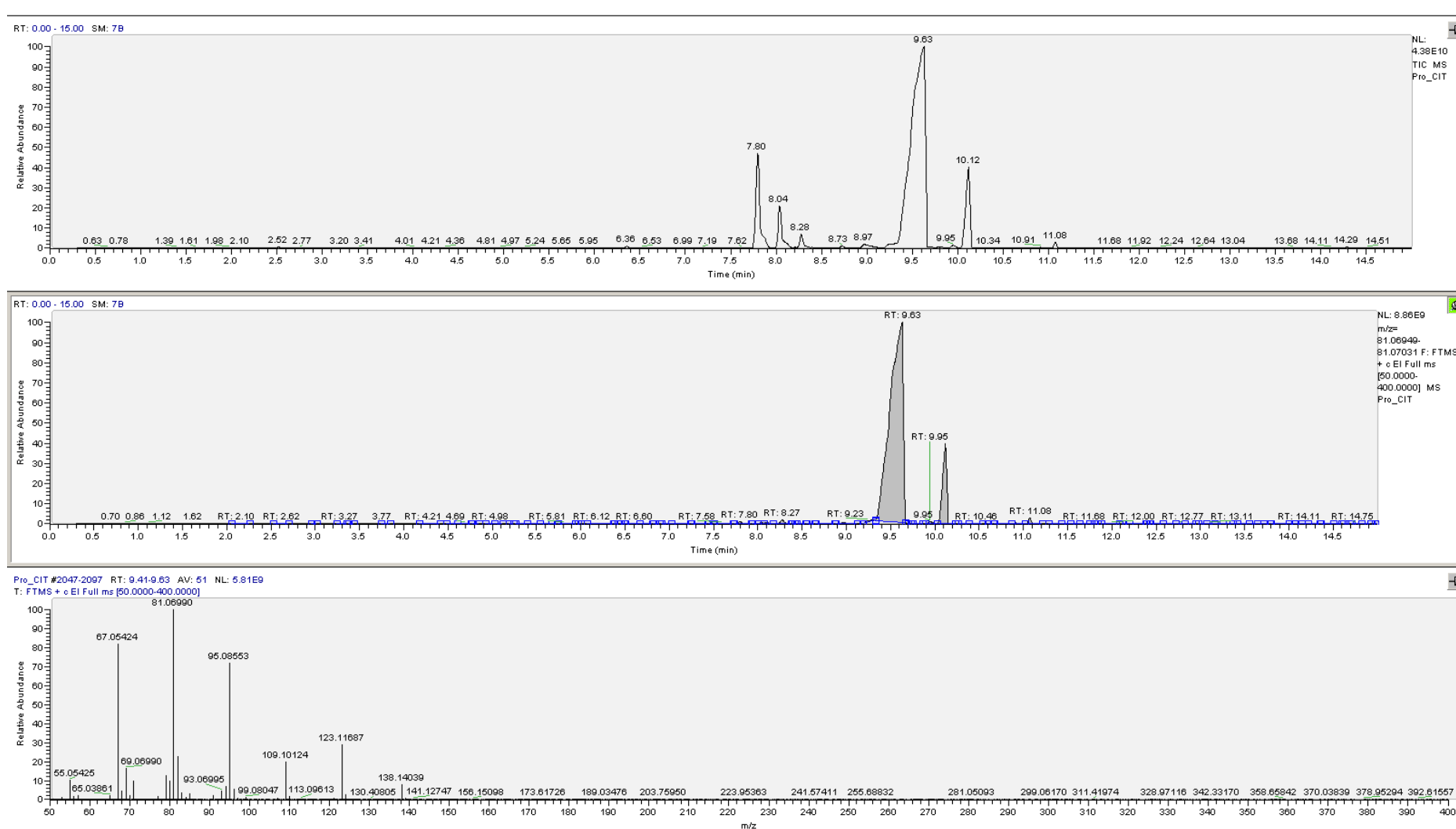


Figura 45. Os resultados obtidos para **HEX** por experimentos HS-SPME-GC-MS: a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05420 Da; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,26-4,58 min)

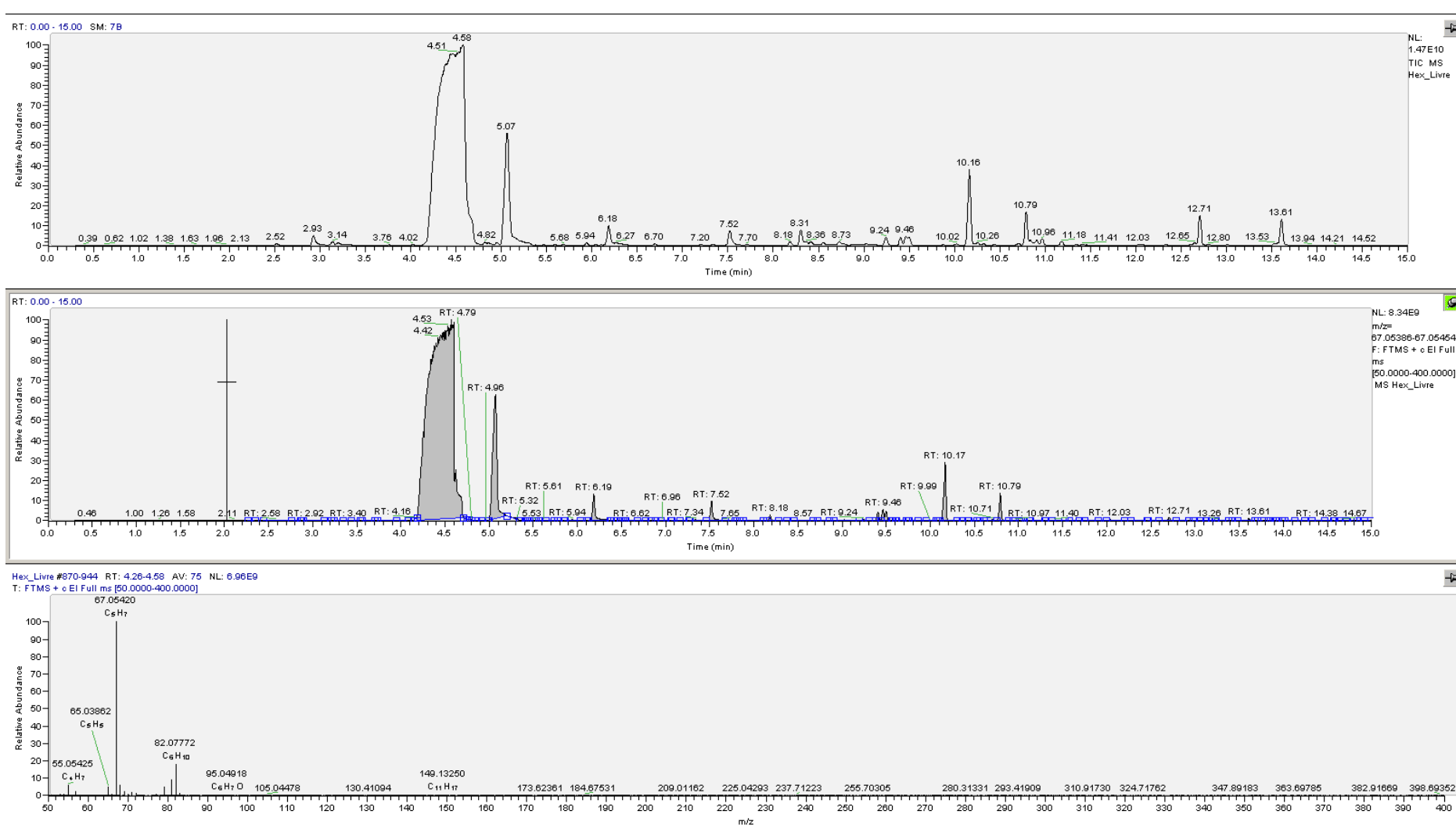


Figura 46. Os resultados obtidos para **PRO-HEX** por experimentos HS-SPME-GC-MS: a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05417 Da; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,22-4,33 min)

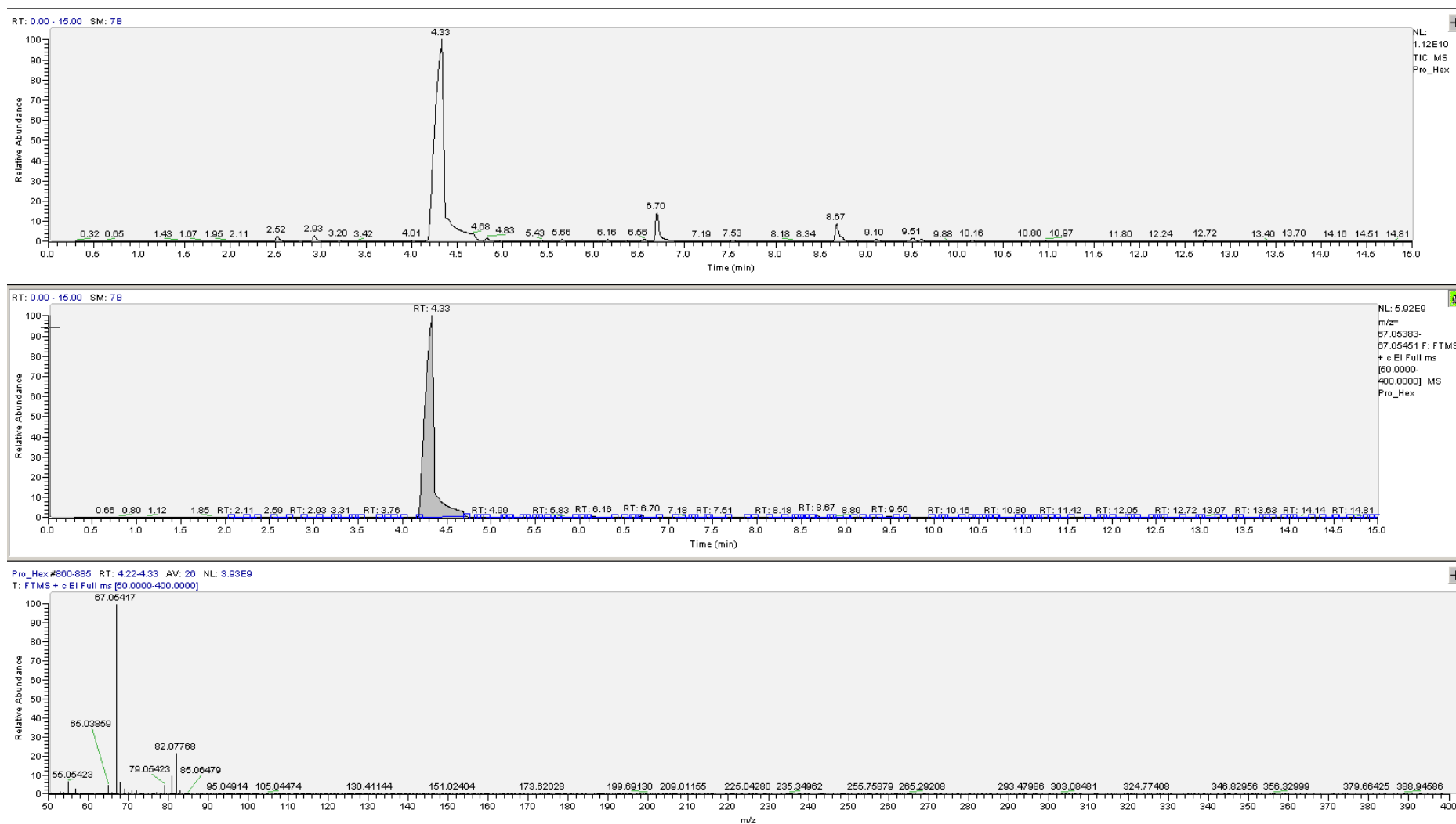


Figura 47. Os resultados obtidos para **PRO-HEX-2 (150 min)** por experimentos HS-SPME-GC-MS: a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05418 Da; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,25-4,39 min)

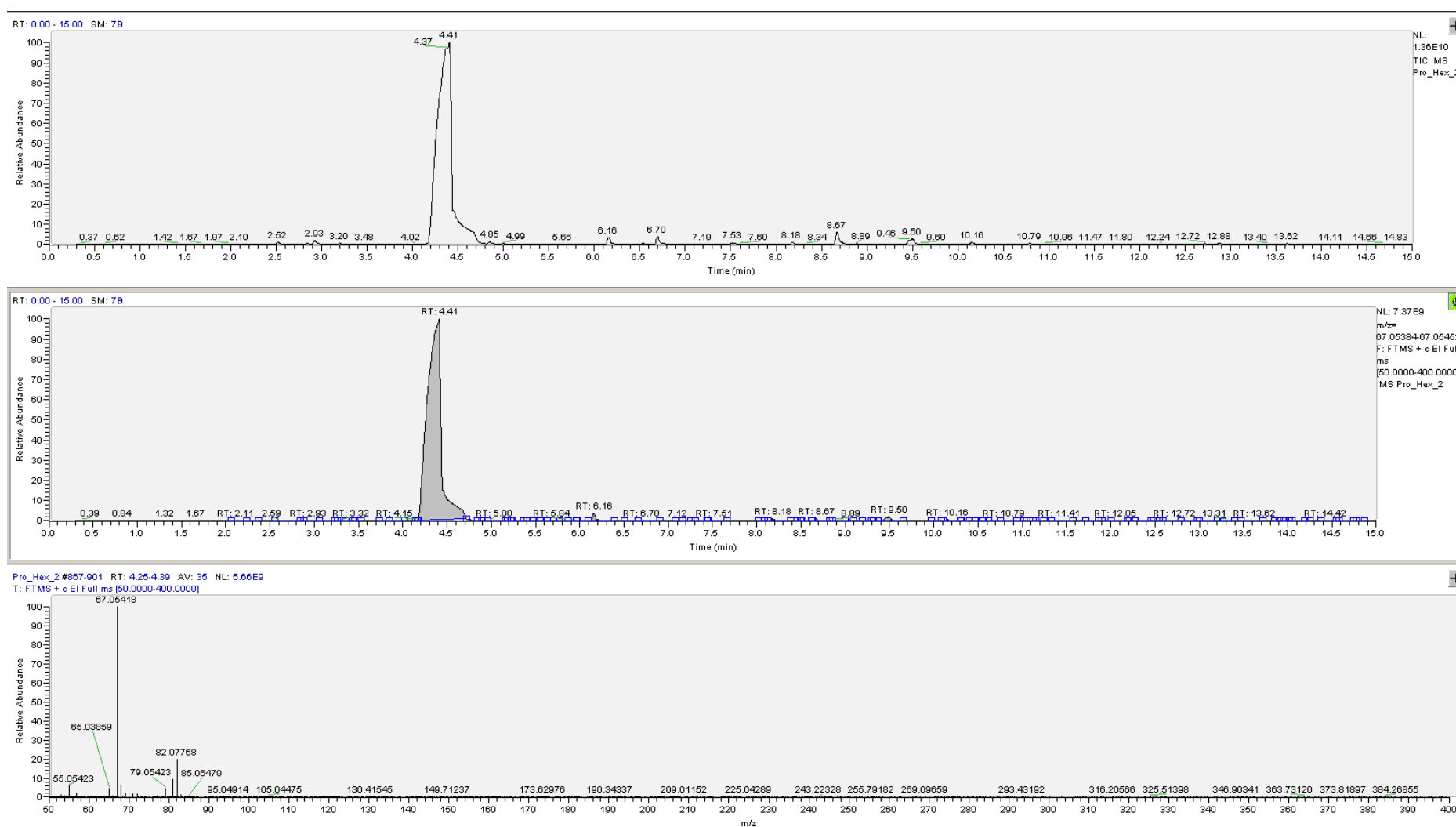
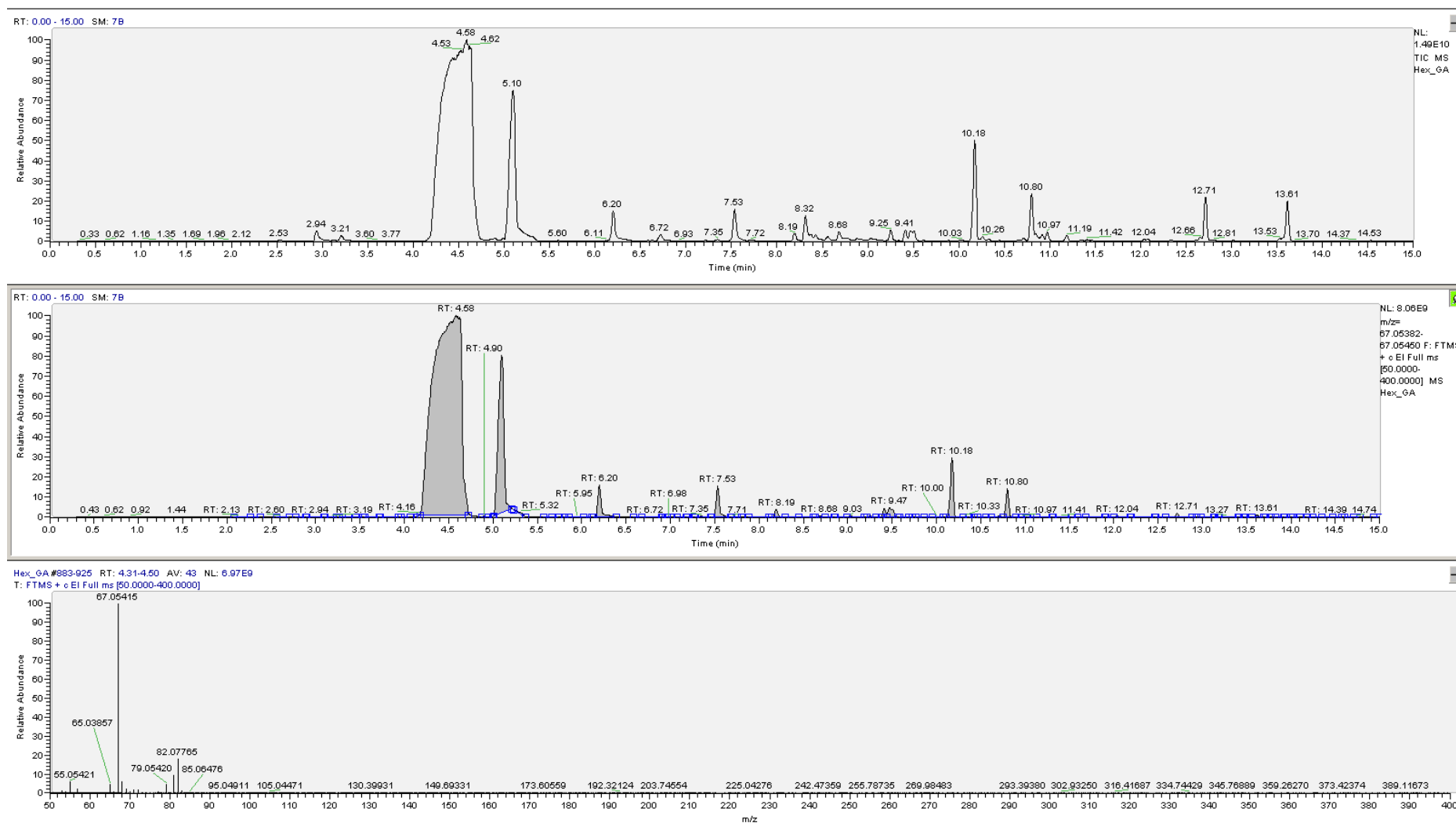


Figura 48. Os resultados obtidos para **HEX + GA** por experimentos HS-SPME-GC-MS: a figura superior representa o cromatograma total; figura do meio o cronograma parcial referente ao íon m/z 67,05415 Da; a figura inferior representa o espectro de massas (RT 4,31-4,50 min)



4.4.3. Painel sensorial

A proposta do painel sensorial foi verificar comparativamente a intensidade da fragrância de PRO-HEX 20% e HEX 7,25% sentida no braço (especificamente aplicada na parte superior do punho) ao longo do tempo. As porcentagens de fragrâncias analisadas indicam a diluição das amostras em DPG, conforme mostrado na Metodologia. Essas diluições foram aplicadas a 10 wt% em deo colônia. HEX 7,25% equivale a uma mesma concentração molar de PRO-HEX. Um dos objetivos de utilizar pró-fragrâncias é fazer com que a fragrância dure mais tempo na superfície aplicada, dessa forma, esse painel buscou entender o decaimento da intensidade da fragrância livre e da pró-fragrância na pele. É importante ressaltar que existe certa similaridade entre o perfil olfativo de PRO-HEX e HEX, especialmente quando aplicado na pele. HEX tem uma nota verde mais acentuada/intensa, enquanto PRO-HEX apresenta um perfil mais abafado/menos intenso. A fragrância HEX foi escolhida para o experimento, por ter um perfil olfativo mais distinguível do que CIT. A microbiota da pele possui enzimas lipases capazes de hidrolisar a ligação éster de PRO-HEX, liberando HEX ao longo do tempo. A fragrância sentida na pele pode ser atribuída por duas vias: pelo próprio cheiro de PRO-HEX e pela sua quebra, liberando HEX, como sugere o experimento em HS-SPME-GC-MS.

A Figura 49 apresenta a média e o erro padrão (n-1) dos 20 resultados coletados, de acordo com os valores obtidos na Tabela S1. A Figura 50 apresenta a porcentagem de votos de qual amostra é mais intensa em função do tempo, considerando um voto nulo caso o painelista atribua a mesma intensidade entre as amostras, de acordo com os valores da Tabela S2. A Tabela 13 apresenta os valores de média, erro (n-1) e *p*-valor obtido pelo Teste t de *Student* (bicaudal; variância diferente - verificar diferença estatística entre valores das amostras; não assume igualdade de variâncias) com três casas decimais, para cada instante.

A média dos resultados mostra que a pró-fragrância atingiu maiores valores de intensidade para 30, 60, 90 e 120 min; mostrando um benefício olfativo nesses tempos de observação. De acordo com o erro (n-1) de cada ponto, o único ponto incerto é para 30 min, já que o erro de PRO-HEX sobrepõe ao de HEX; dessa forma, para 30 minutos, pode-se considerar que não há diferença entre as intensidades.

Analizando os *p*-valores obtidos e assumindo um nível de significância de 0,05, o resultado é o mesmo: nos tempos 60, 90 e 120 min existe diferença entre os valores de

intensidade de PRO-HEX e HEX com 95% de confiança estatística; pelos p -valores serem inferiores a 0,05. O p -valor em 30 min é de 0,691, representando um valor maior e indicando que não há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula, ou seja, podendo não haver diferença entre a intensidade de PRO-HEX e HEX para 30 min. A Figura 48 apresenta um resultado bastante interessante, mostrando que a partir dos 90 min nenhum painelista atribuiu a intensidade de HEX maior que PRO-HEX. Em 60 min apenas 5% das respostas atribuíram HEX mais intenso que PRO-HEX. Em 30 min 55% votou PRO-HEX como mais intenso, contra 25% como HEX mais intenso (20% votaram mesma intensidade). O painel considerou um recorte dos primeiros 120 min, evidenciando o benefício de PRO-HEX com maiores intensidades sentidas a partir de 60 min, atingindo a proposta inicial do efeito *long lasting* e sua entrega mais controlada, que pode ser entendida como maiores valores na intensidade olfativa em tempos mais prolongados.

Tabela 13. Média e erro (n-1) de intensidade em função do tempo e p -valores (três casa decimais) pelo Teste t de *Student* do painel sensorial

Tempo (min)	HEX 7,25%	PRO-HEX 20%	Teste t de <i>Student</i> (p-valor)
0	9,1 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,6	0,000
30	3,9 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,4	0,691
60	1,8 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,4	0,007
90	1,0 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,3	0,000
120	0,5 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,3	0,000

Figura 49. Média e erro padrão (n-1) da intensidade de fragrância em função do tempo do painel sensorial

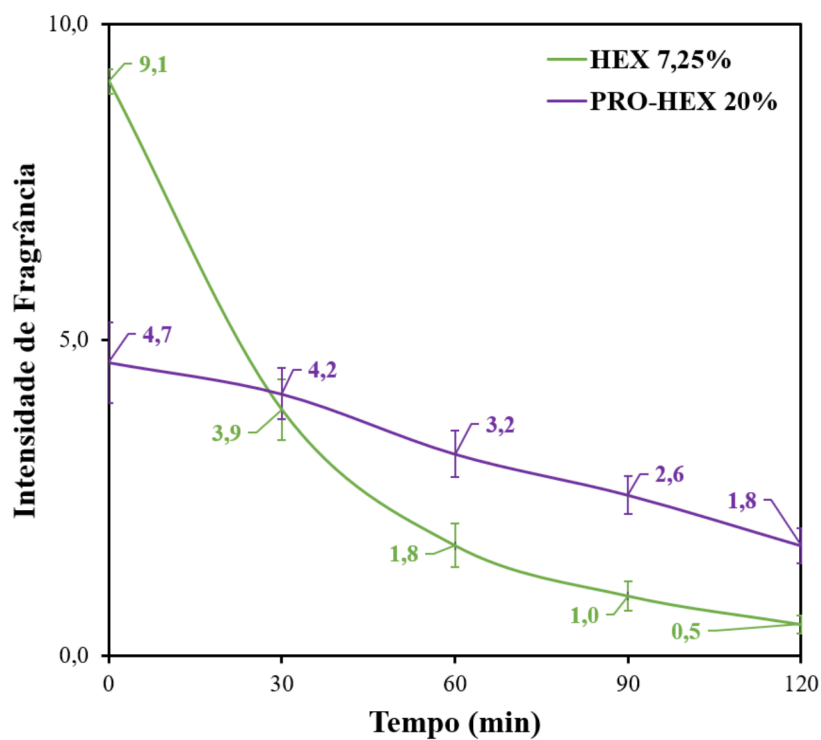
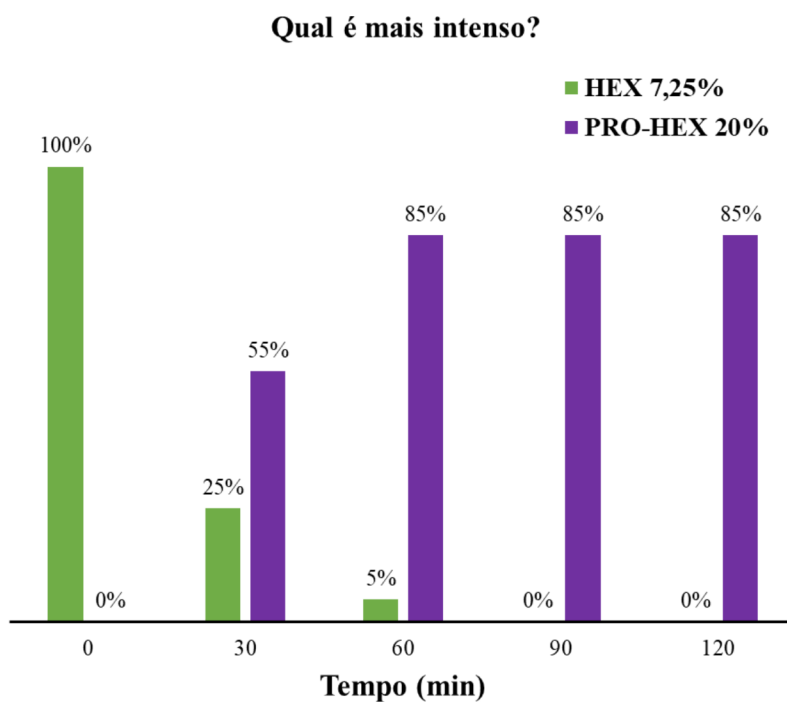


Figura 50. Porcentagem de votos para qual amostra é mais intensa em função do tempo do painel sensorial



5. CONCLUSÃO

Duas novas pró-fragrâncias (PRO-CIT e PRO-HEX) foram formadas a partir da esterificação mediada pela lipase EC 3.1.1.3, utilizando o ácido glicurônico (GA) como carreador, e o citronelol (CIT) e cis-3-hexen-1-ol (HEX) como fragrâncias. Os respectivos rendimentos destas reações foram 8,26% e 12,74%, para PRO-CIT e PRO-HEX. Por espectrometria de massas, os produtos tiveram íons-alvos confirmados: $(M+Na)^+$; $(2M+Na)^+$; $(M+Na-H_2O)^+$; íon com sódio menos a porção da fragrância; íon com sódio menos a porção da fragrância e uma molécula de água; com módulos de erro menores que 2 ppm. Já por espectroscopia no infravermelho uma evidente banda da carbonila-éster (1726 cm^{-1}) foi observada, confirmando a formação de pró-fragrâncias. Ainda, foi aplicada a ressonância magnética nuclear para caracterização das estruturas, com ênfase no desaparecimento de sinal $-CH_2-$ ligado à hidroxila da fragrância livre (1H 3,42 ppm ^{13}C 59,27 ppm para CIT; 1H 3,37 ppm ^{13}C 62,91 ppm para HEX) e presença de sinal $-CH_2-$ ligado ao oxigênio-éster da pró-fragrância (1H 4,09 ppm; ^{13}C 63,21 ppm para PRO-CIT; 1H 4,05 ppm; ^{13}C 66,00 ppm para PRO-HEX).

As pró-fragrâncias apresentaram uma boa liberação térmica em temperaturas de $139,62\text{ }^{\circ}C$ para CIT e $130,57\text{ }^{\circ}C$ para HEX, apresentando uma diferença de mais de $94\text{ }^{\circ}C$ da volatilização das fragrâncias livres. Comparando o máximo da derivada de massa em função da temperatura de CIT com PRO-CIT, há uma diferença de $62,91\text{ }^{\circ}C$, enquanto entre HEX e PRO-HEX a diferença é de $61,26\text{ }^{\circ}C$. A proximidade dos valores sugere uma relação entre a volatilidade da fragrância livre e sua energia de ligação com o carreador.

No experimento em HS-SPME-GC-MS a concentração relativa de fragrância livre no *headspace* foi menor para as pró-fragrâncias em relação às respectivas fragrâncias livres, considerando: mesmas concentrações, tempo de análise de 50 min e matriz sendo uma representação da microbiota do antebraço humano. A amostra contendo PRO-CIT apresentou apenas 17,47% da concentração de citronelol livre em *headspace* em relação à amostra contendo CIT; enquanto que para PRO-HEX foi 27,11% de cis-3-hexen-1-ol livre no *headspace* em relação à amostra contendo HEX. Mantendo a amostra PRO-HEX na matriz três vezes o tempo da primeira análise (150 min), a concentração de cis-3-hexen-1-ol livre no *headspace* quase dobrou. Esse experimento sugere que as pró-fragrâncias apresentaram um

efeito de retardar a volatilização de suas respectivas fragrâncias, a chamada entrega controlada.

Os resultados do painel sensorial indicam que existe um benefício de se utilizar uma pró-fragrância como PRO-HEX para melhorar o tempo de retenção da fragrância HEX em pele humana, o chamado efeito *long lasting*. Os resultados de intensidade de fragrância em função do tempo (até 120 minutos) mostram uma menor taxa de decaimento de intensidade de PRO-HEX em relação à HEX. Após 60 min, há diferença estatística indicando que PRO-HEX foi mais intensa que HEX, sendo que no último instante (120 min) PRO-HEX apresentou mais de três vezes mais intensidade olfativa. Além disso, nenhum painelista avaliou a amostra HEX como mais intensa que PRO-HEX após 90 min.

Por fim, pode-se concluir que as novas moléculas de pró-fragrâncias têm um potencial uso na indústria para prolongar o efeito olfativo de moléculas contendo hidroxila, como CIT e HEX.

6. REFERÊNCIAS

- [1] D. H. Pybus, C. S. Sell. *THE CHEMISTRY OF FRAGRANCES*. **The Royal Society of Chemistry**. Blackhorse Road, Letchworth, Herts SG6 IHN, UK, 1999.
- [2] T. Kuhnt, A. Herrmann, D. Benczedi, C. Weder and E. J. Foster. *Controlled fragrance release from galactose-based pro-fragrances*. **RSC Advances**. V. 4, p. 50882-50890, 2014.
- [3] M. J. B. Osés, M. A. Girame, H. Abe. *Ethoxylated ester-amine aldehyde condensation product as a fragrance precursor*. EP1857436A1. **Kao Corp SA**, 2007.
- [4] F. Flachsmann, J. P. Bachmann. *Preparation of 3-(2-alkoxycarbonyloxyphenyl)acrylic acid esters as precursors for the delivery of olfactory compounds*. WO2005077881A1. **Givaudan SA**, 2005.
- [5] A. Haetzelti, I. Levert, M. Materne, F. Pessel, A. Bauer. *Method for treating substrates with heat-activated perfumes*. DE102019111839A1. **Henkel AG and Co KGaA**, 2020.
- [6] B. Indradas, G. Virtucio, G. Womack. *Pro-fragrance compounds*. US20180016521A1. **Firmenich SA**, Switz., 2018.
- [7] A. Herrmann. *Konzept und Anwendungen in der funktionellen Parfumerie*. **Chem. Unserer Zeit**. V. 49, p. 36-47, 2015.
- [8] G. Y. Zhu, Z. B. Xiao, R. J. Zhou, F. P. Yi. *Effect of mesoporous silica nanoparticles-based nano-fragrance on the central nervous system*. **Advanced Materials Research**. V. 535-537, p. 440-445, 2012.
- [9] M. J. B. Osés, M. A. Girame, H. Abe. *Ethoxylated ester-amine aldehyde condensation product as a fragrance precursor*. EP1857436A1. **Kao Corp SA**, 2007.
- [10] A. Haetzelti, I. Levert, M. Materne, F. Pessel, A. Bauer. *Method for treating substrates with heat-activated perfumes*. DE102019111839A1. **Henkel AG and Co KGaA**, 2020.
- [11] Z. Lu, T. Zhang, J. Yang, J. Wang, J. Shen, X. Wang, Z. Xiao, Y. Niu, G. Liu, X. Zhang. *Effect of mesoporous silica nanoparticles-based nano-fragrance on the central nervous system*. **Engineering in Life Science**. V. 20, p. 535–540, 2020.
- [12] Z. Lu, J. Wang, L. Qu, G. Kan, T. Zhang, J. Shen, Y. Li, J. Yang, Y. Niu, Z. Xiao, Y. Li, X. Zhang. *Reactive mesoporous silica nanoparticles loaded with limonene for improving physical and mental health of mice at simulated microgravity condition*. **Bioactive Materials**. V. 5, p. 1127-1137, 2020.
- [13] M. A. Mariño, D. Cypriano, L. Tasic. *Agroindustry Residues as a Source for Cellulose Nanofibers Production*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 32, No. 4, p. 878-888, 2021.

- [14] M. Mariño, L. Lopes da Silva, N. Durán, L. Tasic. *Enhanced Materials from Nature: Nanocellulose from Citrus Waste*. **Molecules**. V. 20, p. 5908-5923, 2015.
- [15] C. L. B. Reis, E. Y. A Sousa, J. F. Serpa, R. C. Oliveira, J. C. S. Santos. *DESIGN OF IMMOBILIZED ENZYME BIOCATALYSTS: DRAWBACKS AND OPPORTUNITIES*. **Quim. Nova**. V. 42, No 7, p. 768-783, 2019.
- [16] S. Ulrich. *Growing Prospects of Dynamic Covalent Chemistry in Delivery Applications*. **Acc. Chem. Res.** V. 52, p. 510–519, 2019.
- [17] <http://www.thegoodscentcompany.com/>
- [18] E. Stoyanova, V. Mitova, P. Shestakova, A. Kowalczyk, G. Momekov, D. Momekova, A. Marcinkowski, N. Koseva. *Reversibly PEGylated nanocarrier for cisplatin delivery*. **Journal of Inorganic Biochemistry**. V. 120, p. 54-62, 2013.
- [19] X. Zhang , K. Achazi , D. Steinhilber, F. Kratz, J. Dervede , R. Haag. *A facile approach for dual-responsive prodrug nanogels based on dendritic polyglycerols with minimal leaching*. **Journal of Controlled Release**, V. 174, p. 209–216, 2014.
- [20] K. Bruyninckx, M. Dusselier. *Sustainable Chemistry Considerations for the Encapsulation of Volatile Compounds in Laundry-Type Applications*. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. V. 9, p. 8041-8054, 2019.
- [21] C. Ortiz, M. L. Ferreira, O Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, Á. B. Murcia, L. E. Briand, R. F. Lafuente. *Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst?*. **Catal. Sci. Technol. (Royal Society of Chemistry)**, V. 9. p. 2380–2420, 2019.
- [22] U. Numanoglu, T. Sen, N. Tarimci, M. Kartal, O. M. Y. Koo, H. Onyüksel. *Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: Linalool and benzyl acetate*. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** V. 8, p. 85, 2007.
- [23] M.A. F. O. Britto, C. S. N. Junior, H. F. Santos. *ANÁLISE ESTRUTURAL DE CICLODEXTRINAS: UM ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS TEÓRICOS CLÁSSICOS E QUÂNTICOS*. **Química Nova**. V. 27, No. 6, p. 882-888, 2004.
- [24] S. H. Bossmann, H. Wang (ed.). *Magnetic Nanomaterials, Applications in Catalysis and Life Sciences*. **The Royal Society of Chemistry**. CPI Group (UK) Ltd, Croydon, CR0 4YY, UK, 2017.
- [25] M. K. D. Manshadi, M. Saadat, M. Mohammadi, M. Shamsi, M. Dejam, R. Kamali, A. S. Nezhad. *Delivery of magnetic micro/nanoparticles and magnetic-based drug/cargo into arterial flow for targeted therapy*. **Drug Delivery**, V. 25:1, p. 1963-1973, 2018.
- [26] D. S. Parimi, Y. Gupta, S. Marpu, C. S. Bhatt, T. K. Bollu, A. K. Suresh. *Nanomagnet-facilitated pharmaco-compatibility for cancer diagnostics: Underlying risks and*

the emergence of ultrasmall nanomagnets. Journal of Pharmaceutical Analysis. V.12, 3, p. 365-379, 2022.

[27] B. Wang, L. Hu, T. J. Siahaan. *Drug Delivery, Principles and Applications (Second Edition).* **John Wiley & Sons, Inc.** Hoboken, New Jersey, 2016.

[28] J. Rautio, N. A. Meanwell, L. Di, M. J. Hageman. *The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. Nature Reviews, Drug Discovery.* V. 17 (8), p. 559–587, 2018.

[29] V. J. Stella, W. N. Charman, V. H. Naringrekar. *Prodrugs - Do they have advantages in clinical practice?.* **Drugs.** V. 29, p. 455-473, 1985.

[30] J. O. Miners. *Drug interactions involving aspirin (acetylsalicylic acid) and salicylic acid. Clinical Pharmacokinetics.* V. 17, p. 327-344, 1989.

[31] S. Schulz (ed.). *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II. Topics in Current Chemistry.* V. 240, 2005.

[32] B. Eberhard. *Terpenes - Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones.* **Wiley-VCH.** Weinheim, Alemanha, 2006.

[33] A. Hermann (ed.). *The Chemistry and Biology of Volatiles.* **John Wiley & Sons.** Chichester, UK, 2010.

[34] W. Paget, D. Reichlin, R. L. Snowden, E. C. Walborsky, C. Vial. *Fabric scenting method.* WO1995004809A1. **Firmenich SA**, 1995.

[35] G. R. Boyce, *Use of pyridoxal acetal salts as water-triggered profragrances.* WO2019147742A1. **Vitachem LLC**, 2019.

[36] K. L. Weeks, K. R. Rutkowski, A. A. M. Loyola and G. R. Boyce. *Utilization of pyridoxal acetal salts as water triggered, slow-release pro-fragrances.* **New J. Chem.** V. 42, p. 15538-15540, 2018.

[37] N. Armanino, J. Charpentier, F. Flachsmann, A. Goeke, M. Liniger, P. Kraft. *What's Hot, What's Not: The Trends of the Past 20 Years in the Chemistry of Odorants.* **Angew. Chem. Int.** V. 59, p. 16310– 16344, 2020.

[38] U. Huchel, R. Bunn, M. Materne, W. Faber, H. Smyrek, T. Pierik, F. Rittler, A. Bauer, M. Dischmann, S. Sauf, D. P. Amberger. *Lilial-surrogat.* WO2010105874A1. **Henkel Ag & Co. Kgaa**, 2010.

[39] F. Flachsmann, J. P. Bachmann. *3-(2-alkoxycarbonyloxy-phenyl) acrylic acid esters and their use as precursors for the delivery of olfactory compounds.* WO2005077881A1. **Givaudan Sa**, 2005.

[40] S. Derrer, F. Flachsmann, M. Stang, C. Plessis. *Applied Photochemistry – Light*

Controlled Perfume Release. **Chimia**. V. 61, p. 665 – 669, 2007.

[41] C. Fehr, J. Galindo. *Aldols by Michael Addition: Application of the retro-Michael Addition to the Slow Release of Enones*. **Helv. Chim. Acta**. V. 88, p. 3128 – 3136, 2005.

[42] C. Fehr, A. Struillou, J. Galindo. *Verbindungen zur kontrollierten freigabe aktiver molekülen*. EP1460994B1. **Firmenich SA**, 2001.

[43] C. S. Cardoso, L. Vitali. *Chitosan Versus Chitosan-Vanillin Modified: An Evaluation of the Competitive Adsorption of Five Emerging Contaminants*. **Water Air Soil Pollut**, V. 232:179, 2021.

[44] D. R. Perinellia, L. Fagioli, R. Campana, J. K.W. Lam, W. Baffone, G. F. Palmieri, L. Casettari, G. Bonacucin. *Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 117, p. 8-20, 2018.

[45] H. Chen, R. Zhao, J. Hu, Z. Wei, D. J. McClements, S. Liu, B. Li, Y. Li. *One-Step Dynamic Imine Chemistry for Preparation of Chitosan- Stabilized Emulsions Using a Natural Aldehyde: Acid Trigger Mechanism and Regulation and Gastric Delivery*. **J. Agric. Food Chem.** V. 68, p. 5412–5425, 2020.

[46] X. Jin, J. Wang, J. Bai. *Synthesis and antimicrobial activity of the Schiff base from chitosan and citral*. **Carbohydrate Research**. V. 344, p. 825–829, 2009.

[47] H. C.B. Paula, R. B.C. Silva, C. M. Santos, F. D.S. Dantas, R. C.M. Paula, L. R.M. Lima, E. F. Oliveira, E. A.T. Figueiredo, F. G.B. Dias. *Eco-friendly synthesis of an alkyl chitosan derivative*. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 163, p. 1591–1598, 2020.

[48] C. Katsimpouras, A. Bénarouche, D. Navarro, M. Karpusas, M. Dimarogona, J. Berrin, P. Christakopoulos, E. Topakas. *Enzymatic synthesis of model substrates recognized by glucuronoyl esterases from *Podospora anserina* and *Myceliophthora thermophila**. **Appl. Microbiol. Biotechnology**. V. 98, p. 5507–5516, 2014.

[49] B. Moreau, G. Lognay, C. Blecker, J. Destain, P. Gerbaux, F. Chéry, P. Rollin, M. Paquot, M. Marlier. *Chromatographic, Spectrometric and NMR Characterization of a New Set of Glucuronic Acid Esters Synthesized by Lipase*. **Biotechnol. Agron. Soc. Environment**. V. 11 (1), p. 9–17, 2007.

[50] C. Katsimpouras, A. Bénarouche, D. Navarro, M. Karpusas, M. Dimarogona, J. Berrin, P. Christakopoulos, E. Topakas. *Enzymatic synthesis of model substrates recognized by glucuronoyl esterases from *Podospora anserina* and *Myceliophthora thermophila**. **Appl Microbiol Biotechnol**, V. 98, p. 5507–5516, 2014.

[51] B. Moreau, G. Lognay, C. Blecker, J. Destain, P. Gerbaux, F. Chéry, P. Rollin, M. Paquot,

- M. Marlier. *Chromatographic, Spectrometric and NMR Characterization of a New Set of Glucuronic Acid Esters Synthesized by Lipase*. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, V. 11 (1), p. 9–17, 2007.
- [52] Błaszczyk, J.; Kielbasiński, P. Quarter of a Century after: A Glimpse at the Conformation and Mechanism of *Candida antarctica* Lipase B. **Crystals** **2020**, *10*, 404.
- [53] <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P41365@26-342@>
- [54] <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/l4777>
- [55] <https://www.rcsb.org/structure/1LBT>
- [56] <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P41365/entry>
- [57] J. Błaszczyk, P. Kielbasiński. *Quarter of a Century after: A Glimpse at the Conformation and Mechanism of Candida antarctica Lipase B*. **Crystals**. V. 10 (5), p. 404, 2020.
- [58] C. Ortiz, M. L. Ferreira, O. Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L. E. Briand, R. Fernandez-Lafuente. *Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst?*. **Catal. Sci. Technol. (Royal Society of Chemistry)**. V. 9, p. 2380–2420, 2019.
- [59] Stauch B, Fisher SJ, Cianci M. *Open and closed states of Candida antarctica lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation*. **J. Lipid Res**. V. 56 (12), p. 2348-2358, 2015.
- [60] B. D. Ribeiro, A. M. de Castro, M. A. Z. Coelho, D. M. G. Freire. *Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production*. **Enzyme Research**, V. 2011 (D 615803), 2011.
- [61] S.D. Dutcosky. *Análise sensorial de alimentos (5ª ed)*. **PUCPRESS / Ed. Uni. Champagnat**, V. 4. Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prédio da Administração - 6º andar; Curitiba/PR, 2019.
- [62] K.J.R. Rosman, P.D.P. Taylor. **Pure Appl. Chem**. V. 71, p. 1593-1607, 1999.
- [63] G. Audi, A. H. *The 1993 atomic mass evaluation*. **Wapstra Nucl. Phys A**. V. 565, p. 1-65, 1993.
- [64] G. Audi, A. H. *The 1995 update to the atomic mass evaluation*. **Wapstra Nucl. Phys A**. V. 595, p. 409-480, 1995.
- [65] <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1005932.html>
- [66] <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1007032.html>
- [67] <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C928961&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- [68] <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106229&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>

7. MATERIAL SUPLEMENTAR (APÊNDICES)

Figura S1. Parâmetros utilizados para obtenção dos espectros de NMR para CIT, PRO-CIT e GA

HSQC		¹ H	
Current Data Parameters		Current Data Parameters	
NAME fev15lmsH4		NAME fev15lmsH4	
EXPNO 3		EXPNO 1	
PROCNO 1		PROCNO 1	
F2 - Acquisition Parameters		F2 - Acquisition Parameters	
Date_ 20230216		Date_ 20230216	
Time 7.18 h		Time 6.11 h	
INSTRUM spect		INSTRUM spect	
PROBHD Z820201_0179 (		PROBHD Z820201_0179 (	
PULPROG hsqcedetgp		PULPROG zg30	
TD 2048		TD 32768	
SOLVENT DMSO		SOLVENT DMSO	
NS 12		NS 16	
DS 16		DS 0	
SWH 4807.692 Hz		SWH 8012.820 Hz	
FIDRES 4.695012 Hz		FIDRES 0.489064 Hz	
AQ 0.2129920 sec		AQ 2.0447233 sec	
RG 203		RG 57	
DW 104.000 usec		DW 62.400 usec	
DE 7.00 usec		DE 7.00 usec	
TE 298.4 K		TE 298.2 K	
CNST2 145.0000000		D1 1.00000000 sec	
D0 0.00000300 sec		TD0 1	
D1 1.00000000 sec		SFO1 400.1824713 MHz	
D4 0.00172414 sec		NUC1 1H	
D11 0.03000000 sec		P0 2.86 usec	
D16 0.00020000 sec		P1 8.58 usec	
D21 0.00345000 sec		PLW1 16.92300034 W	
IN0 0.00002760 sec			
TDav 1		F2 - Processing parameters	
ZGPTNS		SI 65536	
SFO1 400.1820009 MHz		SF 400.1800000 MHz	
NUC1 1H		WDW EM	
P1 8.58 usec		SSB 0	
P2 17.16 usec		LB 0.30 Hz	
PLW1 16.92300034 W		GB 0	
SFO2 100.6333910 MHz		PC 1.00	
NUC2 13C			
CPDPRG[2] garp			
P3 13.10 usec			
P4 26.20 usec			
PCPD2 80.00 usec			
PLW2 100.00000000 W			
PLW12 2.68140006 W			
GPZ1 80.00 %			
GPZ2 20.10 %			
P16 1000.00 usec			
F1 - Acquisition parameters			
TD 256			
SFO1 100.6334 MHz			
FIDRES 141.530792 Hz			
SW 180.019 ppm			
FnMODE Echo-Antiecho			
F2 - Processing parameters			
SI 4096			
SF 400.1800000 MHz			
WDW QSINE			
SSB 2			
LB 0 Hz			
GB 0			
PC 1.40			
F1 - Processing parameters			
SI 1024			
MC2 echo-antiecho			
SF 100.6253410 MHz			
WDW QSINE			
SSB 2			
LB 0 Hz			
GB 0			

Figura S2. Parâmetros utilizados para obtenção dos espectros de NMR para HEX e PRO-HEX

HSQC		¹ H	
Current Data Parameters		Current Data Parameters	
NAME ago08lmsH2		NAME ago08lmsH2	
EXPNO 5		EXPNO 1	
PROCNO 1		PROCNO 1	
F2 - Acquisition Parameters		F2 - Acquisition Parameters	
Date_ 20230809		Date_ 20230808	
Time 4.44 h		Time 22.45 h	
INSTRUM spect		INSTRUM spect	
PROBHD Z113652_0120 (		PROBHD Z113652_0120 (	
PULPROG hsqcedetgp		PULPROG zg30	
TD 2048		TD 65536	
SOLVENT DMSO		SOLVENT DMSO	
NS 6		NS 16	
DS 16		DS 0	
SWH 6996.269 Hz		SWH 10302.198 Hz	
FIDRES 6.832294 Hz		FIDRES 0.314398 Hz	
AQ 0.1463637 sec		AQ 3.1806805 sec	
RG 203		RG 80.6	
DW 71.467 usec		DW 48.533 usec	
DE 10.00 usec		DE 10.00 usec	
TE 298.2 K		TE 298.1 K	
CNST2 145.0000000		D1 1.00000000 sec	
D0 0.00000300 sec		TD0 1	
D1 2.00000000 sec		SFO1 499.8730869 MHz	
D4 0.00172414 sec		NUC1 1H	
D11 0.03000000 sec		P1 12.40 usec	
D13 0.00000400 sec		PLW1 27.00000000 W	
D16 0.00020000 sec			
D21 0.00344828 sec		F2 - Processing parameters	
IN0 0.00001810 sec		SI 65536	
TDav 1		SF 499.8700018 MHz	
ZGPTNS		WDW EM	
SFO1 499.8729992 MHz		SSB 0	
NUC1 1H		LB 0.30 Hz	
P1 12.40 usec		GB 0	
P2 24.80 usec		PC 1.00	
P28 0 usec			
PLW1 27.00000000 W			
SFO2 125.7049802 MHz			
NUC2 13C			
CPDPRG[2] garp			
P3 10.00 usec			
P4 20.00 usec			
PCPD2 70.00 usec			
PLW2 88.00000000 W			
PLW12 1.79589999 W			
GPZ1 80.00 %			
GPZ2 20.10 %			
P16 1000.00 usec			
F1 - Acquisition parameters			
TD 256			
SFO1 125.705 MHz			
FIDRES 215.814911 Hz			
SW 219.755 ppm			
FnMODE Echo-Antiecho			
F2 - Processing parameters			
SI 4096			
SF 499.8699972 MHz			
WDW QSINE			
SSB 2			
LB 0 Hz			
GB 0			
PC 1.40			
F1 - Processing parameters			
SI 1024			
MC2 echo-antiecho			
SF 125.6921974 MHz			
WDW QSINE			
SSB 2			
LB 0 Hz			
GB 0			

Figura S3. Parâmetros utilizados para obtenção dos espectros de NMR-HMBC de PRO-CIT e PRO-HEX

HMBC – PRO-CIT				HMBC – PRO-HEX			
Current Data Parameters				Current Data Parameters			
NAME	fev15lmsH4	P3	13.10 usec	NAME	ago08lmsH2	P3	10.00 usec
EXPNO	4	PLW2	100.00000000 W	EXPNO	6	PLW2	88.00000000 W
PROCNO	1	GPZ1	SMSQ10.100	PROCNO	1	GPZ1	SMSQ10.100
F2 - Acquisition Parameters				F2 - Acquisition Parameters			
Date_	20230216	GPZ2	50.00 %	Date_	20230809	GPZ2	50.00 %
Time	8.25 h	GPZ3	SMSQ10.100	Time	5.41 h	GPZ3	SMSQ10.100
INSTRUM	spect	P16	1000.00 usec	INSTRUM	spect	P16	1000.00 usec
PROBHD	Z820201_0179 (	F1 - Acquisition parameters		PROBHD	Z113652_0120 (	F1 - Acquisition parameters	
PULPROG	hmbcgp1pndqf	TD	256	PULPROG	hmbcgp1pndqf	TD	256
TD	2048	SF01	100.6361 MHz	TD	2048	SF01	125.7062 MHz
SOLVENT	DMSO	FIDRES	172.842926 Hz	SOLVENT	DMSO	FIDRES	235.316269 Hz
NS	12	SW	219.841 ppm	NS	8	SW	239.610 ppm
DS	16	FnMODE	QF	DS	16	FnMODE	QF
SWH	4807.692 Hz	F2 - Processing parameters		SWH	6996.269 Hz	F2 - Processing parameters	
FIDRES	4.695012 Hz	SI	4096	FIDRES	6.832294 Hz	SI	4096
AQ	0.2129920 sec	SF	400.1800000 MHz	AQ	0.1463637 sec	SF	499.8700486 MHz
RG	203	WDW	SINE	RG	203	WDW	SINE
DW	104.000 usec	SSB	0	DW	71.467 usec	SSB	0
DE	7.00 usec	LB	0 Hz	DE	10.00 usec	LB	0 Hz
TE	297.9 K	GB	0	TE	298.2 K	GB	0
CNST2	145.0000000	PC	1.40	CNST2	145.0000000	PC	1.40
CNST13	8.0000000	F1 - Processing parameters		CNST13	8.0000000	F1 - Processing parameters	
D0	0.00000300 sec	SI	1024	D0	0.00000300 sec	SI	1024
D1	1.00000000 sec	MC2	QF	D1	1.42012799 sec	MC2	QF
D2	0.00344828 sec	SF	100.6253410 MHz	D2	0.00344828 sec	SF	125.6924110 MHz
D6	0.06250000 sec	WDW	SINE	D6	0.06250000 sec	WDW	SINE
D16	0.00020000 sec	SSB	0	D16	0.00020000 sec	SSB	0
IN0	0.00002260 sec	LB	0 Hz	IN0	0.00001660 sec	LB	0 Hz
TDav	1	GB	0	TDav	1	GB	0
SF01	400.1820009 MHz			SF01	499.8729992 MHz		
NUC1	1H			NUC1	1H		
P1	8.58 usec			P1	12.40 usec		
P2	17.16 usec			P2	24.80 usec		
PLW1	16.92300034 W			PLW1	27.00000000 W		
SFO2	100.6361079 MHz			SFO2	125.7062372 MHz		
NUC2	13C			NUC2	13C		

Figura S4. Espectro de massas de CIT obtido no ObriTrap-MS. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,09-0,19

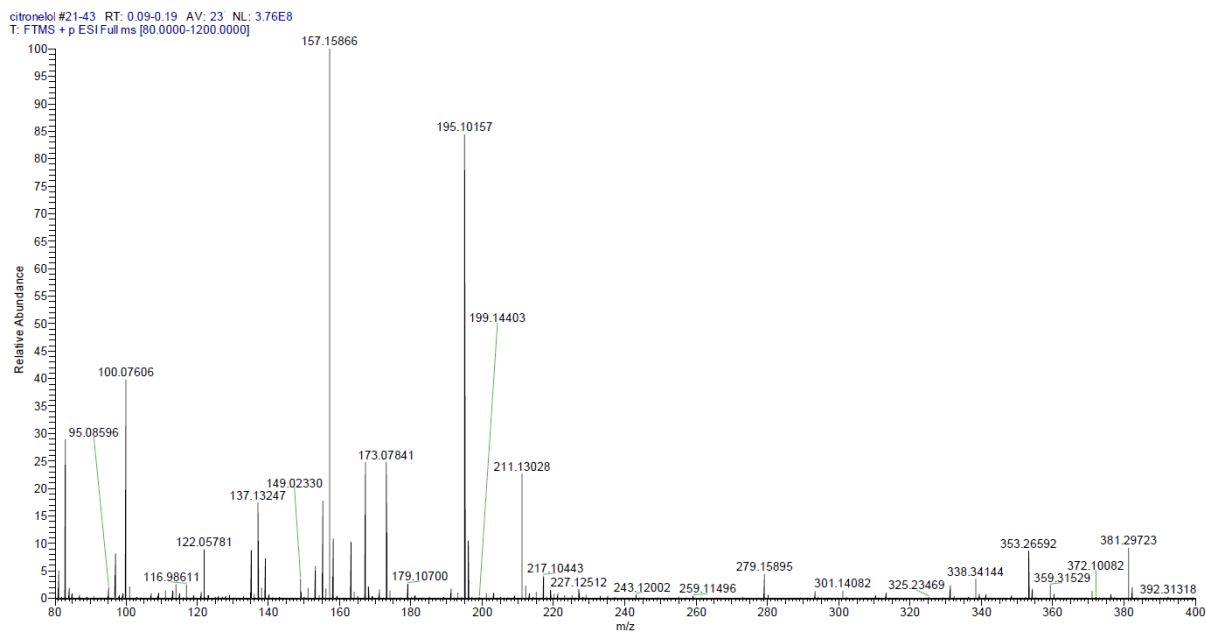


Figura S5. Comparação entre espectro real (superior) e simulado (inferior) de CIT. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,05-0,93

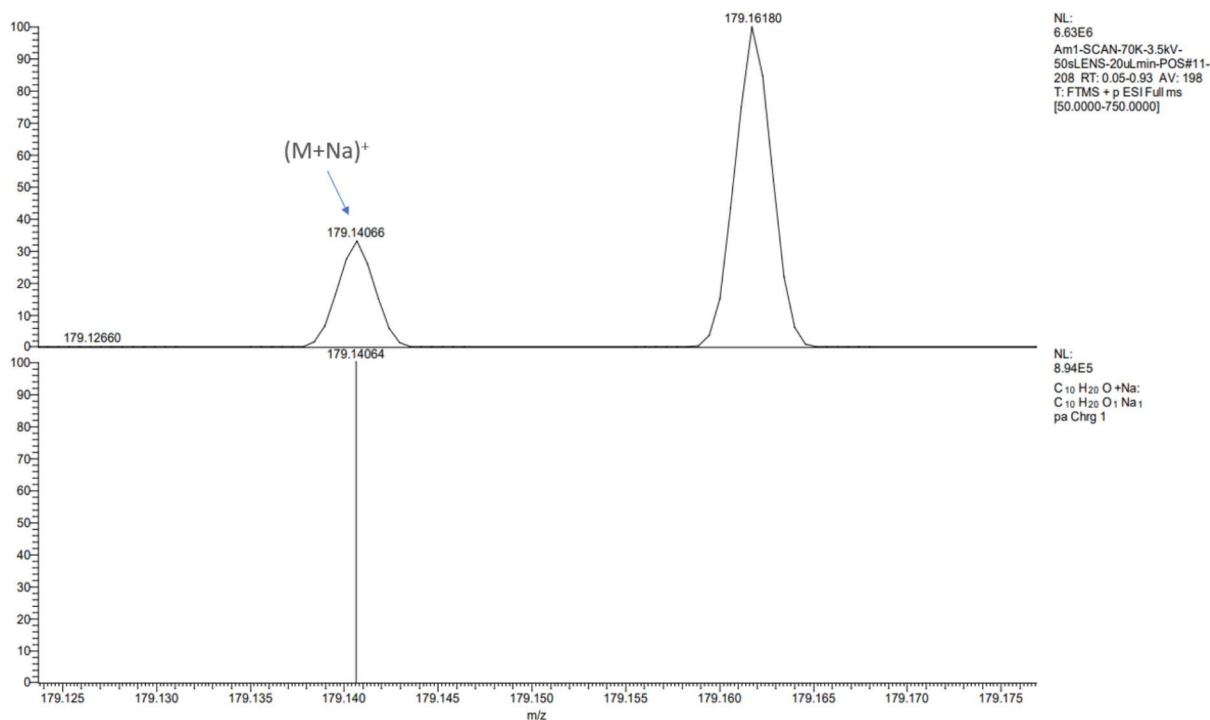


Figura S6. Espectro de massas de GA obtido no ObriTrap-MS. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,20-0,80

Am2-SCAN-70K-3.5kV-50sLENS-20uLmin-POS #45-179 RT: 0.20-0.80 AV: 135 NL: 3.46E8
T: FTMS + p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

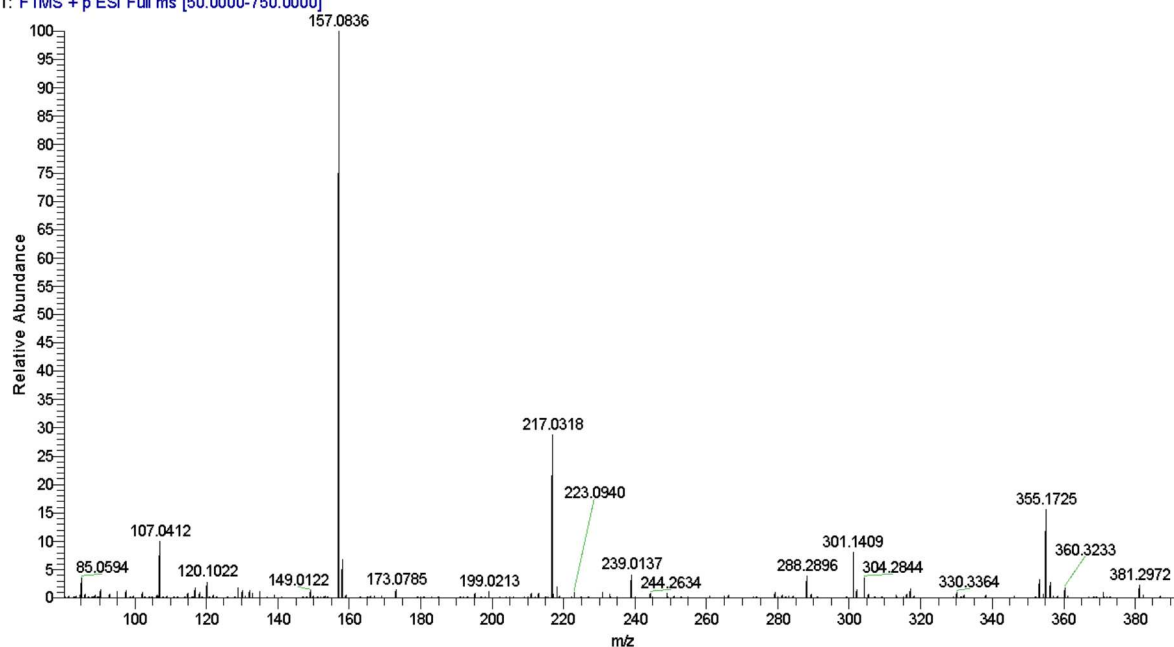


Figura S7. Comparação entre espectro real (superior) e simulado (inferior) e simulado de **GA**. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,07-0,91

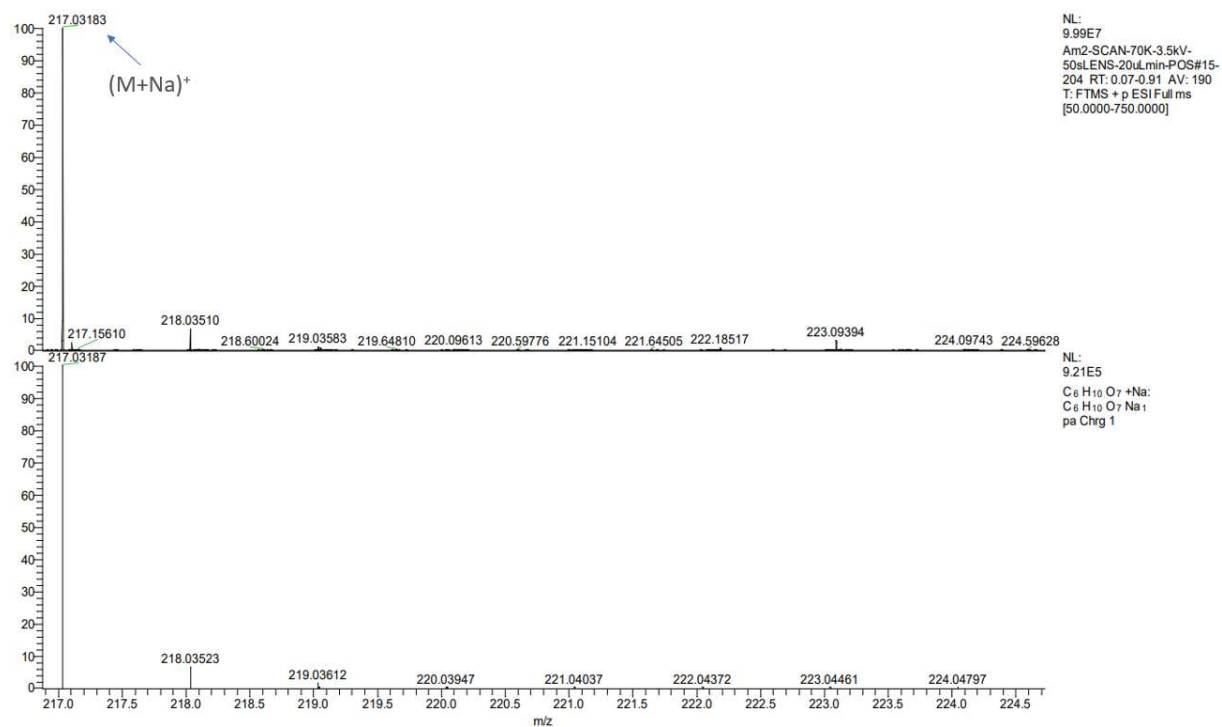


Figura S8. Espectro de massas de **HEX** obtido no ObriTrap-MS. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,30-0,34

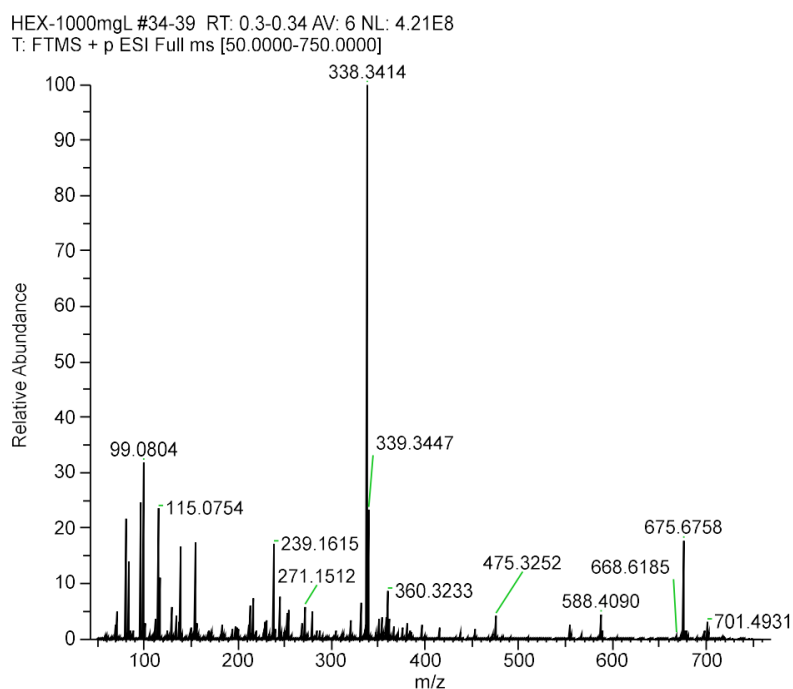


Figura S9. Comparação entre espectro obtido (superior) e simulado (inferior) de **HEX**. Modo *full scan*, campo positivo, resolução 70.000, tensão de cone 3,5 kV e 50 V SLens. RT: 0,25-0,32

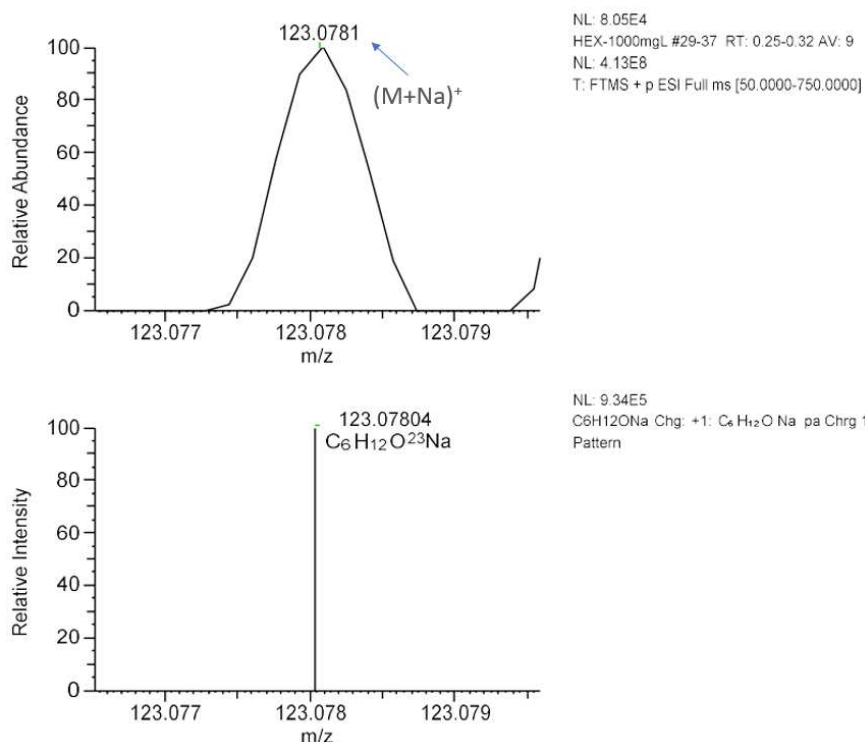


Figura S10. Atribuição de picos do espectro de 1H NMR da amostra **PRO-CIT** diluída em $DMSO-d_6$. Valores em ppm do deslocamento químico de 1H

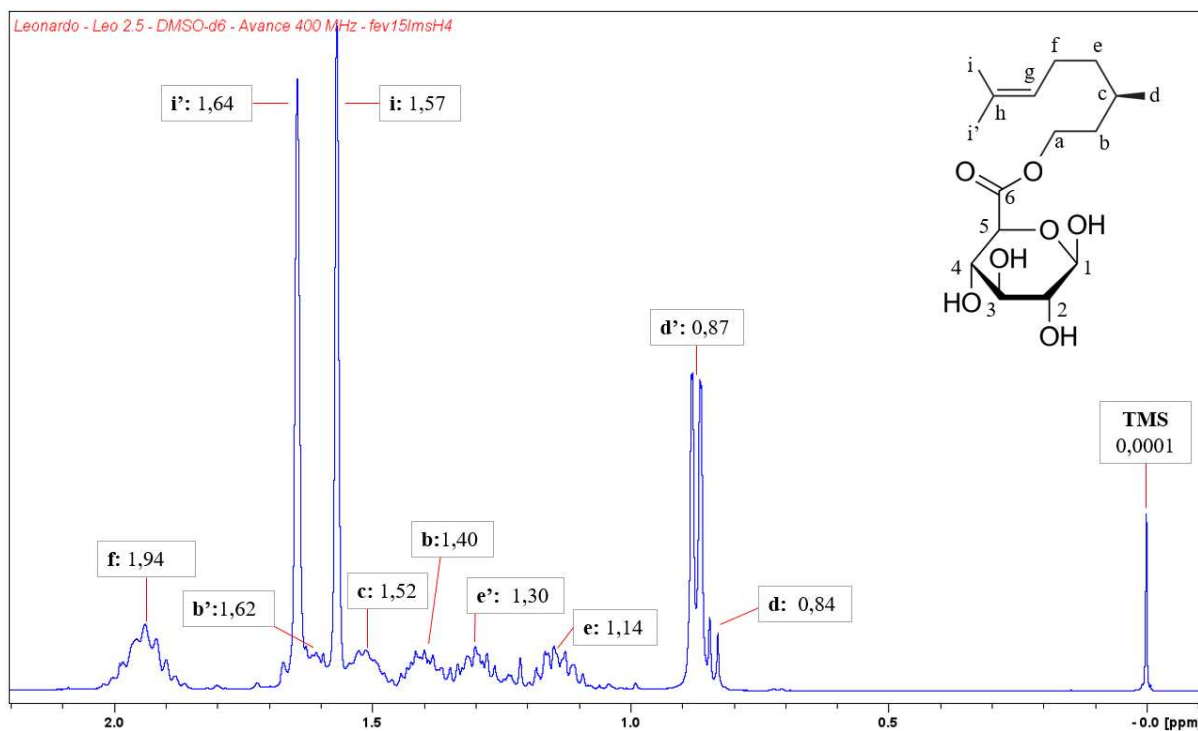


Figura S11. Atribuição dos picos do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-CIT** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

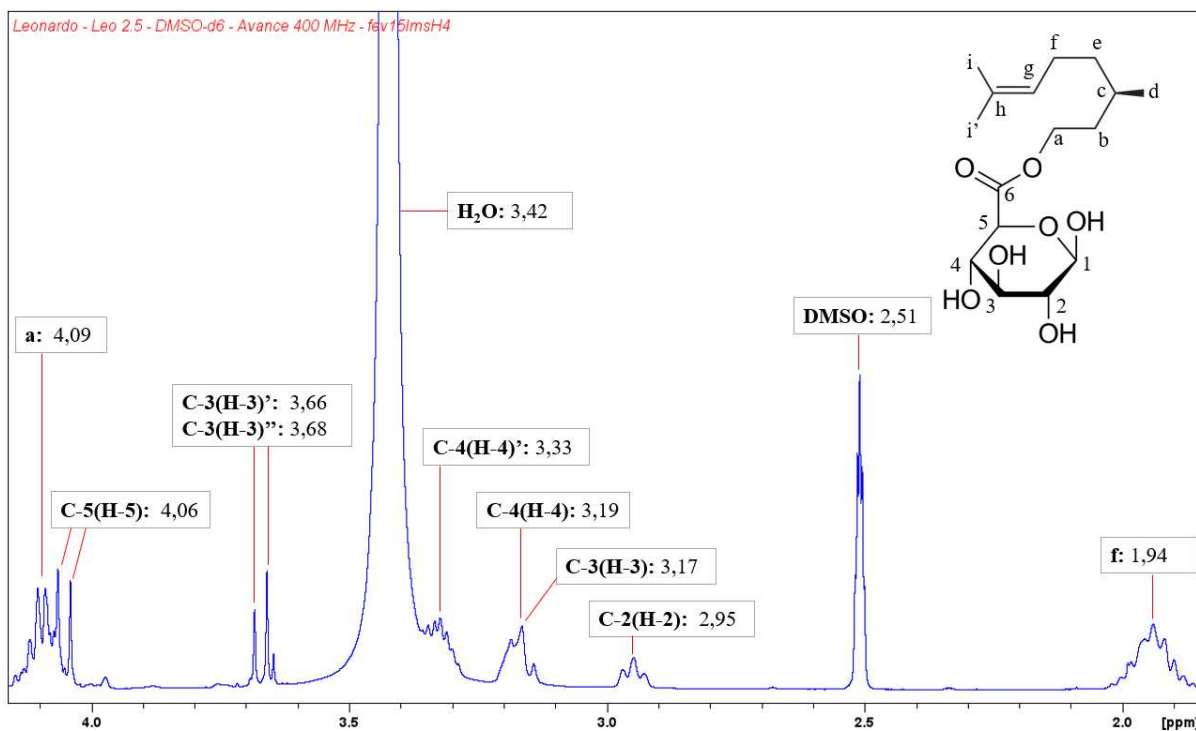


Figura S12. Atribuição dos picos espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-CIT** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

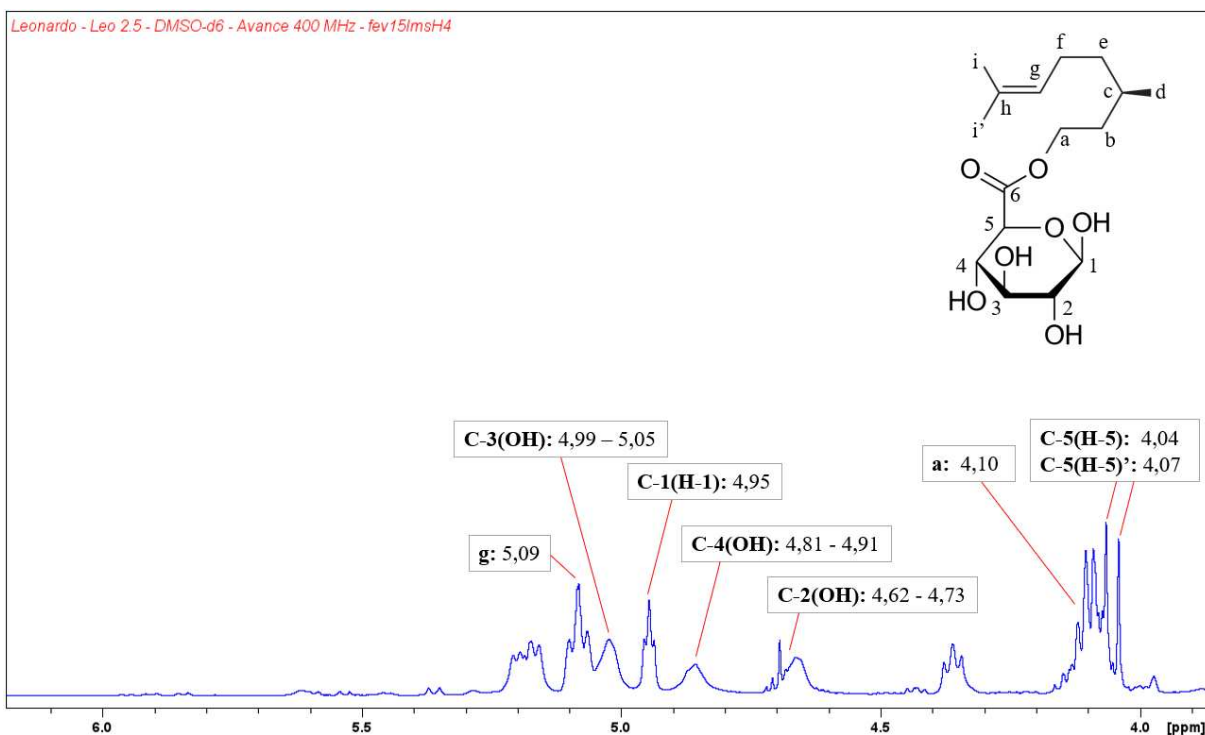


Figura S13. Atribuição dos picos do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-CIT** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

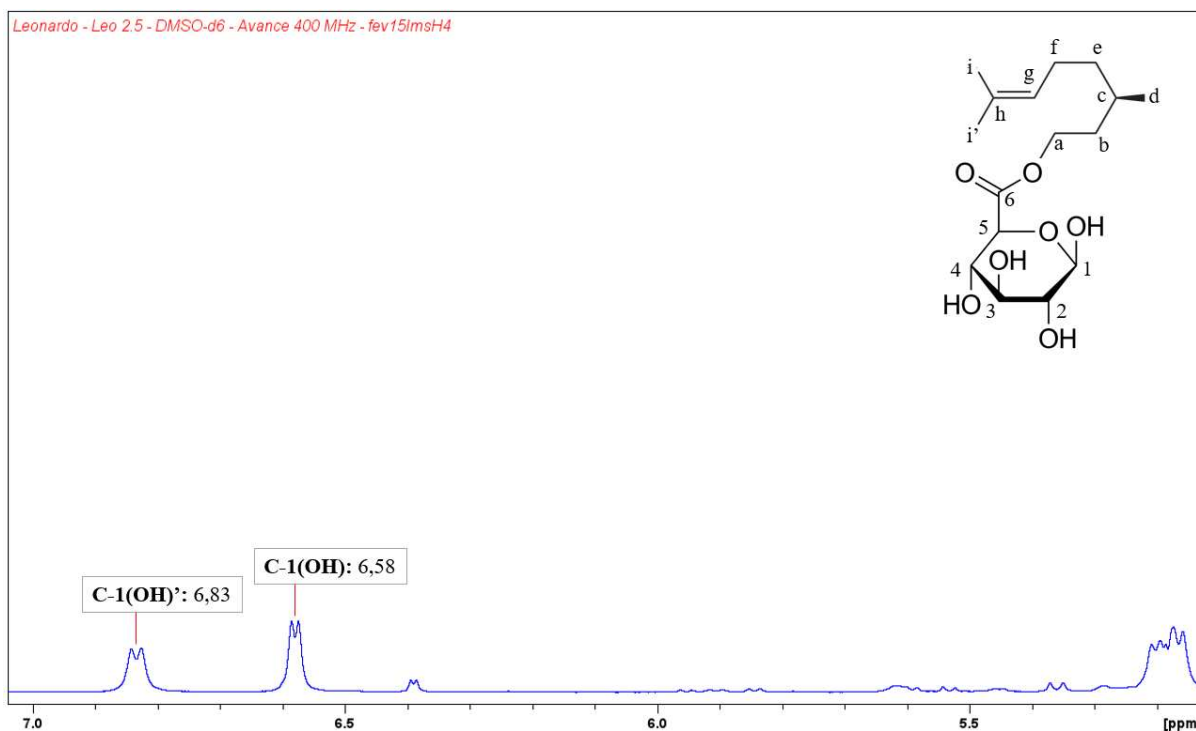


Figura S14. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra **PRO-CIT** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , respectivamente

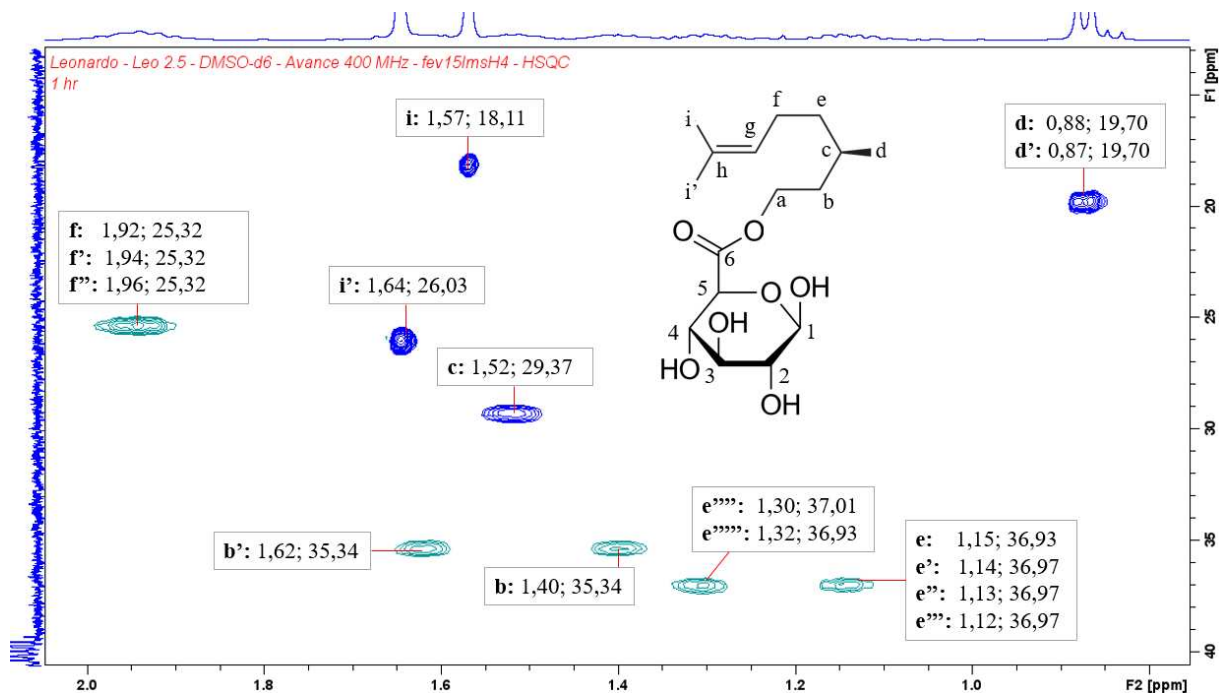


Figura S15. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra PRO-CIT diluída em DMSO-d₆. Valores em ppm do deslocamento químico de ¹H e ¹³C, respectivamente

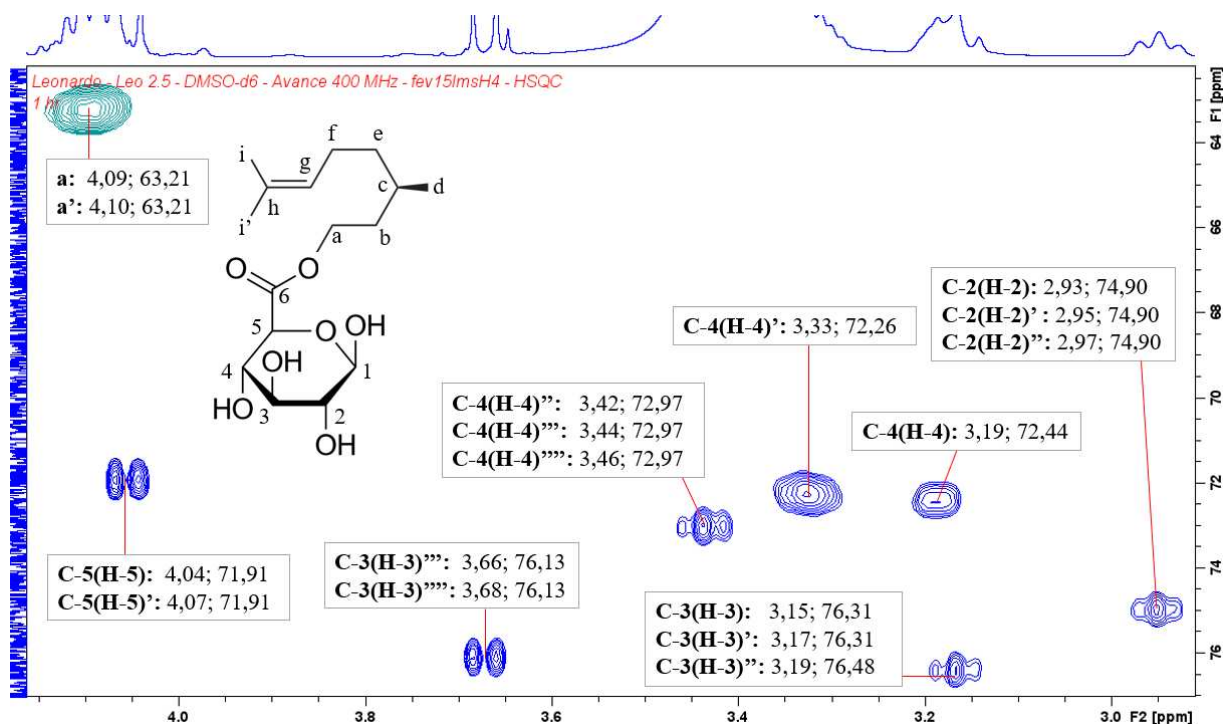


Figura S16. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra PRO-CIT diluída em DMSO-d₆. Valores em ppm do deslocamento químico de ¹H e ¹³C, respectivamente

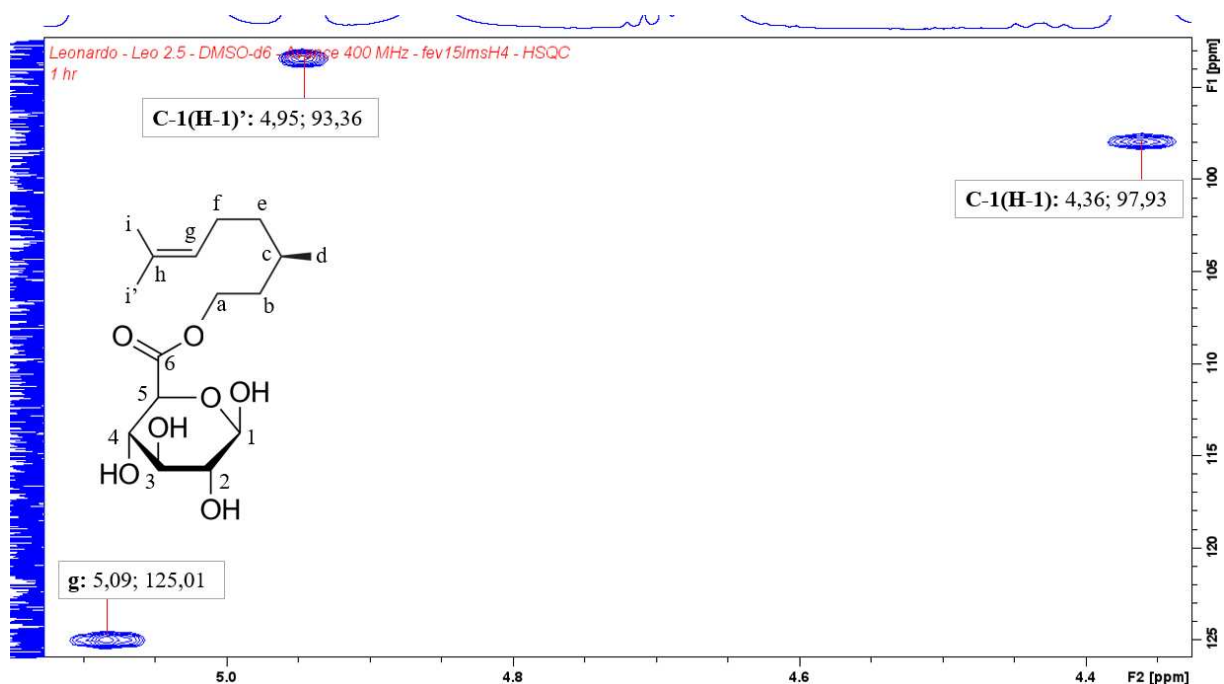


Figura S17. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HMBC da amostra PRO-CIT diluída em DMSO-d₆. Valores em ppm do deslocamento químico de ¹H e ¹³C, respectivamente

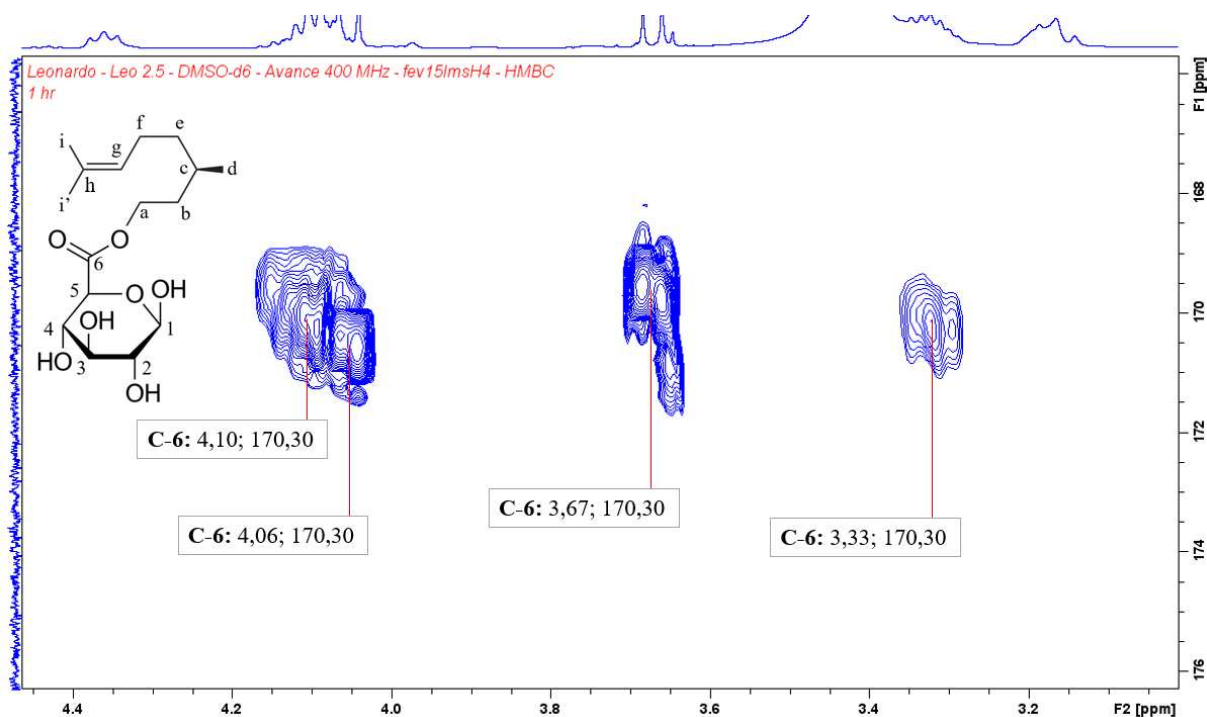


Figura S18. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HMBC da amostra PRO-CIT diluída em DMSO-d₆. Valores em ppm do deslocamento químico de ¹H e ¹³C, respectivamente

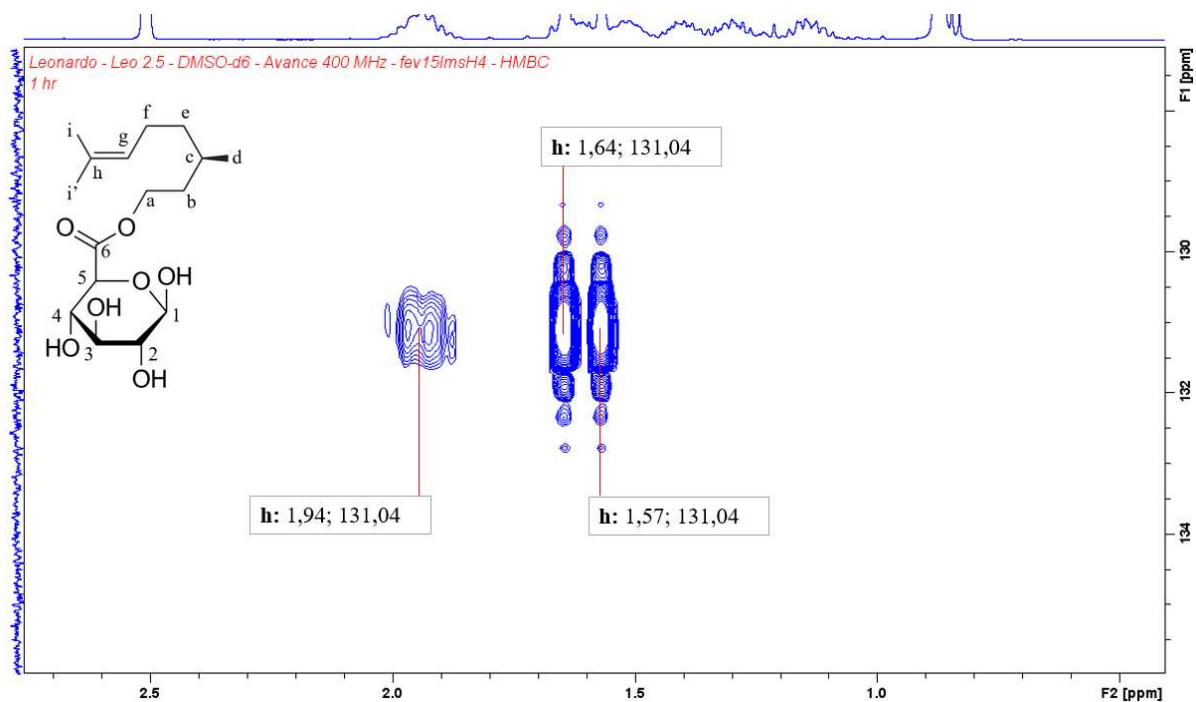


Figura S19. Atribuição dos picos do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

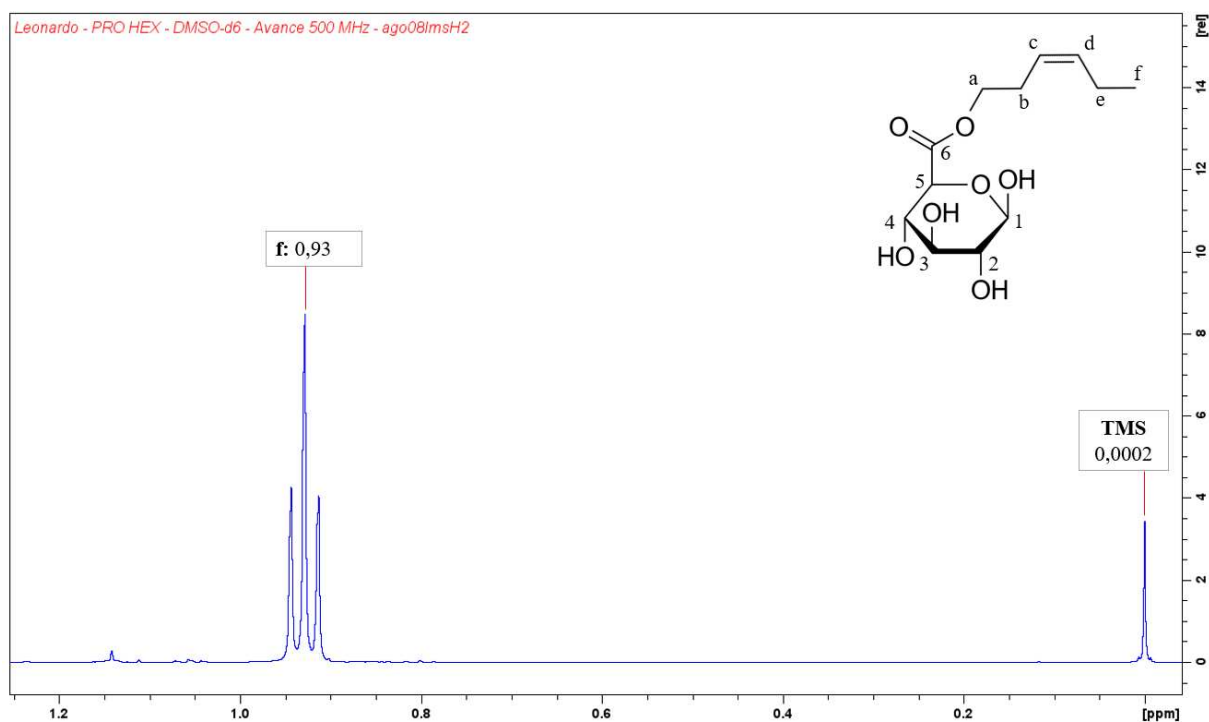


Figura 20. Atribuição dos picos do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

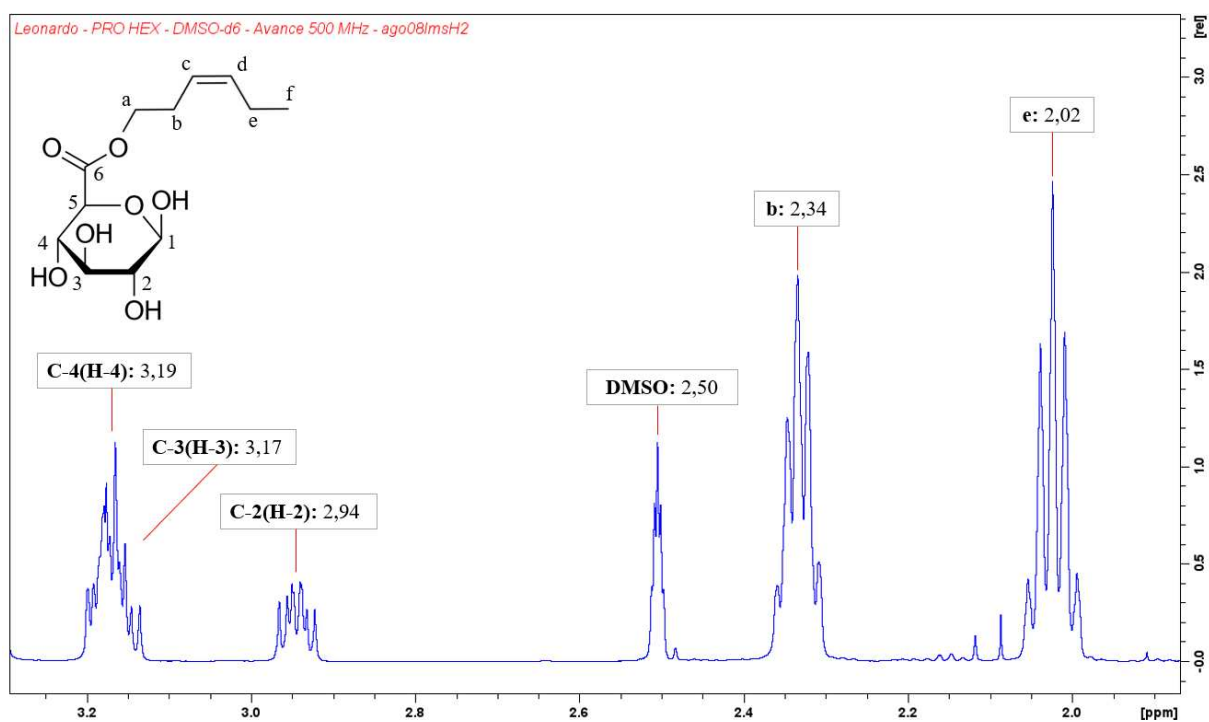


Figura S21. Atribuição dos picos do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

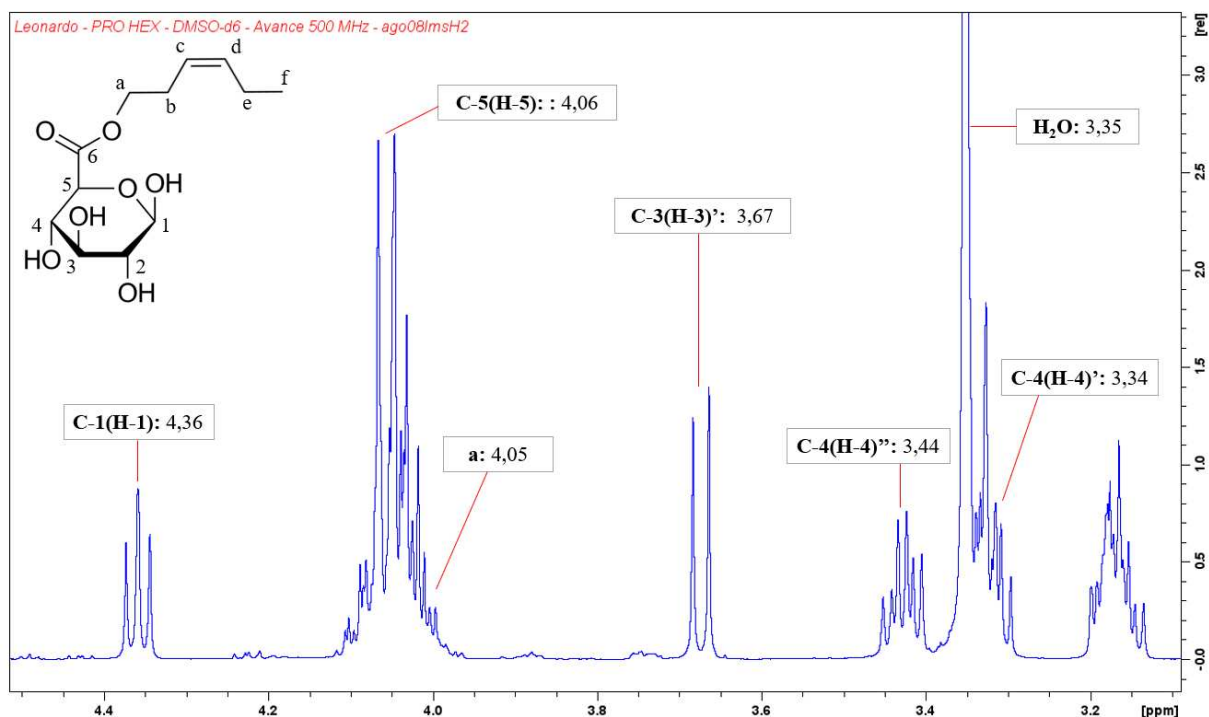


Figura S22. Atribuição dos picos do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

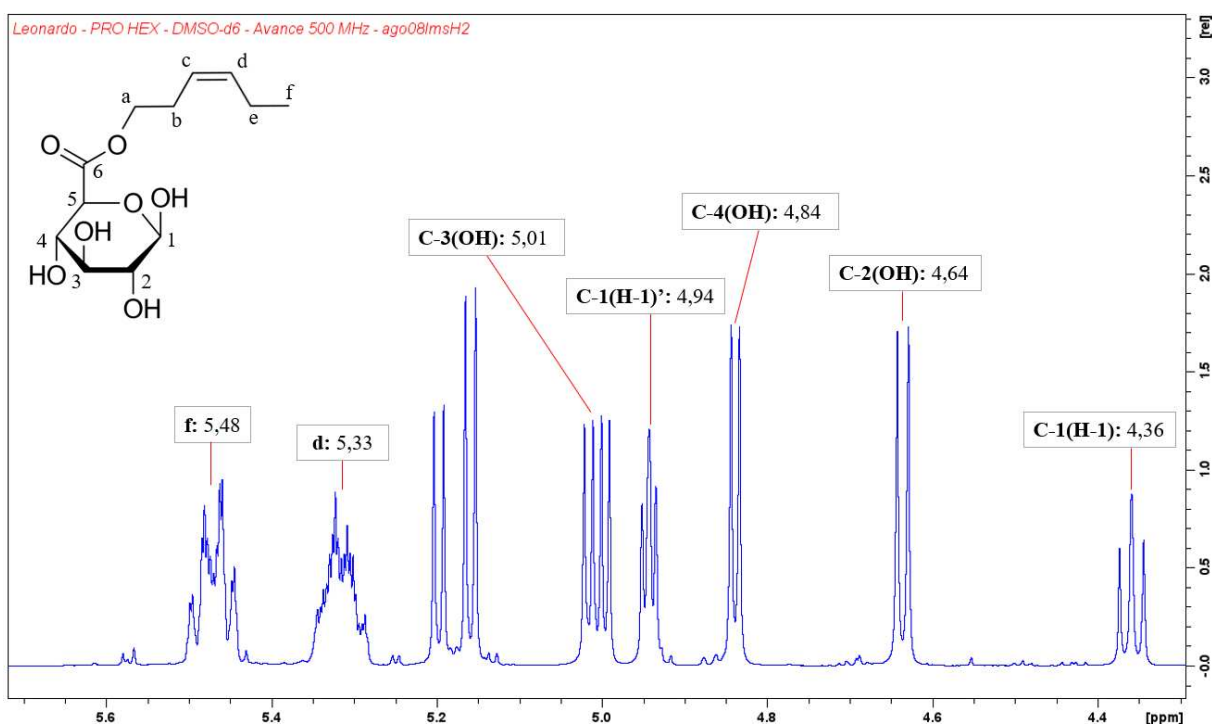


Figura S23. Atribuição dos picos do espectro de ^1H NMR da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H

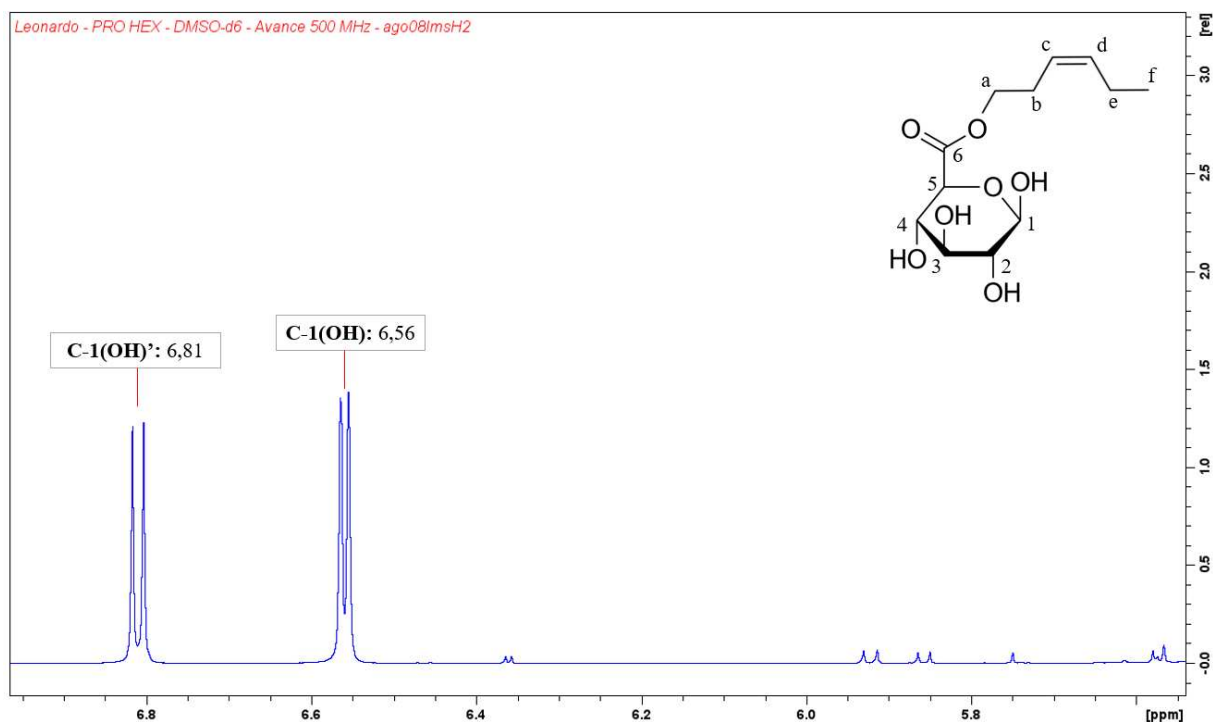


Figura S24. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO-d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , respectivamente

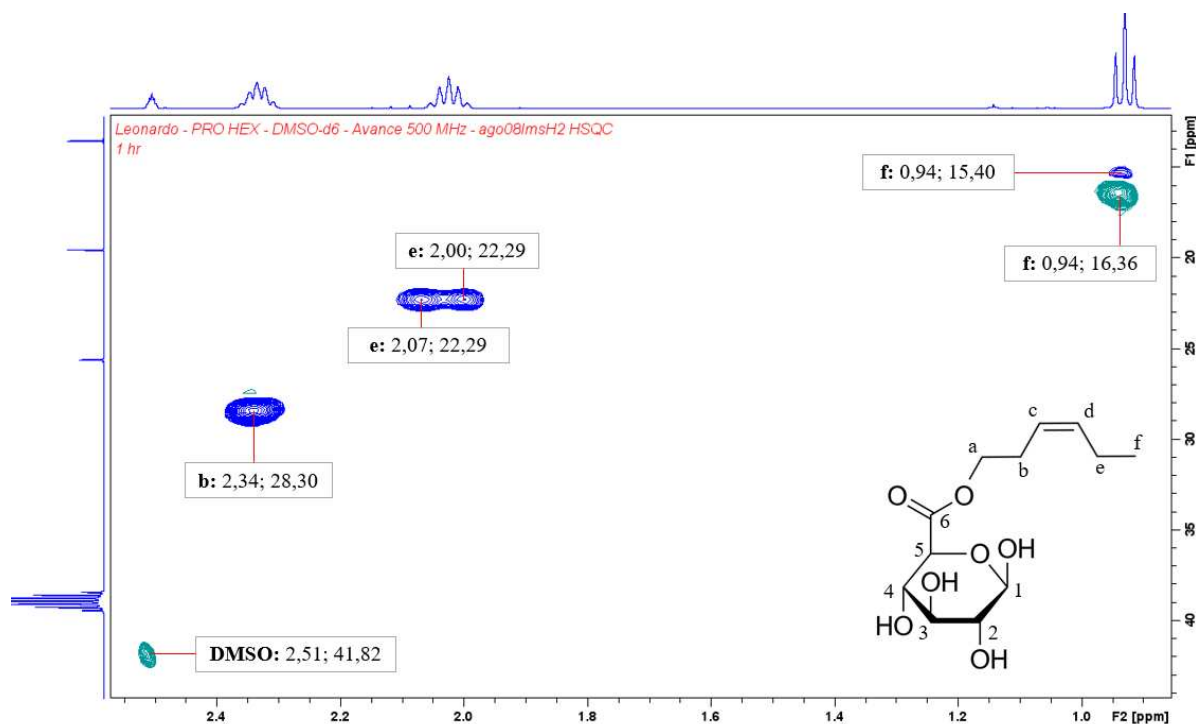


Figura S25. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO- d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , respectivamente

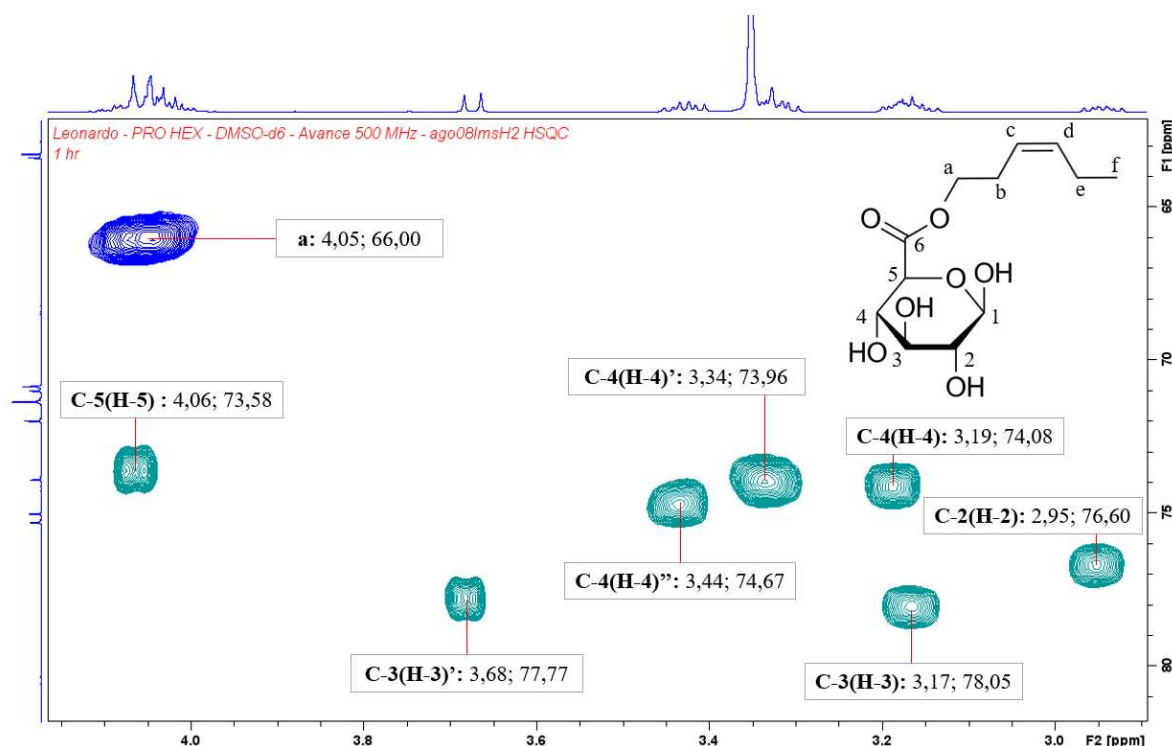


Figura S26. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HSQC da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO- d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , respectivamente

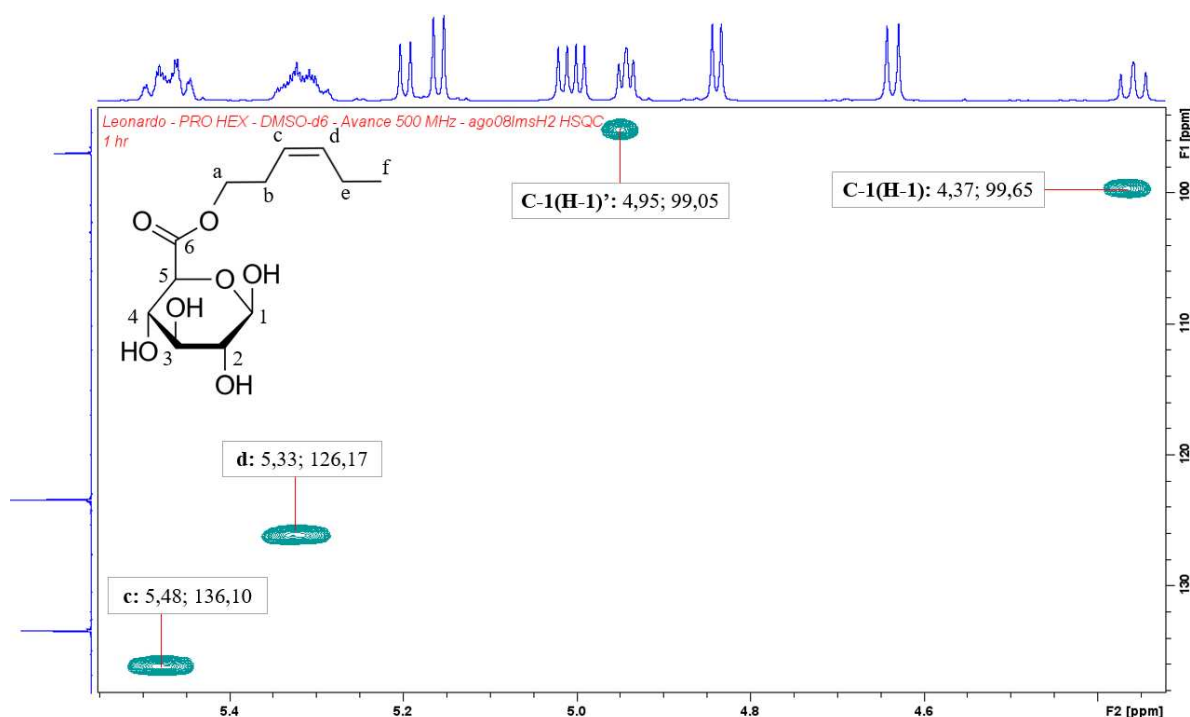


Figura S27. Atribuição dos dados espectrais 2D a partir do mapa do contorno de HMBC da amostra **PRO-HEX** diluída em DMSO- d_6 . Valores em ppm do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , respectivamente

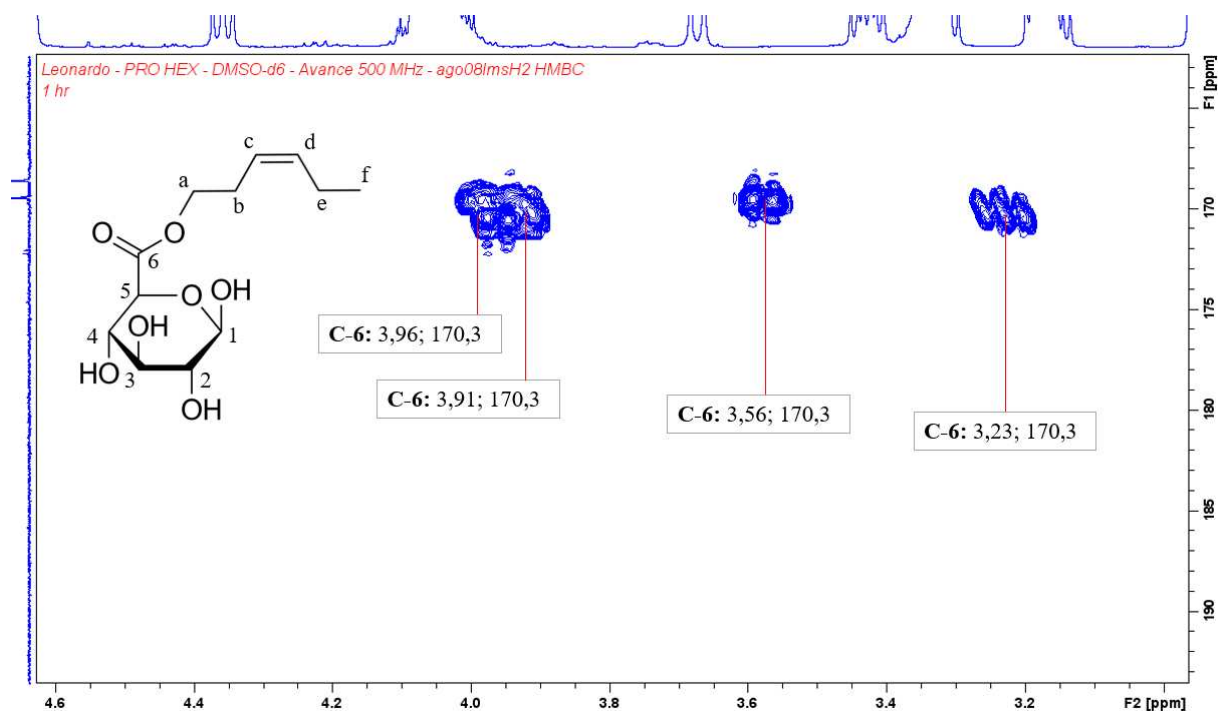


Tabela S1. Resultados obtidos no painel sensorial: valores de intensidade de fragrância sentida para cada instante de tempo (0 a 120 min)

Painelista	HEX 7,25%					PRO-HEX 20%				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
P1	10	3	0	0	0	1	4	0	0	0
P2	8	4	2	0	0	5	7	6	4	2
P3	10	7	5	3	1	9	8	6	4	1
P3	10	5	2	1	1	9	4	2	1	2
P3	10	7	5	4	2	9	5	4	4	3
P4	8	1	0	0	0	2	2	1	1	0
P4	8	0	0	0	0	1	1	2	2	0
P4	8	1	0	0	0	1	1	2	1	1
P5	9	5	4	2	1	7	5	6	5	4
P5	9	5	1	1	1	8	5	2	2	4
P5	9	3	2	1	1	8	6	4	5	4
P6	8	5	2	1	0	5	5	3	3	1
P6	8	5	3	1	0	4	3	4	2	1
P6	9	4	2	1	0	5	5	3	3	1
P7	10	6	1	1	1	4	5	5	3	2
P7	10	1	0	0	0	2	3	2	2	1
P7	10	2	1	1	1	4	3	3	3	2
P8	9	4	1	1	1	2	5	3	2	2
P8	10	3	2	1	0	5	3	3	2	2
P8	9	7	2	0	0	2	3	3	2	2
TAMANHO	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
MÉDIA	9,10	3,90	1,75	0,95	0,50	4,65	4,15	3,20	2,55	1,75

Tabela S2. Resultados obtidos no painel sensorial: Indicação de qual amostra é mais intensa em função do tempo (0 a 120 min) - mais intensa indicada pelo valor 1, menos intensa pelo valor 0. Caso tenha igualdade de intensidade, ambos os valores são 0

Painelista	0 min		30 min		60 min		90 min		120 min	
	HEX 7,25 %	PRO - HEX 20%	HEX 7,25 %	PRO - HEX 20%	HEX 7,25 %	PRO- HEX 20%	HEX 7,25%	PRO - HEX 20%	HEX 7,25 %	PRO- HEX 20%
P1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
P2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P3	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
P3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
P3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
P4	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P4	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
P4	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
P5	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
P5	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
P5	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P6	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P6	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
P6	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P7	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
P7	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P7	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P8	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
P8	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
P8	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
TAMANHO	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
MÉDIA	1,00	0,00	0,25	0,55	0,05	0,85	0,00	0,85	0,00	0,85