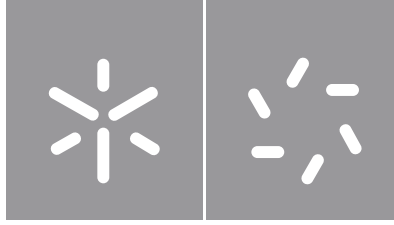


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Catarina Soares Roque

**Biossintese de novos compostos  
emulsificantes para aplicação cosmética**





**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Catarina Soares Roque

**Biossíntese de novos compostos  
emulsificantes para aplicação cosmética**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Doutora Jennifer Martins Noro**  
e do  
**Professor Doutor Luís Sieuve Monteiro**

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Catarina Soares Roque

**Título da dissertação:** Biossíntese de novos compostos emulsificantes para aplicação cosmética

**Orientadores:** Doutora Jennifer Martins Noro e Professor Doutor Luís Sieuve Monteiro

**Ano de conclusão:** 2022

Mestrado em Química Medicinal

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

A finalização desta dissertação representa o fim de um importante ciclo no meu percurso académico. Como tal, sinto necessidade de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram e me ajudaram a concretizar esta dissertação.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Jennifer Noro, orientadora da presente dissertação, pela excelente orientação, bem como por toda a dedicação e apoio. Muito obrigada por me ter acompanhado de forma atenciosa e paciente nesta dissertação e por todos os conhecimentos transmitidos.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer ao Doutor Luís Monteiro, co-orientador desta dissertação, por toda a amabilidade e simpatia demonstrados ao longo deste ano de trabalho.

Em terceiro lugar, gostaria de agradecer ao Doutor Artur Cavaco Paulo, pela oportunidade de realizar esta dissertação nas instalações da *Solfarcos- Soluções Farmacêuticas e Cosméticas Lda.*, onde consegui desenvolver e aperfeiçoar as minhas capacidades laboratoriais, bem como adquirir novos conhecimentos e desenvolver novas técnicas que considero necessárias para o futuro. Gostaria também de agradecer ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, pelas instalações e condições proporcionadas para o desenvolvimento desta dissertação.

Em quarto lugar, gostaria de agradecer à professora Tarsila Castro, por toda a disponibilidade para me explicar e auxiliar nas técnicas de modelação molecular, essenciais para o desenvolvimento desta dissertação. Gostaria ainda de agradecer pela sua simpatia e amabilidade ao longo deste tempo.

Em quinto lugar, gostaria de agradecer a todos os meus colegas de laboratório, pela forma como me acolheram e como sempre me ajudaram. Obrigada por terem tornado este ano melhor e por facilitarem essa mudança na minha vida.

Como não poderia deixar de ser, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me fizeram sentir em casa em Braga e que ajudaram a que as saudades de casa não fossem tantas, nomeadamente aos meus colegas de casa e aos amigos que fiz no mestrado. Um agradecimento muito especial às Marianas por me terem dado colo todas as vezes necessárias e por aquele abraço que conforta o coração nos momentos certos.

Quero ainda deixar um agradecimento especial às minhas amigas da licenciatura, a Catarina, a Carolina e a Liliana, pelo carinho e apoio constante e por continuarem do meu lado mesmo quando decidi continuar o meu percurso fora da cidade a que chamei de casa durante três anos.

De forma muito especial, quero agradecer às minhas amigas de sempre, a Beatriz, a Inês, a Ingrid, a Joana e a Tatiana, por serem um dos suportes mais importantes da minha vida, mesmo que estejamos uma em cada parte do mundo. Obrigada por me mostrarem que está tudo bem se o mundo não for sempre cor-de-rosa.

O último agradecimento, mas o mais importante é dirigido aos meus pais e ao meu irmão, por estarem sempre comigo e por me apoiarem. Obrigada por me mostrarem o melhor que o mundo tem e por tornarem o meu mundo um lugar muito melhor. Obrigada por me manterem os pés no chão nos momentos certos, mas também por me mostrarem que com dedicação todos os sonhos são possíveis.

Muito obrigada!

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

## RESUMO

### Biossíntese de novos compostos emulsificantes para aplicação cosmética

---

Nos dias de hoje, um mundo mais sustentável é cada vez mais um objetivo a atingir. Face a esta necessidade, a indústria cosmética tem vindo a desenvolver novos métodos de produção para satisfazer as necessidades do mercado. Deste modo, os ingredientes cosméticos têm sido substituídos por alternativas, produzidas através de processos sintéticos mais verdes (sem solvente, menor gasto energético e/ou com recurso a biocatalisadores).

Nesta dissertação foram sintetizados seis compostos emulsificantes não iónicos O/A, utilizando *n*-heptano e a lipase modificada da *Aspergillus oryzae* como biocatalisador: o éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) ( $\eta=72\%$ ), o éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) ( $\eta=68\%$ ), o éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) ( $\eta=68\%$ ), o éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) ( $\eta=68\%$ ), o éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) ( $\eta=75\%$ ) e o éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**) ( $\eta=72\%$ ). As lipases nativas da *Aspergillus oryzae*, *Candida rugosa* e *porcine pancreas* foram também testadas, no entanto, revelaram baixa (*Aspergillus oryzae*) ou nenhuma atividade de esterificação (*Candida rugosa* e *porcine pancreas*). Estudos de modelação molecular foram realizados, tendo-se observado uma baixa afinidade dos substratos/produtos aos centros ativos destas enzimas. De modo a obter uma síntese mais verde, as reações com a lipase modificada foram efetuadas na ausência de solvente. Nestas foram apenas isolados os compostos **6d** e **6e** com um rendimento de 74% e 50%, respetivamente.

Posteriormente os ésteres foram caracterizados, e foram estudadas as suas propriedades emulsificantes através da produção de nanoemulsões O/A com rácios de 2,5% e 5% de emulsificante em tampão PBS ou água. A estabilidade destas foi avaliada com recurso à técnica de DLS, que permitiu concluir que os compostos **6a** e **6c** não formam nanoemulsões estáveis, pelo balanço hidrofóbico-hidrofílico e pelo estado sólido do éster, respetivamente. As nanoemulsões formadas pelos restantes ésteres revelam-se estáveis durante, pelo menos, 4 meses, o que foi justificado com 60 ns de simulação de dinâmica molecular. Estas simulações revelaram que os ésteres **6b**, **6e** e **7a** formam agregados com perfil micelar e o composto **6d** forma agregados com perfil de bicamada fosfolipídica. Posteriormente foi encapsulado nestas nanoemulsões um corante hidrofóbico, o *Nile Red*. O corante foi eficientemente encapsulado nas nanoemulsões, o que foi confirmado através de microscopia confocal. No entanto, as nanoemulsões revelaram baixa capacidade na libertação do corante. O mesmo foi observado em estudos de permeação através de um sistema de transdermal.

**Palavras chave:** esterificação, lipases, emulsificantes, nanoemulsões, *docking* molecular

---

## ABSTRACT

### Biosynthesis of new emulsifying compounds for cosmetic applications

A more sustainable world is an emerging goal to achieve. Considering this, the cosmetic industry has been developing new production methods to meet the requirements needs of the market. In this way, cosmetic ingredients have been replaced by alternatives, produced through greener synthetic processes (solvent-free, lower energy expenditure and/or using biocatalysts).

In this dissertation, six non-ionic O/W emulsifying compounds were synthesized using *n*-heptane and a modified lipase from *Aspergillus oryzae* as biocatalyst, the 2-(2-ethoxyethoxy)ethyloctanoate ester (**6a**) ( $\eta=72\%$ ), the 2-(2-ethoxyethoxy)ethyldecanoate ester (**6b**) ( $\eta=68\%$ ), the 2-(2-ethoxyethoxy)ethylpalmitate ester (**6c**) ( $\eta=68\%$ ), the 2-(2-ethoxyethoxy)ethyloleate ester (**6d**) ( $\eta=68\%$ ), the 2-(2-ethoxyethoxy)ethyl(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoate ester (**6e**) ( $\eta=75\%$ ) and the 2-ethoxyethyloctanoate ester (**7a**) ( $\eta=72\%$ ). Native lipases from *Aspergillus oryzae*, *Candida rugosa* e *porcine pancreas* were also tested, however, revealed low (*Aspergillus oryzae*) or no esterification activity (*Candida rugosa* e *porcine pancreas*). Molecular modelling studies were conducted, showing a low affinity of the substrates/products to the active site of these enzymes. In order to obtain a greener synthesis, reactions with modified lipase were performed in the absence of solvent. These reactions only allowed to synthesize the compounds **6d** and **6e** with a yield of 74% and 50%, respectively.

Subsequently the esters were characterized and their emulsifying properties were studied through the production of O/W nanoemulsions with emulsifier ratios of 2.5% and 5% in PBS buffer or water. Their stability was evaluated using the DLS technique, which allowed us to conclude that compounds **6a** and **6c** don't form stable nanoemulsions due to the hydrophobic-hydrophilic balance and the solid state of the ester, respectively. The nanoemulsions formed by the remaining esters are stable for at least 4 months, which was justified with 60 ns of molecular dynamics simulation. These simulations revealed that esters **6b**, **6e** and **7a** form aggregates with micellar profile and the compound **6d** forms aggregates with phospholipid bilayer profile. Subsequently, a hydrophobic model dye, Nile Red, was encapsulated in these nanoemulsions. The dye was efficiently encapsulated in nanoemulsions, which was confirmed by confocal microscopy. However, its release was not observed, nor its permeation through a transdermal system.

**Keywords:** emulsifiers, esterification, lipase, nanoemulsions, molecular docking



# ÍNDICE

## 1. Revisão bibliográfica

1.1	Emulsificantes: contextualização.....	2
1.2	Uso de nanoemulsões para liberação de compostos na pele.....	6
1.3	Emulsificantes na cosmética .....	10
1.4	Síntese de emulsificantes .....	14
1.5	Lipases na síntese de ésteres .....	18

## 2. Materiais e Métodos

2.1	Reagentes.....	24
2.1.1	Modificação da lipase nativa da <i>Aspergillus oryzae</i> .....	24
2.1.2	Síntese de ésteres com solvente .....	25
a)	Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (6a).....	25
b)	Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (6b).....	26
c)	Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (6c).....	26
d)	Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (6d) .....	26
e)	Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (6e) .....	27
f)	Síntese do 2-etoxietiloctanoato (7a).....	27
2.1.3	Síntese de ésteres sem solvente .....	28
2.1.4	Caracterização dos ésteres sintetizados .....	28
a)	Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	28
b)	Espetrometria de massa .....	28
c)	Espetroscopia de infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (FTIR).....	29
d)	pH .....	29
e)	Índice de refração.....	29
f)	Viscosidade .....	29
g)	Teste de propagação .....	29
h)	Polaridade.....	30
i)	Coeficiente de partição .....	30
j)	Densidade.....	30
k)	Tensão superficial .....	30
l)	Análise termogravimétrica (TGA) .....	31
2.1.5	Produção de nanoemulsões.....	31
a)	Caracterização de nanoemulsões.....	31

i.	Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	31
ii.	Nanosight.....	32
2.1.6	Encapsulação do corante <i>Nile Red</i> .....	32
a)	Determinação da solubilidade do <i>Nile Red</i> nos ésteres sintetizados .....	32
b)	Processo de emulsificação com o corante <i>Nile Red</i> .....	33
i.	Estudos de libertação do <i>Nile Red</i> das nanoemulsões .....	33
ii.	Microscopia confocal .....	33
iii.	Permeação do corante em modelo de pele através de um sistema de transdermal .....	33
2.2	<i>Docking</i> e simulações de dinâmica molecular .....	34

### 3. Discussão de resultados

3.1.	Síntese de ésteres .....	39
3.1.1.	Síntese catalisada pela lipase nativa e modificada da <i>Aspergillus oryzae</i> com solvente	40
a)	Reações de esterificação com diálcoois.....	40
b)	Reações de esterificação com álcoois monofuncionais .....	45
3.1.2.	Síntese catalisada pela lipase nativa da <i>Candida rugosa</i> com solvente .....	56
3.1.3.	Síntese catalisada pela lipase nativa da <i>porcine pancreas</i> com solvente.....	57
3.1.4.	Síntese catalisada pela lipase modificada da <i>Aspergillus oryzae</i> sem solvente .....	59
3.1.5.	Caracterização dos ésteres isolados .....	60
3.2.	Propriedades emulsificantes de ésteres .....	65
3.2.1	Caracterização das emulsões.....	67
a)	Técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	68
b)	Nanosight.....	80
3.2.2	Encapsulação do corante <i>Nile Red</i> .....	82
a)	Estudos de libertação do Nile Red das nanoemulsões .....	83
b)	Microscopia confocal .....	85
c)	Permeação do corante em modelo de pele através de um sistema de transdermal .....	86

### 4. Considerações finais e perspectivas futuras

### 5. Referências bibliográficas

#### Anexos

Apêndice A .....	100
Apêndice B .....	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tipos de emulsões com base na constituição da fase contínua e dispersa <sup>1</sup> (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ).....	2
<b>Figura 2.</b> Emulsão A/O/A. <sup>1</sup> A fase aquosa encontra-se representada a azul e a fase oleosa representada a cinzento (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ). ....	2
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática de um agente emulsificante, sendo a parte hidrofílica representada pelo círculo e a parte hidrofóbica pela cauda do emulsificante (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ). ....	4
<b>Figura 4.</b> Emulsões O/A e A/O e disposição dos emulsificantes na superfície da fase dispersa <sup>4</sup> (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ).....	4
<b>Figura 5.</b> Exemplificação de interações de vários agentes emulsificantes com uma emulsão A/O (adaptado de <sup>2</sup> ). ....	5
<b>Figura 6.</b> Esquema de exemplificação de técnicas de formação de nanoemulsões (adaptado de <sup>5</sup> ). ....	6
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo das camadas da pele (adaptado de <sup>6</sup> ). ....	7
<b>Figura 8.</b> Representação do processo de entrega transdérmica (adaptado de <sup>11</sup> ). ....	8
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática das três vias de penetração na pele (adaptado de <sup>13</sup> ). ....	9
<b>Figura 10.</b> Representação dos nanosistemas mais utilizados, <b>(A)</b> nanopartículas lipídicas sólidas, <b>(B)</b> transportadores nanovesiculares e <b>(C)</b> nanopartículas poliméricas (adaptado de <sup>10</sup> ). ....	9
<b>Figura 11.</b> Representação de alguns acontecimentos relevantes na história da indústria cosmética.	10
<b>Figura 12.</b> Estrutura representativa dos álcoois gordos etoxilados e dos ésteres de ácidos gordos etoxilados (R representa uma cadeia carbonada).....	10
<b>Figura 13.</b> Estrutura representativa dos sabões alcalinos (R representa uma cadeia carbonada).....	11
<b>Figura 14.</b> Estrutura representativa dos sais de amónio quaternário (R' representa uma cadeia carbonada e R grupos metilo). ....	11
<b>Figura 15.</b> Estrutura da Lanolina. ....	11
<b>Figura 16.</b> Estrutura representativa da Lecitina (R representa um resíduo de alquil ácido gordo). ....	12
<b>Figura 17.</b> Estrutura da hidroxipropilmetilcelulose.....	12
<b>Figura 18.</b> Emulsão A/S (água em silicone) (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ). ....	13
<b>Figura 19.</b> Micela normal <b>(A)</b> e micela invertida <b>(B)</b> <sup>18</sup> (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ). ....	13

<b>Figura 20.</b> Estrutura geral de um emulsificante de silicone (X representa a modificação hidrofílica) <sup>19</sup> . .....	13
<b>Figura 21.</b> Esquema de síntese de álcoois gordos etoxilados, catalisada por KOH , a uma temperatura de 150°C <sup>21</sup> .....	14
<b>Figura 22.</b> Esquema de síntese de ésteres de ácido etoxilados, com recurso a um catalisador metálico, a uma temperatura entre 40°C e 300°C e alta pressão, entre 10 e 100 atm (adaptado de <sup>22</sup> ). .....	14
<b>Figura 23.</b> Esquema de síntese de sabões alcalinos com aquecimento, à temperatura ambiente. <sup>23</sup> .	14
<b>Figura 24.</b> Esquema representativo da reação de Menshutkin à temperatura ambiente, <i>overnight</i> (adaptado de <sup>24</sup> ). .....	15
<b>Figura 25.</b> Lanolina ( <a href="https://guiadafarmacia.com.br/lanolina-saiba-o-que-e-e-quais-as-indicacoes-de-uso/">https://guiadafarmacia.com.br/lanolina-saiba-o-que-e-e-quais-as-indicacoes-de-uso/</a> ).....	15
<b>Figura 26.</b> Esquema de síntese da reação de esterificação catalisada pelo ácido p-toluenossulfônico, a uma temperatura de 140°C, durante 90 minutos. <sup>25</sup> .....	15
<b>Figura 27.</b> Lecitina granulada ( <a href="https://www.medicalnewstoday.com/articles/319260">https://www.medicalnewstoday.com/articles/319260</a> ) e Lectina líquida ( <a href="https://www.ingredientsnetwork.com/sunflower-lecithin-liquid-nongmo-allergen-free-prod1237120.html">https://www.ingredientsnetwork.com/sunflower-lecithin-liquid-nongmo-allergen-free-prod1237120.html</a> ).....	16
<b>Figura 28.</b> Estrutura da betaína <b>(A)</b> , C-alkil betaína <b>(B)</b> , alquil aminopropil betaína <b>(C)</b> , éster de betaína <b>(D)</b> e fosfobetaína <b>(E)</b> . <sup>27,28</sup> .....	16
<b>Figura 29.</b> Esquema sintético de alquil aminopropil betaína <b>(A)</b> e de C-alkil betaína <b>(B)</b> . <sup>28</sup> .....	16
<b>Figura 30.</b> Estrutura representativa da dimeticone copoliol. <sup>29</sup> .....	17
<b>Figura 31.</b> Reação de hidrosililação. <sup>29</sup> .....	17
<b>Figura 32.</b> Reações de síntese de ésteres - <b>(A)</b> esterificação e <b>(B)</b> transesterificação. <sup>33,34</sup> .....	18
<b>Figura 33.</b> Vantagens do uso de lipases em reações de síntese de ésteres (adaptado de <sup>35</sup> ). .....	18
<b>Figura 34.</b> Representação esquemática do método de adsorção física <b>(A)</b> e ligação covalente <b>(B)</b> (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ).....	19
<b>Figura 35.</b> Representação tridimensional da tríade catalítica (cinzento) numa lipase serina hidrolase. A enzima encontra-se representada em <i>cartoon</i> castanho. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagem obtida com recurso ao programa <i>PyMol</i> , PDB:1TIB). ...	20
<b>Figura 36.</b> Ciclo catalítico da hidrólise do éster pela lipase. A tríade catalítica encontra-se representada a rosa, a enzima a azul e o éster/ácido/álcool a preto (adaptado de <sup>37</sup> ). .....	20

<b>Figura 37.</b> Representação tridimensional da estrutura da lipase nativa da <i>porcine pancreas</i> na conformação aberta. A enzima encontra-se representada em <i>cartoon</i> castanho e a tríade catalítica a cinzento. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagem obtida com recurso ao programa <i>PyMol</i> , PDB:1ETH). <sup>40</sup> .....	21
<b>Figura 38.</b> Lipase da <i>Candida rugosa</i> na conformação fechada (A) (PDB: 1TRH) e na conformação aberta (B) (PDB: 1CRL) com a distância entre os resíduos de extremo da cavidade evidenciada (Imagem obtida com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). <sup>41,42</sup> .....	21
<b>Figura 39.</b> Representação da lipase da <i>Thermomyces lanuginosus</i> modificada com o dodecil aldeído. A enzima encontra-se representada em <i>cartoon</i> castanho e o resíduo de lisina 98 modificado a verde (Imagem obtida com recurso ao programa <i>PyMol</i> , PDB:1TIB/1TIB modificada). <sup>44</sup> .....	22
<b>Figura 40.</b> Representação das células de difusão de Franz (adaptado de <a href="https://permegear.com/franz-cells/">https://permegear.com/franz-cells/</a> ).....	34
<b>Figura 41.</b> Esquema representativo dos passos da simulação de dinâmica molecular entre a lipase <i>Aspergillus oryzae</i> modificada e o ligando 2-etoxietiloleato ( <b>7d</b> ). A lipase modificada está representada em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, as moléculas de água a azul e os iões representados a verde. Os átomos de oxigénio estão representados a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> , PDB:1TIB modificada). <sup>44</sup> .....	36
<b>Figura 42.</b> Esquema representativo dos passos da simulação de dinâmica molecular no processo de <i>self-assembly</i> do ligando 2-(2-etoxietoxi)etiloleato ( <b>6d</b> ). O éster encontra-se representado a ciano e as moléculas de água a azul, sendo que na última imagem do esquema as moléculas de água foram omitidas para melhor visualização. Os átomos de oxigénio estão representados a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	37
<b>Figura 43.</b> Esquema representativo da reação de esterificação realizada.....	39
<b>Figura 44.</b> Esquemas reacionais e respetivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da <i>Aspergillus oryzae</i> com o etilenoglicol ao longo do tempo: <b>i</b> ) éster 2-hidroxiethyl octanoato ( <b>1a</b> ), <b>ii</b> ) éster 2-hidroxiethyl oleato ( <b>1d</b> ) e <b>iii</b> ) éster 2-hidroxiethyl(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato ( <b>1e</b> ).....	41
<b>Figura 45.</b> Representação tridimensional da superfície disponível para comportar ligandos na lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho e as superfícies que indicam cavidades ao redor do centro ativo representadas a cinzento (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	42

<b>Figura 46.</b> Esquemas reacionais e respetivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da <i>Aspergillus oryzae</i> com o 1,3-propanediol ao longo do tempo: <b>i</b> ) éster 3-hidroxi-propil-octanoato ( <b>2a</b> ), <b>ii</b> ) éster 3-hidroxi-propil-oleato ( <b>2d</b> ) e <b>iii</b> ) éster 3-hidroxi-propil-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato ( <b>2e</b> ).....	43
<b>Figura 47.</b> Gráfico representativo das percentagens de conversão obtidas nas reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da <i>Aspergillus oryzae</i> com o dietilenoglicol, trietilenoglicol e PEG200. ....	44
<b>Figura 48.</b> Esquemas reacionais e respetivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da <i>Aspergillus oryzae</i> com o transcitol ao longo do tempo: <b>i</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etil-octanoato ( <b>6a</b> ), <b>ii</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etil-decanoato ( <b>6b</b> ), <b>iii</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etil-palmitato ( <b>6c</b> ), <b>iv</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etil-oleato ( <b>6d</b> ) e <b>v</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etil-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato ( <b>6e</b> ).....	46
<b>Figura 49.</b> <i>Docking</i> do transcitol com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ).....	47
<b>Figura 50.</b> <i>Docking</i> do éster 2-(2-etoxietoxi)etil-octanoato ( <b>6a</b> ) com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ).....	48
<b>Figura 51.</b> <i>Docking</i> do éster 2-(2-etoxietoxi)etil-decanoato ( <b>6b</b> ) com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> e com a lipase nativa e a <i>grid box</i> aumentada ( <b>C</b> ) (PDB:1TIB), sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagem obtida com recurso ao programa <i>PyMol</i> ).....	49
<b>Figura 52.</b> <i>Docking</i> do éster 2-(2-etoxietoxi)etil-palmitato ( <b>6c</b> ) com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado	

amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	49
<b>Figura 53.</b> <i>Docking</i> do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato ( <b>6d</b> ) com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	50
<b>Figura 54.</b> <i>Docking</i> do éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> )-octadeca-9,12-dienoato ( <b>6e</b> ) com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	51
<b>Figura 55.</b> Esquemas reacionais e respetivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da <i>Aspergillus oryzae</i> com o 2-etoxietanol ao longo do tempo: <b>i</b> ) éster 2-etoxietiloctanoato ( <b>7a</b> ), <b>ii</b> ) éster 2-etoxietildecanoato ( <b>7b</b> ), <b>iii</b> ) éster 2-etoxietilpalmitato ( <b>7c</b> ), <b>iv</b> ) éster 2-etoxietiloleato ( <b>7d</b> ) e <b>v</b> ) éster 2-etoxietil(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> )-octadeca-9,12-dienoato ( <b>7e</b> ). .....	52
<b>Figura 56.</b> <i>Docking</i> do 2-etoxietanol com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	53
<b>Figura 57.</b> <i>Docking</i> do éster 2-etoxietiloctanoato ( <b>7a</b> ) com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	53
<b>Figura 58.</b> <i>Docking</i> do éster 2-etoxietiloleato ( <b>7d</b> ) com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ). .....	54

<b>Figura 59.</b> Representação da posição adquirida pelo éster 2-etoxietiloleato ( <b>7d</b> ) no início da simulação de dinâmica molecular com a lipase nativa ( <b>A</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>C</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> e no final da simulação com a lipase nativa ( <b>B</b> ) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada ( <b>D</b> ) (PDB:1TIB modificada) <sup>44</sup> , sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMo</i> ). .....	55
<b>Figura 60.</b> Mecanismo proposto para a reação de esterificação do 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato ( <b>6a</b> ) catalisada pela lipase <i>Aspergillus oryzae</i> . A tríade catalítica encontra-se representada a rosa, a enzima a azul e o éster/ácido/álcool a preto (adaptado de <sup>38</sup> ). .....	56
<b>Figura 61.</b> Representação tridimensional da superfície disponível para alojar novos ligandos na lipase nativa <i>Candida rugosa</i> na conformação fechada (A) (PDB: 1TRH) e na conformação aberta (B) (PDB: 1CRL), sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho e as superfícies que indicam cavidades ao redor do centro ativo representadas a cinzento. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMo</i> ). .....	57
<b>Figura 62.</b> Representação tridimensional da superfície disponível para alojar novos ligandos na lipase nativa da <i>porcine pancreas</i> (PDB:1ETH), sendo a enzima representada em <i>cartoon</i> castanho e as superfícies que indicam cavidades ao redor do centro ativo representadas a cinzento. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMo</i> ). .....	58
<b>Figura 63.</b> <i>Docking</i> de um ligando de cadeia comprida - 2-(2-etoxietoxi)etiloleato ( <b>6d</b> ) ( <b>A</b> ) e um ligando de cadeia curta – 2-etoxietiloctanoato ( <b>7a</b> ) ( <b>B</b> ) com a lipase nativa da <i>porcine pancreas</i> (PDB:1ETH), sendo as enzimas representadas em <i>cartoon</i> castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMo</i> ). .....	58
<b>Figura 64.</b> Gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pela lipase modificada da <i>Aspergillus oryzae</i> sem solvente ao longo do tempo: <b>i</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato ( <b>6a</b> ), <b>ii</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato ( <b>6b</b> ), <b>iii</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato ( <b>6d</b> ), <b>iv</b> ) éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato ( <b>6e</b> ) e <b>v</b> ) éster 2-etoxietiloctanoato ( <b>7a</b> ). .....	60
<b>Figura 65.</b> Espectro <sup>1</sup> H RMN do composto 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato ( <b>6a</b> ). .....	61
<b>Figura 66.</b> Espectro de FTIR do composto 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato ( <b>6a</b> ) e respetivos regentes de partida (ácido octanóico e transcutool). .....	62



<b>Figura 67.</b> Gráfico representativo da análise termogravimétrica do composto 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato ( <b>6a</b> ) e dos seus reagentes de partida.....	65
<b>Figura 68.</b> Esquema de formação das nanoemulsões (exemplificado com o éster <b>6a</b> ) (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ).....	67
<b>Figura 69.</b> Representação do aspeto das nanoemulsões preparadas enquanto estáveis - homogéneo, fluido e branco ( <b>A</b> ) e quando deixam de ser estáveis - heterogéneo e transparente ( <b>B</b> ). ....	68
<b>Figura 70.</b> Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato ( <b>6a</b> ) com: <b>i</b> ) o tampão PBS e <b>ii</b> ) água, armazenadas a 4°C durante 1 semana e 1 mês, respetivamente (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).....	69
<b>Figura 71.</b> Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato ( <b>6a</b> ) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de cluster em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ).....	70
<b>Figura 72.</b> Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato ( <b>6b</b> ) com: <b>i</b> ) o tampão PBS e <b>ii</b> ) água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).....	71
<b>Figura 73.</b> Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato ( <b>6b</b> ) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de cluster em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMol</i> ).....	72
<b>Figura 74.</b> Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato ( <b>6c</b> ) com: <b>i</b> ) o tampão PBS e <b>ii</b> ) água, armazenadas à temperatura ambiente durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o	

PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes)..... 72

**Figura 75.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de cluster em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*)..... 73

**Figura 76.** Aspeto das nanoemulsões O/A com o éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) precipitado ao final de um mês..... 74

**Figura 77.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) com: **i**) o tampão PBS e **ii**) água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes)..... 74

**Figura 78.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de cluster em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*)..... 75

**Figura 79.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) com: **i**) o tampão PBS e **ii**) água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes)..... 76

<b>Figura 80.</b> Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato ( <b>6e</b> ) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de cluster em intervalos de 10 nanossegundos (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMo</i> ).....	77
<b>Figura 81.</b> Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-etoxietiloctanoato ( <b>7a</b> ) com: <b>i</b> ) o tampão PBS e <b>ii</b> ) água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).....	78
<b>Figura 82.</b> Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-etoxietiloctanoato ( <b>7a</b> ) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de cluster em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa <i>PyMo</i> ).....	79
<b>Figura 83.</b> Imagem obtida através da técnica de <i>Nanosight</i> das nanopartículas formadas com 2,5% de éster 2-etoxietiloctanoato ( <b>7a</b> ).....	82
<b>Figura 84.</b> Representação do processo de emulsificação com o corante <i>Nile Red</i> previamente solubilizado no éster estado inicial ( <b>A</b> ) e no estado final ( <b>B</b> ) (Imagem criada em <i>Biorender.com</i> ). ....	83
<b>Figura 85.</b> Imagem microscópica das nanopartículas sem corante (à esquerda) e com corante (à direita) dos ésteres <b>6b (A)</b> , <b>6d (B)</b> , <b>6e (C)</b> e <b>7a (D)</b> com uma ampliação 100x (cor vermelha corresponde às partículas encapsuladas com corante). ....	86
<b>Figura 86.</b> Aspeto das nanoemulsões obtidas quando produzidas com o corante <i>Nile Red</i> com um rácio de 5% ( <b>A</b> ) e 2,5% ( <b>B</b> ).....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tabela representativa dos ácidos e dos álcoois testados na síntese de ésteres, bem como a numeração atribuída aos respectivos produtos desejados .....	39
<b>Tabela 2.</b> Tabela com os produtos pretendidos para as reações de esterificação entre o dietilenoglicol, trietilenoglicol e PEG200 com o ácido octanóico, ácido oleico e ácido linoleico .....	44
<b>Tabela 3.</b> Tabela representativa dos ésteres sintetizados com sucesso posteriormente caracterizados .....	60
<b>Tabela 4.</b> Caracterização dos ésteres sintetizados com o valor do pH, do índice de refração, da viscosidade e da propagação .....	63
<b>Tabela 5.</b> Tabela com os valores de polaridade, do coeficiente de partição, da densidade e da tensão superficial dos ésteres sintetizados .....	64
<b>Tabela 6.</b> Patamares de degradação da análise termogravimétrica dos ésteres sintetizados, bem como dos seus reagentes de partida.....	65
<b>Tabela 7.</b> Tabela resumo com o tempo de estabilização das nanoemulsões em PBS e água, tipo de organização adquirido pelo agregado molecular em água e observações finais .....	80
<b>Tabela 8.</b> Tamanho e concentração das nanopartículas que formam nanoemulsões O/A medidas através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e através de Nanosight (NTA).....	81
<b>Tabela 9.</b> Tabela com a concentração de corante encapsulado nos ésteres sintetizados .....	83
<b>Tabela 10.</b> Tamanho das nanopartículas no início dos estudos de libertação do corante Nile Red (48 horas)e no final dos estudos (240 horas) .....	84
<b>Tabela 11.</b> Tabela com o tamanho das nanopartículas libertadas ao longo do tempo do ensaio de transdermal.....	87

## LISTA DE EQUAÇÕES

**Equação 1.** Determinação da energia de transição molar..... 30

**Equação 2.** Determinação da densidade..... 30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\lambda$	Comprimento de onda
$\rho$	Densidade
$\delta$	Desvio químico
$\Delta_{\text{peso}}$	Diferença de peso
$\Delta G_{\text{ligação}}$	Energia de ligação
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\nu$	Número de onda
$\%(m/v)$	Porcentagem massa por volume
$\eta$	Rendimento
$^1\text{H RMN}$	Ressonância magnética nuclear de próton
<b>3D</b>	3 dimensões
$\text{\AA}$	Angström
<b>A/O</b>	Água em óleo
<b>A/S</b>	Água em silicone
<b>ATR</b>	<i>Attenuated total reflection</i>
<b>d</b>	Dupleto
<b>DFT</b>	<i>Density Functional Theory</i>
<b>DLS</b>	Espalhamento dinâmico de luz
$E_{\text{NR}}$	Energia de transição molar
<b>ESI</b>	Ionização por <i>electrospray</i>
<b>FTIR</b>	Espetroscopia de infravermelho com transformada de <i>Fourier</i>
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora
<b>HBL</b>	Balanço hidrofílico-lipofílico
<b>Hz</b>	Hertz
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>Kcal/mol</b>	Quilocaloria por mol
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>kHz</b>	Quilohertz
<b>kJ/mol</b>	Quilojoule por mol

<b>Log P</b>	Logaritmo do coeficiente de partição
<b>M</b>	Molar
<b>m</b>	Multiplete
<b>min</b>	Minuto
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>mN/m</b>	Milinewton por metro
<b>mPa</b>	Milipascal
<b>m/z</b>	Razão massa/carga
<b>MS</b>	<i>Mass spectrometry</i>
<b>mV</b>	Milivolt
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ns</b>	Nanossegundos
<b>NPT</b>	<i>Ensemble</i> isobárico/isotérmico
<b>NTA</b>	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
<b>NVT</b>	<i>Ensemble</i> canónico
<b>O/A</b>	Óleo em água
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PDI</b>	Índice de polidispersividade
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>ps</b>	Picossegundos
<b>q</b>	Quarteto
<b>t</b>	Triplete
<b>T<sub>dmáx</sub></b>	Temperatura de degradação máxima
<b>TGA</b>	Análise termogravimétrica
<b>U</b>	Unidade de atividade enzimática
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-visível



---

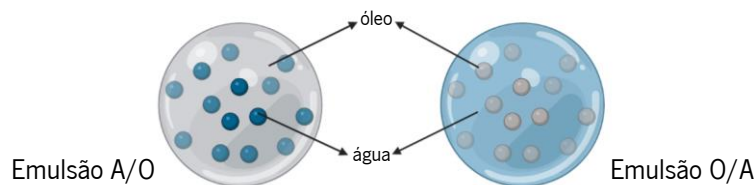
## Revisão bibliográfica



## 1.1 Emulsificantes: contextualização

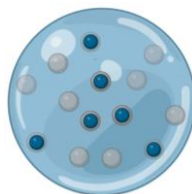
Uma emulsão é uma mistura de dois líquidos normalmente imiscíveis que formam uma mistura estável. Nestas misturas, um dos líquidos, a fase dispersa, tem as suas gotículas dispersas no outro líquido, a fase contínua.

A classificação de emulsões pode ser feita com base em vários critérios. Um dos critérios mais importantes é o componente da fase dispersa e da fase contínua. Com base neste, as emulsões podem ser divididas em emulsões água em óleo (A/O), caso a fase contínua seja um óleo e a fase dispersa água, e emulsões óleo em água (O/A), se a fase contínua for água e a fase dispersa um óleo (figura 1). No caso de emulsões cosméticas, um óleo é sinónimo de um solvente orgânico insolúvel em água, que pode ser uma mistura de dois ou mais ingredientes hidrofóbicos como silicones, ácidos gordos, ésteres de ácidos gordos, entre outros, enquanto que a água pode ser sinónimo de uma solução aquosa de substâncias hidrofílicas, como açúcares ou aminoácidos.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Tipos de emulsões com base na constituição da fase contínua e dispersa <sup>1</sup> (Imagem criada em *Biorender.com*)

Além das emulsões referidas anteriormente, existem ainda emulsões nas quais não é possível determinar qual a fase dispersa, pois cada fase da emulsão, tem gotas da outra fase. Estas emulsões são conhecidas como emulsões múltiplas e são classificadas de acordo com a relação entre fases. Uma emulsão A/O/A tem uma emulsão A/O dispersa na fase aquosa (figura 2) e uma emulsão O/A/O tem um sistema O/A disperso na fase oleosa. Os sistemas de múltiplas emulsões representam algumas vantagens na área da cosmética, uma vez que combinam a ação hidratante de emulsões A/O com as propriedades sensoriais de emulsões O/A e permitem controlar a distribuição de ingredientes ativos na pele.<sup>1,2</sup>



**Figura 2.** Emulsão A/O/A.<sup>1</sup> A fase aquosa encontra-se representada a azul e a fase oleosa representada a cinzento (Imagem criada em *Biorender.com*).

Outro critério com elevada relevância na classificação de emulsões é o grau de dispersão da fase interna, isto é, o tamanho das partículas desta fase. O tamanho das partículas da fase dispersa afeta o aspeto da emulsão e permite distinguir três tipos de emulsões, as macroemulsões, as microemulsões e as nanoemulsões. As macroemulsões, de cor branca, são sistemas com partículas dispersas com um tamanho superior a 500 nanómetros, as microemulsões, semitransparentes, incluem sistemas com partículas com um tamanho inferior a 500 nanómetros e as nanoemulsões, transparentes, têm partículas com um diâmetro entre 20 e 200 nanómetros. As microemulsões e nanoemulsões têm um aspeto bastante semelhante, mas são distinguidas pela formação. As microemulsões são formadas de forma espontânea, pela solubilização das partículas de óleo e uma mistura de tensoativos, enquanto as nanoemulsões requerem equipamento especializado.<sup>2</sup> As nanoemulsões oferecem algumas vantagens relativamente aos outros tipos de emulsões distinguidas com base neste parâmetro, nomeadamente a maior taxa de absorção, a proteção da hidrólise de emulsões A/O, a capacidade de incorporar fármacos ou substâncias lipofílicas e hidrofílicas e o controle preciso da libertação por permeação do fármaco.<sup>3</sup>

A emulsificação, o processo que origina emulsões, é um processo dinâmico, que necessita de energia para dispersar um dos líquidos na fase contínua. Existem vários métodos de emulsificação, sendo exemplos a agitação simples, o uso de homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom.<sup>3</sup> As características das emulsões são variáveis ao longo do processo devido a fatores externos, como a temperatura ou velocidade de agitação. No entanto, para a sua formação é necessária a satisfação de três condições: a existência de tensoativos, a imiscibilidade entre a fase contínua e dispersa da emulsão e agitação para dispersar os dois líquidos envolvidos.<sup>4</sup>

A estabilidade da emulsão é influenciada pelo filme formado pelas partículas na interface e o mecanismo de absorção do tensoativo, podendo distinguir quatro mecanismos. O mecanismo de repulsão eletrostática, que resulta da interação das camadas elétricas das gotas, com tendência a impedir o contacto entre as gotas, mas estabilizada pelo filme interfacial que envolve as gotas dispersas. O mecanismo de repulsão estérica, no qual as gotas de água dispersas são cobertas pelo tensoativo e a sua cauda adsorvida, o que permite estabilizar emulsões A/O. O mecanismo do efeito *Marangoni-Gibbs* estabiliza emulsões, pois evita a drenagem da fase contínua entre duas gotas opostas e o último mecanismo está relacionado com a estabilização do filme fino, através da formação de um tecido rígido e viscoelástico, que impede a coalescência das gotas.<sup>4</sup>

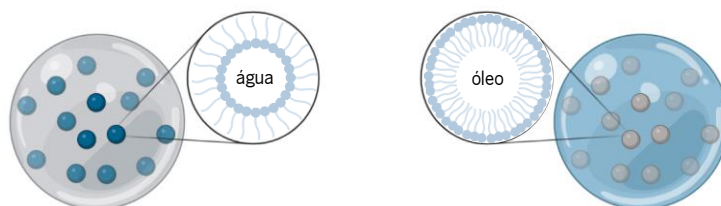
A termodinâmica e cinética são parâmetros bastante relevantes quando o assunto é a estabilidade de emulsões, uma vez que estas são naturalmente instáveis e as suas propriedades são mutáveis em determinado período. *Mehta & Kaur* afirmaram que o contacto indesejado entre as partículas de água e óleo tende a quebrar-se após algum tempo, o que está relacionado com o tamanho das gotas e conseqüentemente com a estabilidade termodinâmica da emulsão. A adição de agentes emulsificantes contribui para a estabilidade cinética. A função deste agente/tensioativo é promover a estabilidade das emulsões, formando películas ao redor das gotas de água na interface dos dois líquidos, o que aumenta a viscosidade interfacial, facilita a dispersão das gotas da fase dispersa e diminui a tensão na interface dos líquidos. A estabilidade da emulsão está relacionada com a quantidade e o tipo de emulsificantes adicionados e alguns fatores externos como a temperatura.<sup>4</sup>

Os agentes emulsificantes são compostos anfifílicos, ou seja, são constituídos por uma região hidrofóbica/apolar e uma região hidrofílica/polar (figura 3). A região hidrofílica pode ser constituída por grupos ácidos, alcalinos ou ésteres, enquanto a região hidrofóbica é constituída por uma cadeia carbonada. Esta característica permite que estes compostos interajam com substâncias apolares, através da cadeia hidrofóbica e com substâncias polares, através da região hidrofílica.<sup>2</sup>



**Figura 3.** Representação esquemática de um agente emulsificante, sendo a parte hidrofílica representada pelo círculo e a parte hidrofóbica pela cauda do emulsificante (Imagem criada em *Biorender.com*).

De acordo com o tipo de emulsão, o emulsificante é absorvido de maneira específica, uma vez que a parte hidrofóbica é dissolvida na fase oleosa e a parte hidrofílica é solvatada pela água (figura 4).<sup>4</sup>



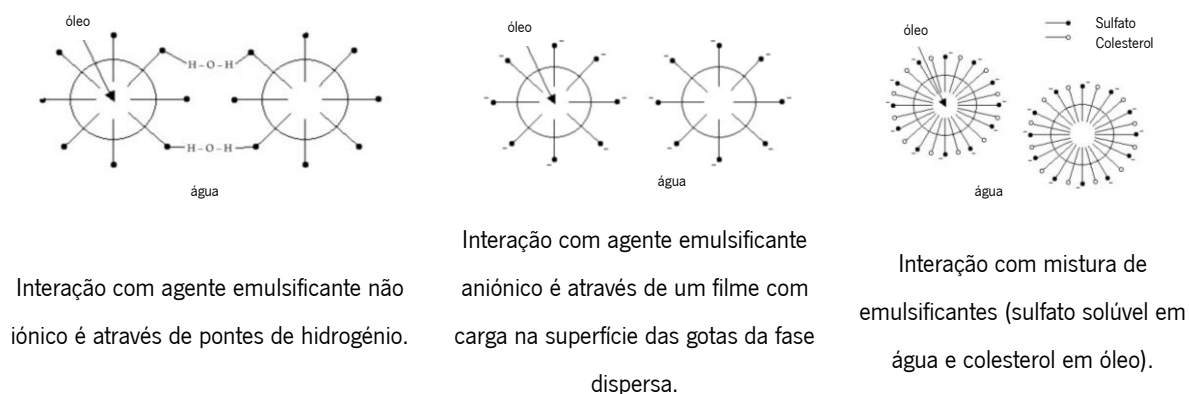
**Figura 4.** Emulsões O/A e A/O e disposição dos emulsificantes na superfície da fase dispersa<sup>4</sup> (Imagem criada em *Biorender.com*).

Os agentes emulsificantes, assim como as emulsões, podem ser classificados de acordo com vários critérios. Um dos parâmetros que permite distinguir os emulsificantes é a sua formação iônica, sendo que, neste caso estes podem ser divididos em emulsificantes iônicos e não iônicos. Os emulsificantes não iônicos não se dissociam em íons em água e são exemplos os ésteres de ácidos gordos C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>. Os emulsificantes iônicos dissociam-se em íons quando em contacto com a água e

podem ser classificados de acordo com a natureza do íão na parte anfifílica da molécula, sendo que estes podem ser aniônicos, catiónicos e anfotéricos. A cadeia carbonada dos emulsificantes aniônicos, quando dissociados em água, encontra-se na sua forma aniônica, sendo exemplos os sabonetes alcalinos e os sabonetes metálicos. No caso dos emulsificantes catiónicos, a cadeia carbonada está na sua forma catiónica, sendo um exemplo destes os sais de amónio quaternários. Os emulsificantes anfotéricos, quando dissolvidos em água, podem adotar comportamento de emulsificante aniônico ou catiónico, dependendo do pH da água, sendo exemplificados por derivados de betaína ou lecitina.<sup>2</sup>

A relevância da escolha de agentes emulsificantes na formação de emulsões levou ao desenvolvimento do conceito de balanço hidrofílico-lipofílico (HBL), por *Griffin*, em 1949. Este desenvolveu um método semi-empírico para determinação do valor do balanço hidrofílico-lipofílico para agentes emulsificantes não-iônicos, sendo que o valor determina se o composto é hidrofílico ou hidrofóbico, através da razão entre a parte hidrofílica da molécula e a sua massa molecular. *Griffin* criou uma escala numérica de classificação de tensoativos, que varia entre 0 (hidrofóbico) e 20 (hidrofílico), e funciona como indicador geral de qual tipo de emulsão será formada. Com base nesta escala de classificação, se o valor do balanço estiver entre 3 e 6, o agente emulsificante é solúvel em água e insolúvel em lípidos, sendo adequado para a formação de emulsões do tipo A/O. Caso o valor esteja entre 10 e 18, o agente emulsificante forma dispersões de aspeto leitoso estáveis, é solúvel em água e em lípidos e forma emulsões do tipo O/A. Posteriores avanços levaram ao desenvolvimento do método de *Davies*, que calcula o valor deste balanço com base nos grupos da molécula, neste caso, os grupos hidrofílicos e lipofílicos.<sup>2</sup>

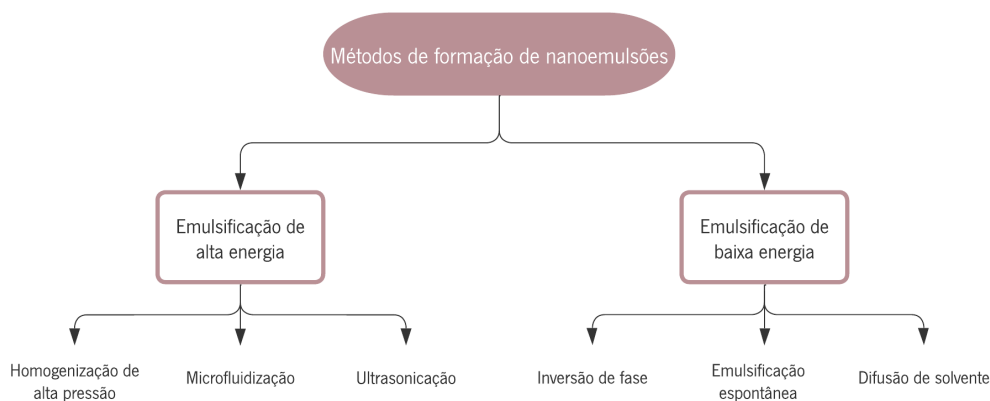
O mecanismo de estabilização da emulsão depende do tipo de emulsão, bem como da estrutura química do agente emulsificante (figura 5). Este último, além de reduzir a tensão interfacial, forma um filme complexo em volta das gotículas de fase dispersa, evitando a separação das duas fases.<sup>2</sup>



**Figura 5.** Exemplificação de interações de vários agentes emulsificantes com uma emulsão A/O (adaptado de <sup>3</sup>).

## 1.2 Uso de nanoemulsões para libertação de compostos na pele

Nos últimos anos, as nanoemulsões têm sido cada vez mais produzidas pela sua pertinente aplicação na libertação de compostos na pele. A formação de nanoemulsões inclui dois passos, sendo o primeiro a formação de macroemulsões e posterior conversão em nanoemulsões. As numerosas técnicas de formação podem ser divididas em dois grupos, os métodos de emulsificação de alta energia, utilizados em escala laboratorial e industrial, e métodos de emulsificação de baixa energia, apenas utilizados em escala laboratorial. Nos métodos de emulsificação de alta energia são geradas forças, através de métodos mecânicos, que dividem as gotas da macroemulsão previamente formada em gotas nanométricas com elevada energia cinética, o que torna possível um controle maior do tamanho das nanopartículas. Os métodos de emulsificação de baixa energia são mais eficientes em termos energéticos, visto que usam o potencial químico dos métodos e agitação leve a moderada para a formação de nanoemulsões.<sup>5</sup>



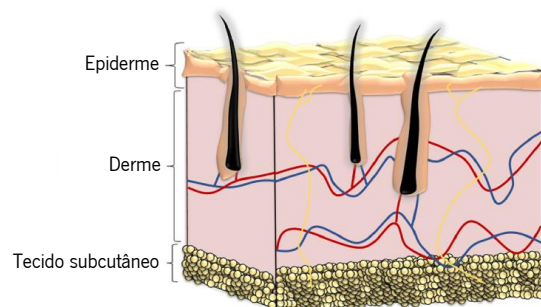
**Figura 6.** Esquema de exemplificação de técnicas de formação de nanoemulsões (adaptado de <sup>5</sup>).

As nanoemulsões são geralmente transparentes, estáveis e anfífilas, mas também apresentam desvantagens como a difícil inclusão em formulações cosméticas, são sensíveis a meio ácido e diminuem o tempo de ação dos produtos. As nanoemulsões são relevantes, pois permitem a libertação de compostos lipofílicos, uma maior absorção de ingredientes ativos e aumentam a biodisponibilidade de ingredientes ativos e a penetração na pele (percutânea).<sup>6,7</sup> Um exemplo bastante comum de produtos que se tornaram mais estáveis se fabricados como nanoemulsões são os antioxidantes, pois verificou-se um aumento da permeabilidade na pele e da solubilidade em água, o que conseqüentemente aumentou o seu efeito clareador.<sup>7</sup>

Algumas propriedades das nanoemulsões, como a sua baixa viscosidade, alta capacidade de solubilização e o seu tamanho, que condiciona as propriedades óticas e reológicas, tornam-nas bastante relevantes na indústria cosmética e farmacêutica. Na indústria cosmética são normalmente

utilizadas para formulações cosméticas, como por exemplo cremes para a pele ou protetores solares, enquanto na indústria farmacêutica são utilizadas na concepção de sistemas de entrega de medicamentos.<sup>7</sup> A necessidade de aumentar a eficácia dos produtos levou à união destas duas indústrias e conseqüentemente foi criado o conceito de cosmeceúticos, que são formulações cosméticas constituídas por agentes com benefícios terapêuticos quando aplicadas na pele. O uso de formulações cosméticas para aplicações tópicas ou capilares para tratar problemas como a queda de cabelo, rugas ou hiperpigmentação, são exemplos de cosmeceúticos bastante utilizados no dia a dia.<sup>8</sup>

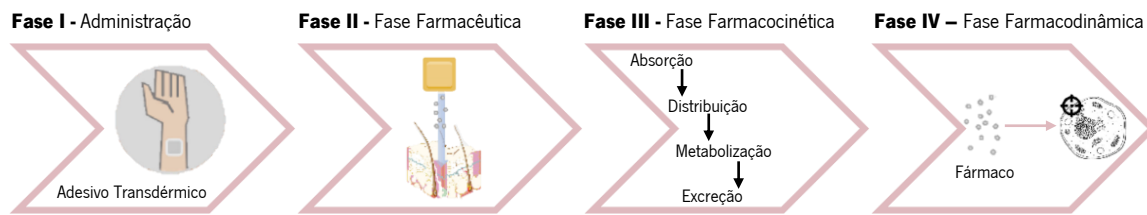
O uso de nanoemulsões nestas indústrias ocorre através da pele, uma vez que esta é vista como uma via não invasiva para a administração de fármacos ou do componente ativo cosmético. A pele funciona como barreira de proteção do corpo humano a agentes externos e é composta por várias camadas, a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo, como ilustrado na figura 7.<sup>9</sup> O *Stratum Corneum*, a camada mais externa da epiderme, é constituída por uma rede de queratina em forma de corneócitos que funciona como barreira física à entrada de substâncias estranhas ao organismo nas camadas mais profundas da pele.<sup>10</sup>



**Figura 7.** Esquema representativo das camadas da pele (adaptado de <sup>9</sup>).

Na indústria farmacêutica, uma das técnicas mais utilizadas para a administração de medicamentos, a via oral, tem sido cada vez mais substituída pela técnica de entrega transdérmica. Esta técnica normalmente requer que os medicamentos passem por todas as subcamadas da epiderme através de um processo de difusão passiva e permite uma liberação controlada do fármaco através de nanoemulsões A/O, que facilitam a passagem de substâncias lipofílicas. O processo até o fármaco atingir o local alvo é constituído por quatro fases, como representado na figura 8. A administração é o primeiro passo, sendo que depois o fármaco passa por uma fase farmacêutica, na qual é libertado do adesivo transdérmico para a pele. Conseqüentemente, após dissolução do fármaco, os componentes ficam farmacologicamente disponíveis para serem processados, o que acontece na fase III. Quando o fármaco é libertado, no início da última fase, este atinge a circulação sistêmica e o componente torna-se biodisponível para alcançar o local alvo, quer seja um recetor ou uma enzima, e

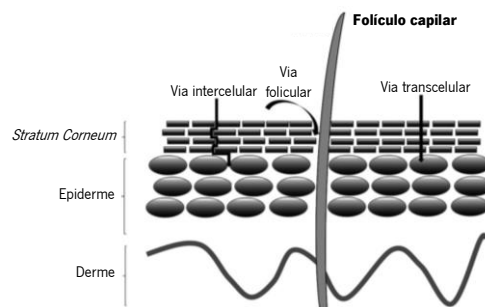
realizar a sua ação terapêutica. Este processo mostra que a ação do fármaco depende da sua natureza, do local alvo e do transportador.<sup>11</sup>



**Figura 8.** Representação do processo de entrega transdérmica (adaptado de <sup>11</sup>).

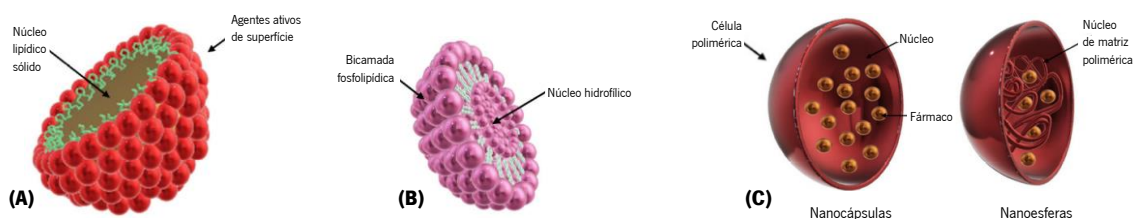
Um dos exemplos mais comuns de nanoemulsões na indústria farmacêutica é o Clotrimazol, uma nanoemulsão O/A, aplicado na pele humana. Este derivado imidazólico apresenta atividade antifúngica e é o princípio ativo utilizado no conhecido medicamento Gino-Canesten®. Este fármaco causa danos na estrutura do fungo, impede que ele se multiplique e conseqüentemente provoca a sua eliminação.<sup>11</sup>

Na indústria cosmética, com produtos como cremes hidratantes, loções corporais, maquiagem ou produtos capilares, as nanoemulsões são normalmente incorporadas nestas formulações, sendo que estas não apresentam problemas na formação de produtos cosméticos. Estes produtos são aplicados topicamente na superfície da pele, sendo que para a obtenção de um determinado efeito cosmético, é necessário que seja alcançada uma determinada penetração na pele. Esta depende de fatores como o tamanho molecular, o grau de ionização ou a lipofilicidade. Existem três vias possíveis de penetração pela barreira cutânea, a via intercelular, a via folicular e a via transcelular.<sup>12</sup> A via intercelular é a via mais utilizada, pois a substância difunde-se pelo *Stratum Corneum* através das camadas lipídicas, o que se torna ideal para pequenas moléculas hidrofóbicas, com um peso molecular inferior a 500 Dalton. A segunda via é relevante, pois utiliza a extensa rede de capilares sanguíneos como suporte de penetração, visto que as moléculas penetram através de apêndices da pele, como o folículo capilar. Esta via é recomendada para pequenas moléculas hidrofílicas ou moderadamente lipofílicas através dos corneócitos e ainda funciona como reservatório do composto ativo. A última via, a via intracelular/transcelular, tem como base a penetração transcelular com transporte direto de substâncias através das camadas lipídicas. Esta via permite a passagem de compostos penetrantes que não são muito comuns, como por exemplo, os folículos capilares. Estes podem permitir a penetração de grandes moléculas hidrofílicas, que têm a sua permeação na pele dificultada. As três vias estão representadas na figura 9.<sup>10,13</sup>



**Figura 9.** Representação esquemática das três vias de penetração na pele (adaptado de <sup>13</sup>).

A passagem por qualquer uma destas três vias pode ser demasiado lenta para algumas moléculas, o que torna difícil a eficácia da substância ativa nas restantes camadas da pele. Deste modo, com o objetivo de ultrapassar esta dificuldade, têm sido desenvolvidos sistemas de liberação de nanopartículas na pele. Estes desenvolvimentos tornam-se relevantes pois as nanopartículas, com tamanho semelhante aos organelos celulares, permitem um transporte adequado de pequenas moléculas para as células-alvo, o que reduz a dose necessária para administração e conseqüentemente o desperdício de composto e aumenta a eficácia deste. Estes sistemas têm como objetivo fornecer um elevado número de substâncias ativas, independentemente do peso molecular e lipofilicidade, dentro e através da pele, bem como fornecer uma liberação adequada de fármacos e cosmecêuticos. Esta liberação adequada tem como objetivo aumentar a concentração destas substâncias nas camadas mais profundas da pele e na corrente sanguínea. Alguns destes nanosistemas têm flexibilidade para se deformar e penetrar através do *Stratum Corneum*, através da via folicular ou intercelular, impulsionados pelo gradiente de hidratação. Os nanosistemas mais utilizados para administração cutânea são as nanopartículas lipídicas sólidas, transportadores nanovesiculares, micro e nanoemulsões e nanopartículas poliméricas (figura 10).<sup>10</sup>



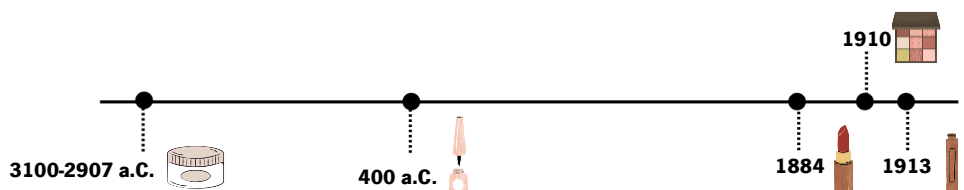
**Figura 10.** Representação dos nanosistemas mais utilizados, **(A)** nanopartículas lipídicas sólidas, **(B)** transportadores nanovesiculares e **(C)** nanopartículas poliméricas (adaptado de <sup>10</sup>).

Na indústria cosmética as nanoemulsões podem ter aplicação dérmica, ou seja, na pele (exemplificada por cremes, loções e pomadas, que revelam elevada estabilidade e são adequadas para transporte de compostos lipofílicos, revelando uma permeação mais profunda na pele) ou em produtos de tratamento capilar (exemplificada por champôs e sérums, que tem como base o acesso que as aberturas foliculares fornecem para as nanopartículas ficarem estáticas no folículo capilar).<sup>6</sup>



### 1.3 Emulsificantes na cosmética

A história dos cosméticos tem início no antigo Egito, que utilizava Unguento como produto hidratante e o primeiro emulsificante a ser incorporado num cosmético foi a cera de abelha na Grécia antiga. O maior desenvolvimento na indústria cosmética ocorre no século XX (figura 11).



**Figura 11.** Representação de alguns acontecimentos relevantes na história da indústria cosmética.

Nos dias de hoje, existe uma inúmera variedade de cosméticos, que tem como constituição uma extensa variedade de substâncias químicas. No entanto, existem ingredientes comuns entre eles, sendo exemplos os pigmentos, emolientes, agentes espessantes e, os mais comuns, a água e o óleo, que não se misturam, tornando necessária a existência de emulsificantes.

Os emulsificantes têm de ser adequados ao tipo de emulsões que estabilizam. Deste modo, a existência de vários tipos de emulsões gera a necessidade de existência de vários tipos de emulsificantes. Na cosmética, os mais comuns são os emulsificantes A/O, emulsificantes O/A, emulsificantes naturais e emulsificantes de silicone.

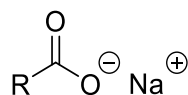
Os emulsificantes O/A, tal como o nome indica, estabilizam emulsões óleo em água e normalmente são utilizados para efeitos hidratantes. Os emulsificantes não iónicos O/A são o grupo mais vasto dos emulsificantes cosméticos e são derivados de polietilenoglicol/poliol, o que lhes confere uma forte afinidade com a água e estabilização do sistema. Estes emulsificantes são usados na indústria cosmética pois não são irritantes ou tóxicos para a pele, são resistentes a variações de pH e permitem combinações com outros emulsificantes. No entanto, também diminuem a atividade antimicrobiana dos conservantes utilizados nas formulações cosméticas. Exemplos deste tipo de emulsificantes são os álcoois gordos etoxilados e ésteres de ácidos gordos etoxilados (figura 12).<sup>2</sup>



**Figura 12.** Estrutura representativa dos álcoois gordos etoxilados e dos ésteres de ácidos gordos etoxilados (R representa uma cadeia carbonada).

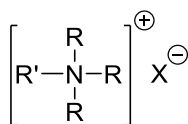
Os emulsificantes aniónicos O/A, outra das subclasses deste tipo de emulsificantes, atua através da formação de uma camada elétrica em volta das gotas da fase dispersa, o que impede a

coalescência. Estes emulsificantes estabilizam emulsões em meio alcalino e neutro, mas não em meio ácido. Um dos exemplos mais conhecidos destes emulsificantes são os sabões alcalinos (figura 13), sendo um dos aspetos menos positivos o clareamento da pele, mas que pode ser solucionado com a adição de óleo de silicone.<sup>2</sup>



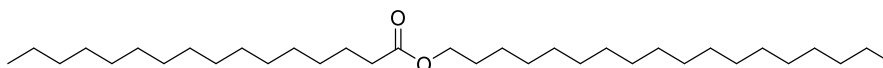
**Figura 13.** Estrutura representativa dos sabões alcalinos (R representa uma cadeia carbonada).

Os emulsificantes catiónicos O/A são normalmente sais de amónio quaternários (figura 14). Estes compostos raramente são utilizados em produtos de *skin care*, pois são bastante irritantes. No entanto, são utilizados em produtos para cabelo, como substâncias condicionantes e agentes antiestáticos, evitando o enriquecimento e o *frizz*. Estes emulsificantes são estáveis em meios ácidos e alcalinos e têm atividade antibacteriana, no entanto são incompatíveis com compostos aniónicos e intolerantes à água dura.<sup>2</sup>



**Figura 14.** Estrutura representativa dos sais de amónio quaternário (R' representa uma cadeia carbonada e R grupos metilo).

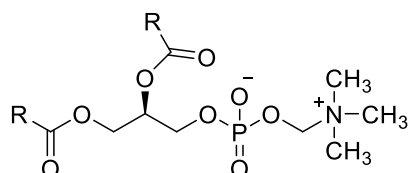
Os emulsificantes A/O são outro tipo de emulsificantes, apesar de menos relevantes que os emulsificantes O/A referidos anteriormente. Este tipo de emulsificantes estabilizam emulsões água em óleo e normalmente provocam uma sensação gordurosa, uma vez que as gotas de água são mantidas embaladas em óleo. Os emulsificantes não iónicos A/O são compostos hidrofóbicos que são mais solúveis em gordura do que em água. Exemplos destes emulsificantes são a Lanolina e os seus derivados e alguns ésteres ou poliésteres de álcoois. A Lanolina (figura 15) é bastante utilizada como solvente em formulações cosméticas, como ceras.<sup>2</sup>



**Figura 15.** Estrutura da Lanolina.

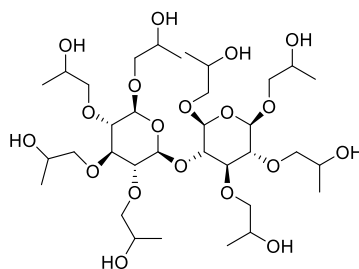
Outros emulsificantes, ainda na classe dos emulsificantes A/O, são os emulsificantes aniónicos A/O. Estes são sais de ácidos gordos de catiões multivalentes, como o cálcio, magnésio, zinco ou alumínio e são utilizados como fatores de consistência em emulsões cosméticas. Uma das maiores desvantagens destes compostos é não poderem ser combinados com emulsificantes aniónicos O/A, pois tornam-se neutros e a estabilidade da emulsão perde-se.<sup>2</sup>

Os emulsificantes anfotéricos, dependendo do pH da reação, podem funcionar como aniões ou catiões. Caso o meio seja ácido, estes funcionam como emulsificantes catiónicos e caso o meio seja alcalino, funcionam como emulsificantes aniônicos. A sua maior vantagem é que podem ser combinados com qualquer tipo de emulsificantes, pela sua variação de carácter. O facto de apresentarem baixa toxicidade, serem altamente degradáveis, não irritarem a pele e serem capazes de inibir os efeitos irritantes de outros compostos são vantagens destes emulsificantes. Estes são bastante utilizados em cosmética, em produtos de barbear, loções corporais e cremes. Os exemplos mais relevantes, são os derivados da Betaina e a Lecitina. A Lecitina (figura 16), estabiliza emulsões O/A, quando pura, e quando ligada a fosfolípidos, ácidos gordos livres ou carboidratos, estabiliza emulsões A/O. A Lecitina suaviza a pele, inibe a sua lubrificação e facilita a reabsorção de ingredientes ativos.<sup>2</sup>



**Figura 16.** Estrutura representativa da Lecitina (R representa um residuo de alquil ácido gordo).

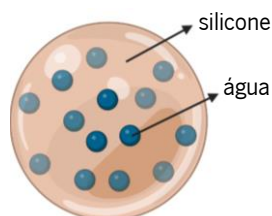
Uma alternativa aos emulsificantes mais comuns são os polímeros e sólidos insolúveis, uma vez que estes evitam a coalescência da fase dispersa. A elevada massa molecular deste tipo de compostos impede que os compostos irritem a pele, pois dificulta a sua migração. A Hidroxipropilmetilcelulose (figura 17), é exemplo deste tipo de emulsificantes, que é frequentemente adicionado à fase contínua para aumentar a sua viscosidade e aumentar a estabilidade da emulsão.<sup>2</sup>



**Figura 17.** Estrutura da Hidroxipropilmetilcelulose.

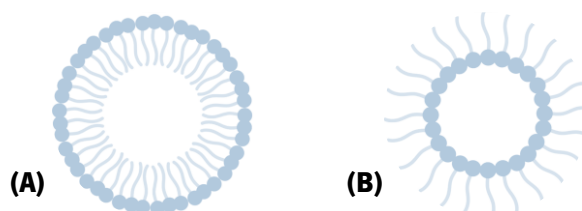
Os emulsificantes naturais são outra das classes, e aparecem cada vez mais, devido à necessidade de sínteses mais ecológicas e que obedeçam aos princípios da química verde.<sup>14</sup> Estes princípios têm como objetivo a criação, produção, e uso de químicos eficientes e efetivos mais benignos para o ambiente.<sup>15</sup> O maior desafio nestes processos é garantir a mesma qualidade do produto que seria produzido através de síntese química, uma vez que os produtos naturais têm limitações estéticas e uma maior instabilidade associadas.<sup>16</sup> Nestes emulsificantes é necessária a adição de um conservante e são exemplos as ceras derivadas de plantas, a Lecitina e a Lanolina.<sup>17</sup>

A última classe são os emulsificantes em silicone. Os silicones não são solúveis em água ou óleos e, por isso, só podem ser introduzidos em formulações através da modificação química do silicone, o que aumenta a sua solubilidade em água, ou através de emulsões de silicone. Estes emulsificantes são mais estáveis numa emulsão A/S, ou seja, numa emulsão na qual o silicone é a fase contínua e a fase dispersa é água.<sup>2</sup>



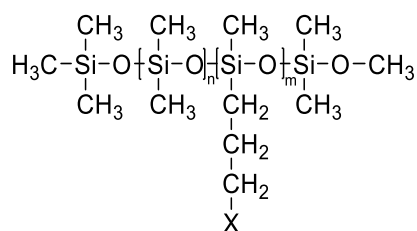
**Figura 18.** Emulsão A/S (água em silicone) (Imagem criada em *Biorender.com*).

A estabilidade do silicone é dificultada pela sua origem, uma vez que este é derivado de uma micela, que é um agregado de tensoativos que se forma quando ultrapassada a concentração micelar crítica. Os tensoativos agregam-se, num determinado solvente, até formar uma monocamada saturada. A polaridade do solvente pode variar, o que leva à formação de micelas normais, num solvente polar, ou micelas invertidas, num solvente apolar, sendo que ambas as estruturas se encontram representadas na figura 19. Este tipo de emulsões pode ser utilizado em formulações com aplicação capilar ou tópica.<sup>14</sup>



**Figura 19.** Micela normal (A) e micela invertida (B)<sup>18</sup> (Imagem criada em *Biorender.com*).

Os emulsificantes em silicone foram desenvolvidos para estabilizar as emulsões com silicone, sendo que estes são constituídos por uma parte solúvel em silicone (siloxano) e outra solúvel em água (parte hidrofílica) e óleo (hidrocarboneto). Estes emulsificantes, escolhidos através do conceito 3D HBL<sup>19</sup>, têm propriedades de silicone, como por exemplo, a sensação de toque na pele e a baixa irritação provocada quando aplicado.<sup>20</sup>

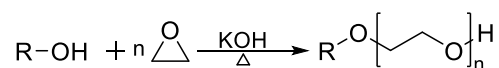


**Figura 20.** Estrutura geral de um emulsificante de silicone (X representa a modificação hidrofílica)<sup>19</sup>.

## 1.4 Síntese de emulsificantes

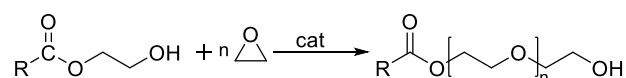
Os emulsificantes naturais tornam-se cada vez mais comuns, mas ainda não substituem os restantes emulsificantes utilizados nas mais variadas formulações cosméticas. O vasto número de compostos disponíveis faz com que a síntese destes seja necessariamente diferente, dependendo da classe de emulsificante que integram.

Na classe de emulsificantes O/A, os emulsificantes não iónicos O/A são o grupo mais representativo e são exemplificados pelos álcoois gordos etoxilados e ésteres de ácidos gordos etoxilados. Estes compostos são sintetizados através de reações de etoxilação (figura 21). Estas consistem na reação entre álcoois de ácidos gordos e o epóxi-etano para formar álcoois gordos etoxilados, sendo catalisada por hidróxido de potássio, a uma temperatura de 150°C.<sup>21</sup>



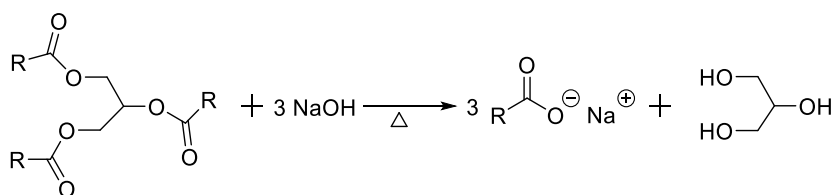
**Figura 21.** Esquema de síntese de álcoois gordos etoxilados, catalisada por KOH, a uma temperatura de 150°C.<sup>21</sup>

Antigamente, os álcoois gordos etoxilados eram obtidos através da reação de hidrogenação de ácidos gordos, mas como a maioria são oxo-ácidos, nos dias de hoje são obtidos através de reações de hidroformilação. Estas reações consistem na síntese de um aldeído, a partir de um alceno, monóxido de carbono e hidrogénio molecular, com catalisador metálico e a uma temperatura entre 40°C e 300°C. O aldeído sintetizado é posteriormente reduzido a álcool, caso a reação aconteça a temperatura elevada. O processo de síntese de ésteres de ácidos gordos etoxilados é bastante semelhante, no entanto o reagente inicial é um éster, como representado na figura 22.<sup>22</sup>



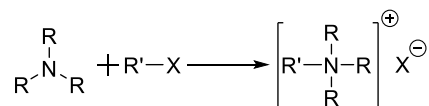
**Figura 22.** Esquema de síntese de ésteres de ácido etoxilados, com recurso a um catalisador metálico, a uma temperatura entre 40°C e 300°C e alta pressão, entre 10 e 100 atm (adaptado de <sup>23</sup>).

Os sabões alcalinos, os exemplos mais relevantes de emulsificantes aniónicos O/A, são sintetizados através de reações de saponificação, ou seja, uma reação entre um éster, como por exemplo um triglicerídeo, e uma base forte, que origina o sabão alcalino e glicerol (figura 23).<sup>23</sup>



**Figura 23.** Esquema de síntese de sabões alcalinos com aquecimento, à temperatura ambiente.<sup>23</sup>

Os emulsificantes catiónicos O/A, representados pelos sais de amónio quaternários são sintetizados através de uma reação de acoplamento, a reação de *Menshutkin*. Esta reação converte uma amina terciária num sal de amónio quaternário, através da reação da amina com um haloalcano, à temperatura ambiente.<sup>24</sup>



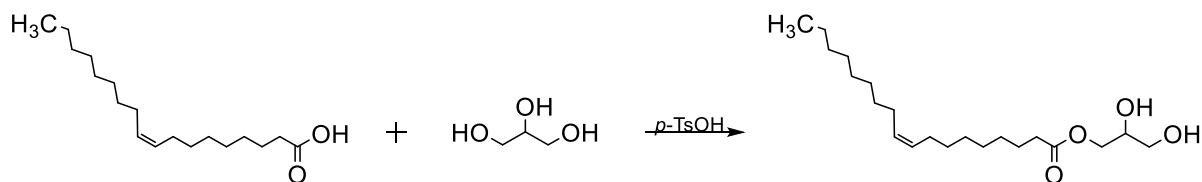
**Figura 24.** Esquema representativo da reação de *Menshutkin* à temperatura ambiente, *overnight* (adaptado de <sup>24</sup>).

Na classe dos emulsificantes A/O, os emulsificantes A/O não iónicos têm como exemplo mais relevante a Lanolina e os seus derivados. A Lanolina é um produto natural obtido na limpeza da lã dos carneiros, com um aspeto de graxa amarela (figura 25) e cuja composição inclui hidrocarbonetos e ésteres, sintetizados a partir de álcoois e ácidos presentes. Os ésteres produzidos podem ser os mais variados, uma vez que estes compostos variam quer no tamanho da cadeia, quer na parte alcoólica, o que confere à Lanolina uma textura mais líquida ou mais sólida, consoante os reagentes de partida.<sup>2</sup>



**Figura 25.** Lanolina (<https://guiadafarmacia.com.br/lanolina-saiba-o-que-e-e-quais-as-indicacoes-de-uso/>).

Outro exemplo de emulsificantes A/O não iónicos são alguns ésteres ou poliésteres de álcoois. Os compostos mais relevantes neste grupo são os monoglicerídeos, exemplificado pelo monooleato de glicerol. Este composto é sintetizado através da reação de esterificação entre um ácido carboxílico e um álcool. No caso da síntese do monooleato de glicerol, a reação ocorre entre o ácido oleico e o glicerol, em meio ácido, ou seja, catalisado pelo ácido *p*-toluenossulfónico (figura 26).<sup>25</sup>



**Figura 26.** Esquema de síntese da reação de esterificação catalisada pelo ácido *p*-toluenossulfónico, a uma temperatura de 140°C, durante 90 minutos.<sup>25</sup>

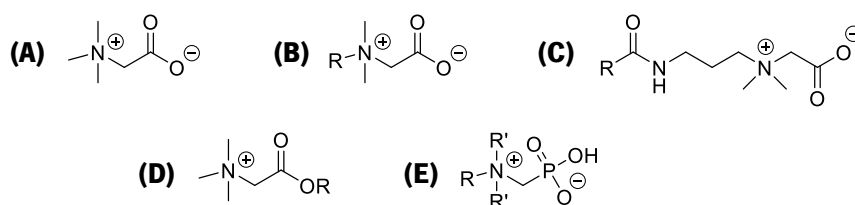
A Lecitina e os derivados de Betaina são os exemplos mais comuns de emulsificantes anfotéricos. A Lecitina é um emulsificante natural, uma vez que se encontra em tecidos animais ou vegetais e pode ser extraída facilmente com recurso a solventes como o hexano ou a acetona. Esta

também pode ser sintetizada a partir do óleo de soja, por precipitação, o que resulta na Lecitina no estado sólido. A composição química deste composto envolve uma mistura de lípidos, e deste modo, dependendo dos lípidos que a constituem, esta pode ter diferentes aspetos (figura 27).<sup>26</sup>



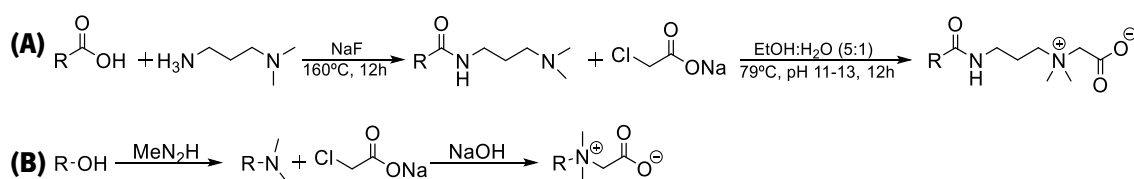
**Figura 27.** Lecitina granulada (<https://www.medicalnewstoday.com/articles/319260>) e Lecitina líquida (<https://www.ingredientsnetwork.com/sunflower-lecithin-liquid-nongmo-allergen-free-prod1237120.html>).

Os derivados de Betaina são outro exemplo de emulsificantes anfotéricos e alguns derivados são a C-álquil betaina, Alquil aminopropil betaina, fosfobetaina e éster de betaina, que se encontram representados na figura 28, bem como a estrutura da Betaina.<sup>27,28</sup>



**Figura 28.** Estrutura da Betaina (A), C-álquil betaina (B), alquil aminopropil betaina (C), éster de betaina (D) e fosfobetaina (E).<sup>27,28</sup>

A síntese dos derivados de Betaina pode ser realizada a partir de ácidos gordos, como a alquil aminopropil betaina ou a partir de álcoois gordos, como a C-álquil betaina (Figura 29).<sup>28</sup>

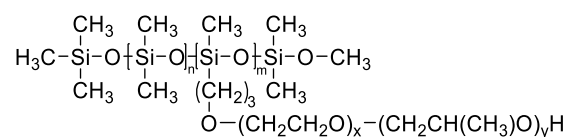


**Figura 29.** Esquema sintético de alquil aminopropil betaina (A) e de C-álquil betaina (B).<sup>28</sup>

As alternativas aos emulsificantes comuns, os polímeros, são bastante diversos e têm processos de síntese bastante diferentes. O exemplo referido, a Hidroxipropilmetilcelulose, é sintetizado a partir da celulose com clorometano e óxido de propileno. Os restantes emulsificantes são sintetizados a partir de reações de polimerização, isto é, a partir da adição ou condensação de monómeros.<sup>2</sup>

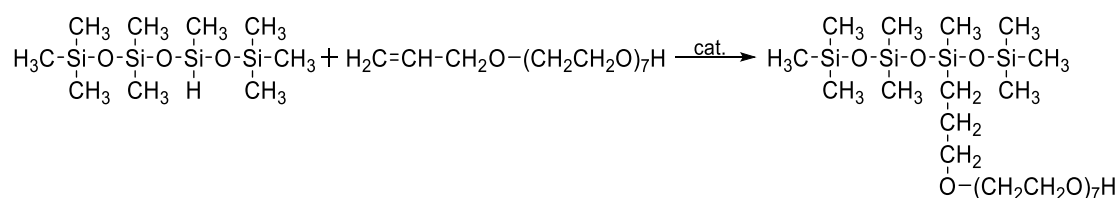
A Dimeticone copoliol é a classe de emulsificantes em silicone mais relevante e que tem sido o composto chave na indústria destes. A nomenclatura dos compostos tem como base a sua estrutura,

uma vez que este é constituído por um polímero de silicone, a dimeticone, um co-polímero e um grupo hidroxilo (figura 30).<sup>29</sup>



**Figura 30.** Estrutura representativa da dimeticone copoliol.<sup>29</sup>

A estrutura representada é um polímero de dimetilsiloxano com cadeias laterais de polietilenoglicol ou polioxopropileno. A síntese deste composto ocorre através de uma reação de hidrosililação, que adiciona às ligações *Si-H* compostos insaturados, normalmente catalisada por Níquel (figura 31).<sup>29</sup>



**Figura 31.** Reação de hidrosililação.<sup>29</sup>

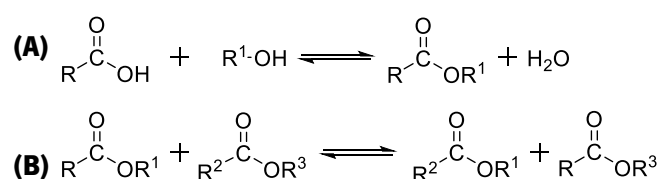
A estrutura deste composto é bastante suscetível a modificações, o que permite a síntese de compostos com as mais variadas propriedades. Isto acontece pela ligação do silicone a três grupos metileno, que têm a função de tornar a ligação entre o silício e o carbono estável. A presença de unidades variáveis na molécula determina algumas propriedades do composto. Exemplo destas propriedades são o tipo de emulsão que o emulsificante estabiliza (água em silicone ou silicone em água), o brilho ou a sensação ao toque.<sup>30</sup>

Os catalisadores, utilizados na maioria das sínteses destes compostos, são ácidos ou metais, o que apresenta algumas desvantagens, como a elevada temperatura reacional ou o uso de produtos perigosos para o ambiente. Face à necessidade da implementação de novas estratégias sintéticas, que respeitem os princípios da química verde, os catalisadores utilizados nas reações de síntese de emulsificantes são alterados, tornando-se cada vez mais comum a biocatálise. Estas reações utilizam enzimas como catalisadores, o que se traduz em vantagens como a seletividade e a estereoespecificidade da enzima, que não se verifica com os outros catalisadores, uma vez que, em muitas reações é formada uma mistura de estereoisómeros. O menor consumo de energia nas reações é outra vantagem associada à catálise enzimática, o que permite que reações ocorram em condições mais sustentáveis, uma vez que as enzimas catalisam reações a temperatura e pressão bastante mais baixas que os catalisadores químicos, podendo mesmo ocorrer a temperatura e pressão ambiente.<sup>31,32</sup>



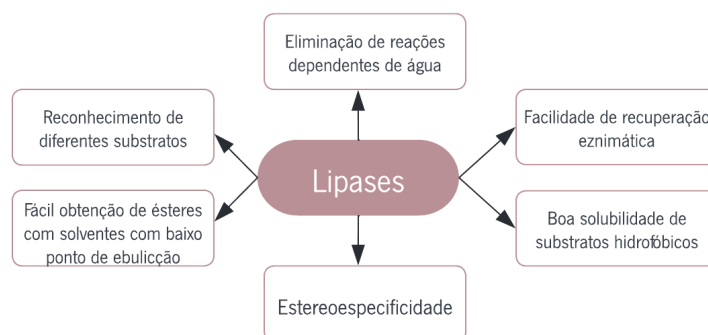
## 1.5 Lipases na síntese de ésteres

A síntese de ésteres pode ocorrer através de reações de esterificação ou de transesterificação, ilustradas na figura 32. O produto secundário destas reações é a água, que favorece a reação inversa, o que torna essencial a remoção de água neste tipo de reações, que pode acontecer através do uso de solventes orgânicos como o heptano ou hexano, do uso de crivos moleculares, ou da remoção de solventes na reação. A síntese industrial de ésteres ocorre a temperaturas muito elevadas, entre 150°C e 240°C, o que gera produtos que necessitam de tratamento adicional para aplicação cosmética. As enzimas são utilizadas como catalisadores nas reações com o objetivo de sintetizar produtos puros, sem cor ou odor, a uma temperatura reacional bastante inferior, entre 30°C e 70°C.<sup>33</sup>



**Figura 32.** Reações de síntese de ésteres - **(A)** esterificação e **(B)** transesterificação. <sup>33,34</sup>

As lipases são as enzimas mais utilizadas na síntese de ésteres. Estas enzimas têm origem maioritária em microorganismos, mas também podem ser produzidas industrialmente a partir de células microbianas, devido à facilidade de controlo e o menor custo associado à sua produção. Os microorganismos mais utilizados para a produção de lipases são os fungos do género *Aspergillus*, bactérias do género *Pseudomonas* e leveduras do género *Candida*.<sup>34</sup>



**Figura 33.** Vantagens do uso de lipases em reações de síntese de ésteres (adaptado de <sup>35</sup>).

Este tipo de enzimas tem inúmeras vantagens associadas (figura 33), sendo destaque a capacidade de sintetizar apenas um dos enantiómeros, relevante pelas diferentes propriedades adquiridas por cada composto.<sup>35</sup> No entanto, apesar das inúmeras vantagens associadas, o uso de lipases apresenta alguns inconvenientes como as restrições de enzimas livres em processos industriais, a estabilidade térmica e/ou em baixos valores de pH e a perda de atividade catalítica após a utilização. De modo a superar as desvantagens associadas ao seu uso, é utilizada a técnica de

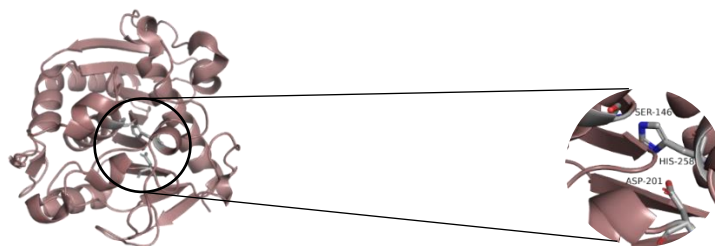
imobilização enzimática, ou seja, a enzima fica restrita a uma determinada região e ligada a um suporte sólido inerte, no qual passa o substrato e este é convertido em produto. Os dois métodos mais relevantes de aplicação desta técnica são a ligação covalente e a adsorção física. No método de adsorção física (figura 34-A) a enzima é imobilizada num suporte através de ligações fracas, tais como pontes de hidrogénio ou forças de *Van der Waals*, e caso o suporte seja hidrofóbico, a sua atividade aumenta devido a alterações conformacionais que tornam estável a sua conformação aberta. No método de ligação covalente (figura 34-B), a estabilidade da enzima é aumentada pelas ligações covalentes entre os grupos tiol e amina da enzima e os grupos ativos do suporte.<sup>36</sup>



**Figura 34.** Representação esquemática do método de adsorção física **(A)** e ligação covalente **(B)** (Imagem criada em *Biorender.com*).

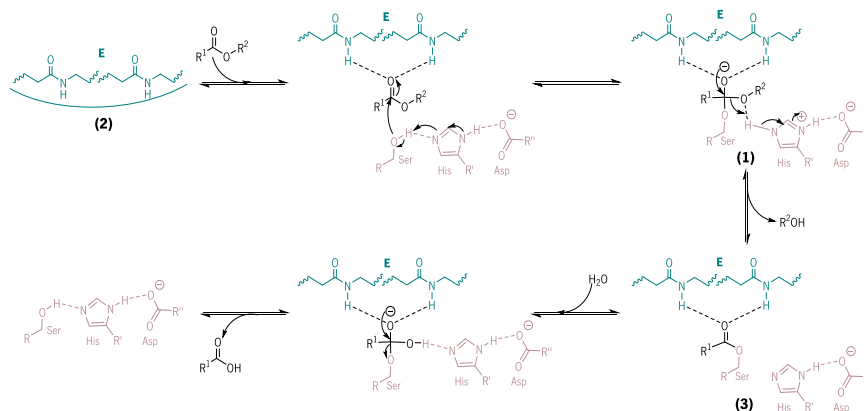
As lipases utilizadas como catalisadores pertencem à classe das enzimas serinas hidrolases, que são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos gordos, bem como a reação inversa, ou seja, a esterificação da molécula de glicerol com ácidos gordos em sistemas com pouca água. Estes biocatalisadores atuam na interface de sistemas bifásicos, em que o substrato é um agregado de moléculas de éster ou micelas que fazem interface com um meio aquoso, sendo este fenómeno denominado como ativação interfacial. A relevância destas enzimas na síntese de novos compostos está relacionada com a sua estabilidade em solventes orgânicos, a inexistência de produtos de reação secundários e a desnecessidade de cofatores ou coenzimas.<sup>37</sup>

A estrutura da lipase é bastante relevante para compreender o seu mecanismo de ação. O centro ativo, a região da enzima na qual ocorrem as reações, é composta por uma determinada sequência de aminoácidos. Neste, a tríade catalítica é composta por um resíduo de serina, um resíduo de histidina e um resíduo de aspartato, que pode ser substituído por um resíduo de glutamato (figura 35). Uma estrutura composta por uma sequência peptídica de  $\alpha$ -hélice, denominada tampa (*lid*), cobre o centro ativo da enzima e impede a ligação do substrato à tríade catalítica, na sua conformação fechada, ou seja, na ausência de solvente ou da interface lípido/água. No entanto, quando em contacto com interfaces hidrofóbicas, ou seja, quando o substrato se liga à superfície da enzima, essa tampa move-se e torna o centro ativo acessível ao substrato, o que causa a exposição de uma grande superfície hidrofóbica e confere funcionalidade à enzima, pois facilita a ligação do substrato à lipase.<sup>37</sup>



**Figura 35.** Representação tridimensional da tríade catalítica (cinzento) numa lipase serina hidrolase. A enzima encontra-se representada em *cartoon* castanho. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagem obtida com recurso ao programa *PyMol*, PDB:1TIB).

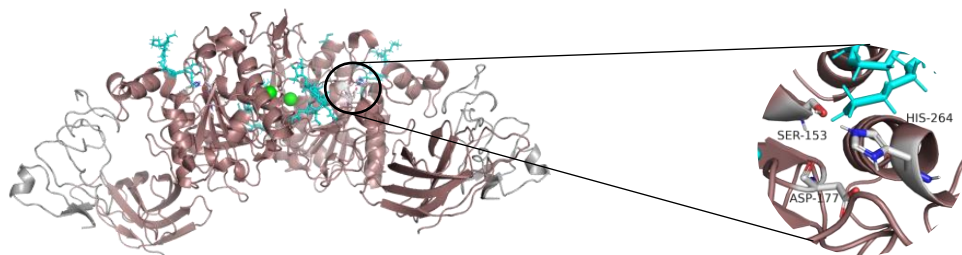
O mecanismo de ação das lipases (figura 36) tem início com uma reação de acilação, na qual são transferidos prótons entre os resíduos da tríade catalítica, o que provoca a ativação do grupo hidroxilo da serina. O resíduo de serina, que atua como nucleófilo, ataca o grupo carbonilo do substrato e forma o primeiro intermediário tetraédrico **(1)**. A carga negativa é estabilizada pela cavidade de oxianião **(2)** através das ligações de hidrogénio das amidas da lipase. O passo seguinte prende-se com a libertação do álcool, previamente ligado ao intermediário, enquanto o substrato continua ligado ao resíduo de serina e forma o complexo acil-substrato **(3)**. A desacilação ocorre de seguida quando o nucleófilo ataca a enzima, o que conduz ao último passo da reação, que é a libertação do produto reacional e a regeneração da enzima.<sup>37,38</sup>



**Figura 36.** Ciclo catalítico da hidrólise do éster pela lipase. A tríade catalítica encontra-se representada a rosa, a enzima a azul e o éster/ácido/álcool a preto (adaptado de <sup>37</sup>).

No grupo das lipases com origem em microorganismos/organismos, destaca-se a lipase *porcine pancreas*, que é extraída do pâncreas do porco. Esta é uma pequena proteína globular (figura 37) constituída apenas por uma cadeia, sendo que a estrutura tridimensional revelou dois domínios bem definidos. O domínio *N*-terminal que contém a tríade catalítica e o domínio *C*-terminal, que contém os resíduos da colipase, uma coenzima proteica necessária para a atividade da lipase pancreática, representado a cinzento na figura 37. A estrutura revelou ainda duas alças, que ligam as hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$ , que bloqueiam o sítio catalítico. No entanto, a conformação aberta, que torna funcional a

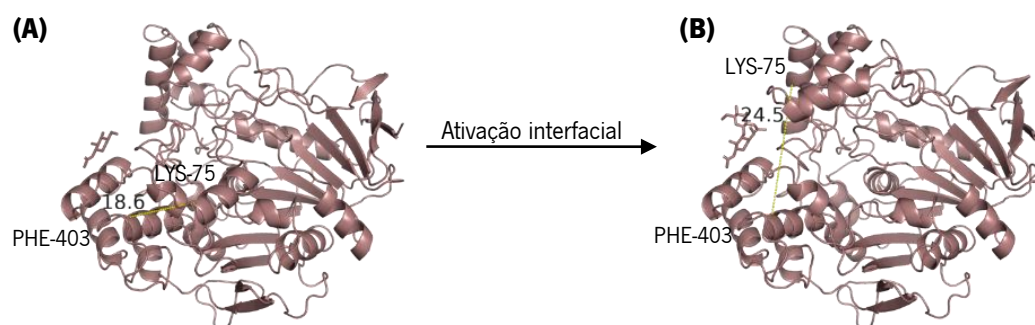
lipase, é estabilizada por pontes de hidrogénio entre a estrutura que impede a ligação do substrato à triade catalítica e a colipase.<sup>39</sup>



**Figura 37.** Representação tridimensional da estrutura da lipase nativa da *porcine pancreas* na conformação aberta. A enzima encontra-se representada em *cartoon* castanho e a triade catalítica a cinzento. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagem obtida com recurso ao programa *PyMol*, PDB:1ETH).<sup>40</sup>

Esta lipase é uma das mais utilizadas nas reações de biotransformação, devido à sua elevada estabilidade termodinâmica em temperaturas elevadas, alta seletividade e alta atividade catalítica em inúmeras reações com variados solventes. O uso desta lipase na síntese de monoacilgliceróis torna-a bastante relevante na indústria farmacêutica, como aglutinante em comprimidos e na indústria cosmética, como emulsificantes em formulações cosméticas.<sup>36,39</sup>

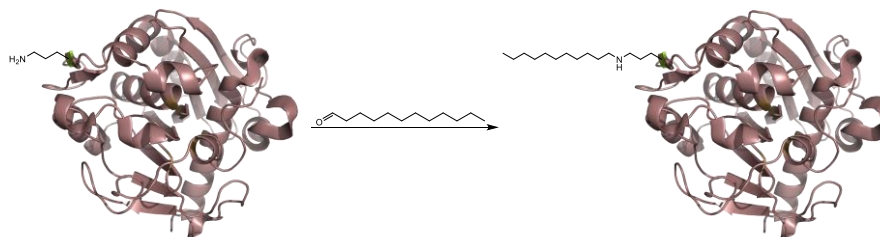
No grupo das lipases produzidas a partir de células microbianas são mais relevantes as lipases produzidas por leveduras do género *Candida* e fungos do género *Aspergillus*. O exemplo com maior destaque das lipases produzidas por leveduras do género *Candida* é a lipase da *Candida rugosa*, sendo esta lipase produzida através do processo de fermentação das leveduras. A estrutura da lipase é bastante semelhante às referidas, ou seja, tem estruturas de hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$ , intercaladas com resíduos catalíticos no centro. Possui dois terminais e a tampa que cobre o centro ativo, na conformação fechada, é constituída por hélices  $\alpha$  de tamanho inferior (figura 38). A triade catalítica, formada por um resíduo de serina, histidina e glutamato, é exposta quando a enzima entra em contacto com interfaces ou substâncias hidrofóbicas, o que torna a enzima funcional e estável na conformação aberta.<sup>41,42</sup>



**Figura 38.** Lipase da *Candida rugosa* na conformação fechada (A) (PDB: 1TRH) e na conformação aberta (B) (PDB: 1CRL) com a distância entre os resíduos de extremo da cavidade evidenciada (Imagem obtida com recurso ao programa *PyMol*).<sup>41,42</sup>

Esta lipase é normalmente utilizada na sua forma imobilizada, pois no seu estado natural, é líquida, pouco estável e de difícil manuseamento. A lipase tem aplicação prática em várias indústrias, mas destacam-se a indústria farmacêutica e a cosmética, pela sua alta atividade e especificidade na síntese de ésteres e ácidos gordos.<sup>41</sup>

As enzimas produzidas a partir de fungos do género *Aspergillus* são as mais diversas, sendo um dos exemplos a lipase formada a partir de *Aspergillus oryzae*. Esta lipase revelou-se promissora na síntese de ésteres através da reação entre vários ácidos e álcoois de cadeia curta.<sup>43</sup> Outra função deste fungo é a produção da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, a partir de uma estirpe recombinante, sendo esta enzima, na sua forma isolada, a Lipolase® responsável pela hidrólise de triacilgliceróis, isto é, a parte com função de lipase ativa para hidrólise. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é 1,3-estereoespecífica, ou seja, hidrolisa o grupo éster de trigliceróis na posição 1 e na posição 3.<sup>44</sup> A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é utilizada na sua forma imobilizada, com suportes sólidos de imobilização, mas estes suportes podem ter o contra de reduzir a atividade enzimática pela restrição de mobilidade imposta. Deste modo, a estratégia mais utilizada para a amplificação das propriedades enzimáticas é a modificação da superfície da enzima com pequenas moléculas. Nos últimos anos, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi modificada com compostos de comprimentos de cadeia e hidrofobicidade diferentes, que se ligam aos resíduos de lisina da superfície. A interação com aminoácidos hidrofóbicos próximos ao centro ativo torna a tampa mais instável e alarga a cavidade onde se encontra a tríade catalítica, resultando num aumento do desempenho catalítico da lipase. Um dos ligandos que revelou uma melhoria significativa na estabilidade e atividade da enzima em reações de esterificação e transesterificação foi o dodecil aldeído (figura 39).<sup>44,45</sup>



**Figura 39.** Representação da lipase da *Aspergillus oryzae* modificada com o dodecil aldeído. A enzima encontra-se representada em *cartoon* castanho e o resíduo de lisina 98 modificado a verde (Imagem obtida com recurso ao programa *PyMol*, PDB:1TIB/1TIB modificada).<sup>44</sup>

A modificação da enzima revelou uma melhoria no desempenho desta, o que a torna uma potencial técnica a ser utilizada nas mais variadas indústrias, desde o biodiesel à cosmética, visto que é mais económica e eficiente.<sup>44,45</sup>

---

## Materiais e Métodos

## 2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram comercializados por diversas marcas. O etanol, a acetona e o acetato de etilo foram adquiridos à *Fischer Chemicals*. O hidrogenofosfato de sódio e o hidróxido de sódio foram adquiridos à marca *Panreac*. O cianoborohidreto de sódio, hidrogenofosfato de sódio, dodecil aldeído, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, dihidrogenofosfato de potássio, hidróxido de sódio e sulfato de magnésio à marca *Sigma Aldrich* e o cloreto de sódio foi adquirido à marca *Labkem*. O ácido octanóico, o ácido decanóico, o ácido palmítico, o ácido oleico, o ácido linoleico, o etilenoglicol, o 1,3-propanediol, o dietilenoglicol, o trietilenoglicol, o polietilenoglicol 200 (PEG200), o 2-(2-etoxietoxi)etanol (transcutol) e o 2-etoxietanol utilizados na síntese de ésteres foram adquiridos à marca *TCl Chemicals*. O solvente utilizado, o *n*-heptano foi adquirido à marca *Fischer Chemicals* e foi seco com crivos moleculares antes da sua utilização na síntese de ésteres.

As três enzimas envolvidas neste trabalho foram comercializadas pela marca *Sigma*, sendo elas a lipase nativa da *Aspergillus oryzae* (>100000 U/g), a lipase nativa da *Candida rugosa* (> 700 U/mg) e a lipase nativa da *porcine pancreas* (46 U/mg) e foram utilizadas após o processo de ultrafiltração usando um sistema de ultrafiltração – *UF Stirred Cell 47mm* - da marca *Millipore* com uma membrana de 10 kDa e liofilização (*Labconco Freezone 2,5* e bomba de vácuo *Welch*).

No processo de emulsificação foi necessário preparar uma solução fosfato-salino (PBS) 10x (pH = 7,4), que foi preparada pesando 40,031g de cloreto de sódio, 1,0064g de cloreto de potássio, 7,700g de hidrogenofosfato de sódio e 0,9526g de dihidrogenofosfato de potássio dissolvidos em água ultrapura, num volume total de 500 mL.

### 2.1.1 Modificação da lipase nativa da *Aspergillus oryzae*

A modificação da lipase nativa da *Aspergillus oryzae* foi feita através de uma reação *overnight*, a 4°C, com 2 mL da lipase nativa da *Aspergillus oryzae*, 5 mL de uma solução de cianoborohidreto de sódio (0,02 M) e hidrogenofosfato de sódio (0,1 M) e 240 µL de dodecil aldeído. Posteriormente, após filtração por gravidade, a enzima ultrafiltrada, sendo obtida na forma de um sólido branco, após liofilização (*Labconco Freezone 2,5* e bomba de vácuo *Welch*). A atividade da enzima foi confirmada através do procedimento descrito na literatura.<sup>44</sup>

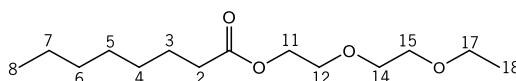
### 2.1.2 Síntese de ésteres com solvente

Num frasco com 5 mg de enzima, adicionou-se 0,95 mmol de ácido carboxílico (ácido oleico, ácido octanóico, ácido linoleico, ácido decanóico ou ácido palmítico) com 1 equivalente de álcool (etilenoglicol, dietilenoglicol, trietilenoglicol, 1,3-propanediol, PEG200 ou 2-etoxietanol), à exceção do 2-(2-etoxietoxi)etanol, que foram utilizados 1,2 equivalentes. Em seguida foram adicionados 3 mL de *n*-heptano e a suspensão foi colocada num banho de parafina, a 37°C, com agitação. A reação foi controlada por uma titulação ácido-base em diferentes intervalos de tempo. Para isso, foram retirados 100 µL da mistura reacional para um balão de 5 mL, perfazendo o volume com uma solução de acetona/etanol (1:1). A solução foi titulada com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 20 mM e o ponto de equivalência foi determinado com o uso do indicador fenolftaleína 0,5% (m/v). A enzima foi removida através de filtração por gravidade, e o *n*-heptano evaporado por pressão reduzida num evaporador rotativo (*Heidolph*), a 60°C. Posteriormente, o óleo obtido foi dissolvido em acetato de etilo e transferido para um funil de separação, sendo lavado com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio 5% e com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e evaporada a 40°C sob pressão reduzida, com recurso ao evaporador rotativo.

Seguindo o protocolo anterior, foram sintetizados seis ésteres, na sua forma pura, com sucesso, que foram posteriormente caracterizados (Apêndice B):

#### a) Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etilooctanoato (6a)

Num frasco com 5 mg de enzima (lipase da *Aspergillus oryzae* modificada) foi adicionado ácido octanóico (151 µL), 2-(2-etoxietoxi)etanol (153 µL) e heptano. O produto **6a** foi obtido na forma de óleo incolor ( $\eta=72\%$ ).



**<sup>1</sup>H RMN(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):** 4.22 (dd,  $J = 6.0, 4.8$  Hz, 2H, H11), 3.70-3.68 (m, 2H, H12), 3.65-3.63 (m, 2H, H14), 3.59-3.57 (m, 2H, H15), 3.52 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H17), 2.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H2), 1.65-1.57 (m, 2H, H3), 1.32-1.24 (m, 8H, H4-7), 1.20 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H, H18), 0.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H8).

**FTIR-ATR ν (cm<sup>-1</sup>):** 2926-2860 (CH<sub>2</sub> alifáticos), 1740 (C=O), 1460-1370 (CH<sub>3</sub>), 1120 (C-O)

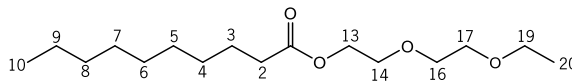
**HRMS calculada:** 261,3840 g/mol (MH<sup>+</sup>)

**HRMS obtida:** 261,2078 g/mol (MH<sup>+</sup>)



**b) Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (6b)**

Num frasco com 5 mg de enzima (lipase da *Aspergillus oryzae* modificada) foi adicionado ácido decanoico (183 µL), 2-(2-etoxietoxi)etanol (153 µL) e heptano. O produto **6b** foi obtido na forma de óleo incolor ( $\eta=68\%$ ).



**<sup>1</sup>H RMN(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):** 4.22 (dd,  $J = 6.0, 4.8$  Hz, 2H, H13), 3.71-3.68 (m, 2H, H14), 3.65-3.63 (m, 2H, H16), 3.59-3.57 (m, 2H, H17), 3.52 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H19), 2.32 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H2), 1.65-1.57 (m, 2H, H3), 1.34-1.23 (m, 12H, H4-9), 1.20 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H20), 0.87 (t,  $J = 6.4$  Hz, 3H, H10).

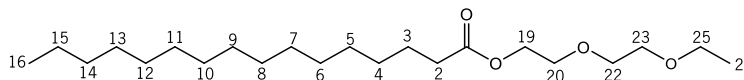
**FTIR-ATR ν (cm<sup>-1</sup>):** 2930-2850 (CH<sub>2</sub> alifáticos), 1740 (C=O), 1466 (CH<sub>3</sub>), 1120 (C-O)

**ESI calculada:** 289,43 g/mol (MH<sup>+</sup>)

**ESI obtida:** 288,95 g/mol (MH<sup>+</sup>)

**c) Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (6c)**

Num frasco com 5 mg de enzima (lipase da *Aspergillus oryzae* modificada) foi adicionado ácido palmítico (243,6 mg), 2-(2-etoxietoxi)etanol (153 µL) e heptano. O produto **6c** foi obtido na forma de sólido branco ( $\eta=68\%$ ).



**<sup>1</sup>H RMN(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):** 4.24-4.22 (m, 2H, H19), 3.71-3.69 (m, 2H, H20), 3.66-3.63 (m, 2H, H22), 3.60-3.57 (m, 2H, H23), 3.53 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H25), 2.32 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H2), 1.61 (quint.,  $J = 6.8$  Hz 2H, H3), 1.35-1.24 (m, 24H, H4-15), 1.21 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, H26), 0.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H16).

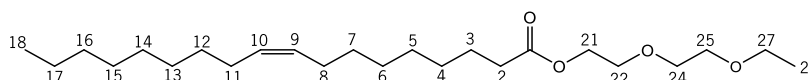
**FTIR-ATR ν (cm<sup>-1</sup>):** 2920-2850 (CH<sub>2</sub> alifáticos), 1736 (C=O), 1476 (CH<sub>3</sub>), 1116 (C-O)

**ESI calculada:** 373,59 g/mol (MH<sup>+</sup>)

**ESI obtida:** 373,05 g/mol (MH<sup>+</sup>)

**d) Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (6d)**

Num frasco com 5 mg de enzima (lipase da *Aspergillus oryzae* modificada) foi adicionado ácido oleico (300 µL), 2-(2-etoxietoxi)etanol (153 µL) e heptano. O produto **6d** foi obtido na forma de óleo incolor ( $\eta=68\%$ ).



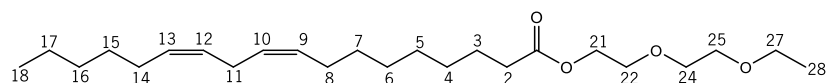
**<sup>1</sup>H RMN(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):** 5.35-5.32 (m, 2H, H9, H10), 4.24-4.22 (m, 2H, H21), 3.71-3.69 (m, 2H, H22), 3.66-3.63 (m, 2H, H24), 3.60-3.57 (m, 2H, H25), 3.53 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, H27), 2.32 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H2), 2.01-1.98 (m, 4H, H8, H11), 1.66-1.58 (m, 2H, H3), 1.37-1.24 (m, 20H, H4-7, H12-17), 1.21 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H28), 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, H18).

**FTIR-ATR ν (cm<sup>-1</sup>):** 3016 (C=C-H), 2926-2860 (CH<sub>2</sub> alifáticos), 1740 (C=O), 1460-1370 (CH<sub>3</sub>), 1120 (C-O)

**HRMS calculada:** 399,6280 g/mol (MH<sup>+</sup>)      **HRMS obtida:** 399,3504 g/mol (MH<sup>+</sup>)

#### e) Síntese do 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (6e)

Num frasco com 5 mg de enzima (lipase da *Aspergillus oryzae* modificada) foi adicionado ácido linoleico (293 µL), 2-(2-etoxietoxi)etanol (153 µL) e heptano. O produto **6e** foi obtido na forma de óleo incolor (η=75%).



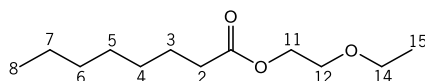
**<sup>1</sup>H RMN(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):** 5.42-5.29 (m, 4H, H9, H10, H12, H13), 4.24-4.22 (m, 2H, H21), 3.71-3.69 (m, 2H, H22), 3.66-3.63 (m, 2H, H24), 3.60-3.58 (m, 2H, H25), 3.53 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, H27), 2.76 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H11), 2.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H2), 2.07-2.02 (m, 4H, H8, H14), 1.66-1.58 (m, 2H, H3), 1.39-1.25 (m, 14H, H4-7, H15-17), 1.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, H28), 0.88 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, H18).

**FTIR-ATR ν (cm<sup>-1</sup>):** 3026 (C=C-H), 2940-2860 (CH<sub>2</sub> alifáticos), 1740 (C=O), 1460-1380 (CH<sub>3</sub>), 1130 (C-O)

**HRMS calculada:** 397,6120 g/mol (MH<sup>+</sup>)      **HRMS obtida:** 397,3345 g/mol (MH<sup>+</sup>)

#### f) Síntese do 2-etoxietiloctanoato (7a)

Num frasco com 5 mg de enzima (lipase da *Aspergillus oryzae* modificada) foi adicionado ácido octanóico (151 µL), 2-etoxietanol (92 µL) e heptano. O produto **7a** foi obtido na forma de óleo incolor (η=72%).



**<sup>1</sup>H RMN(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):** 4.21 (dd, *J* = 6.0, 4.8 Hz, 2H, H11), 3.63-3.61 (m, 2H, H12), 3.53 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, H14), 2.33 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H2), 1.65-1.58 (m, 2H, H3), 1.34-1.23 (m, 8H, H4-7), 1.21 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H15), 0.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H8).

**FTIR-ATR  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2940-2870 ( $\text{CH}_2$  alifáticos), 1740 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1480-1360 ( $\text{CH}_3$ ), 1120 ( $\text{C}-\text{O}$ )

**ESI calculada:** 217,32 g/mol ( $\text{MH}^+$ )

**ESI obtida:** 217,01 g/mol ( $\text{MH}^+$ )

### 2.1.3 Síntese de ésteres sem solvente

A síntese dos ésteres sintetizados com sucesso foi posteriormente realizada sem solvente, utilizando a lipase modificada da *Aspergillus oryzae*. O protocolo foi semelhante ao referido anteriormente, para as reações com solvente.

### 2.1.4 Caracterização dos ésteres sintetizados

A caracterização dos produtos sintetizados foi realizada com recurso a técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O pH, o índice de refração, a viscosidade, a propagação, a polaridade, a densidade e a tensão superficial foram medições realizadas para completar a caracterização dos compostos sintetizados. O coeficiente de partição e a análise termogravimétrica foram ainda considerados na caracterização dos compostos.

#### a) Ressonância magnética nuclear (RMN)

Nesta técnica foi utilizado o espectrômetro *Bruker Avance III*, no qual foram adquiridos espectros de próton ( $^1\text{H}$  RMN) dos compostos sintetizados, com uma frequência de 400 MHz. As soluções para análise foram preparadas utilizando 20  $\mu\text{L}$  do éster sintetizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e utilizando TMS (Tetrametilsilano) como referência interna.

#### b) Espectrometria de massa

A análise das amostras **6a**, **6d** e **6e** foi feita recorrendo a uma fonte de ionização de alta resolução, a ionização por *eletrospray (ESI)*. Esta análise foi obtida num espectrômetro de massa *QqTOF Impact II<sup>™</sup>* e o processamento dos dados foi feito através do *software Data Analysis 4.2*. Os ensaios foram realizados em modo positivo e modo negativo. Em modo negativo os ensaios foram obtidos por infusão direta da amostra e em modo positivo, os ensaios foram obtidos por *flow injection analysis (FIA)*, usando um gradiente isocrático 70A:30B de 0.1% ácido fórmico em água (A) e em acetonitrilo (B), com um fluxo 10  $\mu\text{Lmin}^{-1}$ , durante 15 min. A calibração do analisador de massa foi obtida com uma solução de formato de amónio 10 mM, com uma velocidade de varrimento de 1 Hz, e num intervalo entre 100-1000  $m/z$ . As amostras para análise foram dissolvidas em acetonitrilo.

A análise das amostras **6b**, **6c** e **7a** foi realizada num sistema *HPLC Dionex Ultimate 3000* acoplado a um espectrômetro de massa *LCQ Fleet ion trap* equipado com uma fonte *ESI*, operando no modo de ionização negativo / positivo (*Thermo ScientificTM*). Aliquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram injetadas por *flow injection analysis* (FIA) usando um gradiente isocrático 30A:70B de água acidulada com 0.1% de ácido fórmico (v/v, eluente A) e metanol (eluente B). Os espectros de *full scan* foram obtidos com um intervalo de massa entre 100-1000 u, e analisados com o *software Xcalibur 2.2 SP1* da *Thermo Scientific*.

### c) Espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

A análise de FTIR foi feita com recurso a um espectrofotômetro *Bruker Alpha II* (ATR com diamante), no qual foram adquiridos espectros de absorvância, com recurso ao *software Opus*. As amostras foram analisadas entre 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e uma média de 24 scans.

### d) pH

O pH dos compostos sintetizados foi medido com recurso a um medidor de pH (*Metria M92*), a uma temperatura de 25°C, com um eletrodo adequado para soluções orgânicas.

### e) Índice de refração

A análise do índice de refração dos compostos sintetizados foi feita através de um refratômetro RX-9000CX da marca *Atago*, a uma temperatura de 25°C. O índice de refração do composto 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) não foi obtido, pois é um sólido branco à temperatura ambiente.

### f) Viscosidade

Nesta técnica a análise foi feita recorrendo a um viscosímetro *Rotavisc* da marca *IKA*. A amostra foi analisada colocando 6,7 mL desta na unidade do viscosímetro, com rotação ajustável para obter um torque de 15%. Todas as medidas foram realizadas a 25°C, à exceção do composto 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) que foi medido a 37°C, atendendo que é o seu ponto de fusão.

### g) Teste de propagação

A análise da propagação foi realizada com recurso a lâminas de bordas esmerilhadas 90°, à temperatura ambiente. No centro da lâmina foram colocados 50  $\mu\text{L}$  de cada um dos compostos sintetizados. Após 10 minutos, o comprimento e a largura de espalhamento do composto foram medidos, com recurso a uma régua, e foi calculada a área de espalhamento do composto. A propagação correspondente ao composto 2-(2-

etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) não foi obtida, pois este é um sólido branco à temperatura ambiente.

#### h) Polaridade

A polaridade na forma de energia de transição ( $E_{NR}$ ) dos compostos foi determinada com recurso ao corante *Nile Red*. As amostras para análise foram preparadas numa microplaca para a qual foram pipetados 200  $\mu$ L dos ésteres sintetizados e dos reagentes de partida e adicionado *Nile Red*, de modo a obter uma concentração de  $10^{-5}$  M. O controlo deste teste de polaridade foi feito com água destilada e com etanol, nos quais também foi adicionado o corante. O espectro de absorção de cada um dos compostos com o corante foi lido num espectrofotómetro UV-visível (espectrofotómetro *BioTek SynergyMx*), a  $60^{\circ}\text{C}$ , e a energia de transição molar dos compostos foi calculada com recurso à seguinte equação:<sup>46</sup>

$$E_{NR}: E_{NR}(\text{Kcal mol L}^{-1}) = \frac{hcNA}{\lambda_{max}} = 28591/\lambda_{max} \quad \text{(Equação 1)}$$

#### i) Coeficiente de partição

O valor do coeficiente de partição teórico para os ésteres sintetizados foi obtido através do site <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.

#### j) Densidade

A densidade dos ésteres sintetizados foi determinada com recurso a um picnómetro de  $25,00 \pm 0,01$  mL. A densidade final ( $\text{g/cm}^3$ ) calculada através da seguinte equação:

$$\rho = \frac{\text{massa}}{\text{volume}} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde a massa corresponde à diferença entre a massa do picnómetro pesado com o éster e do picnómetro vazio e o volume é o volume do picnómetro.<sup>46</sup>

#### k) Tensão superficial

A tensão superficial dos ésteres sintetizados foi determinada com recurso a um tensiómetro de força K100C da marca *KRÜSS*. O método utilizado para as medições realizadas foi o anel *Du-Noüy* de platina. O máximo de força necessária para puxar o anel através da interface corresponde ao valor da tensão superficial. O valor de tensão superficial obtido corresponde ao valor médio de cinco medições, de acordo com o método de correção de *Harkins & Jordan* utilizado pelo *software ADVANCE*. O valor de tensão superficial correspondente ao composto 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) não foi obtido, pois este composto é um sólido branco à temperatura ambiente.

## I) Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica dos compostos foi realizada através de um analisador termogravimétrico TGA 4000 da marca *PerkinElmer*. A análise dos vários compostos foi feita num intervalo de temperatura entre 30°C e 500°C, com uma taxa de aquecimento de 20°C por minuto e um fluxo de nitrogénio de 20 mL por minuto (3 bar).

### 2.1.5 Produção de nanoemulsões

Os ésteres previamente sintetizados foram utilizados para preparar nanoemulsões. Estas foram preparadas com 2,5% ou 5% do composto sintetizado numa solução tampão ou água. O tampão utilizado foi o tampão fosfato-salino (PBS) 1x, a pH = 7,4, preparado a partir de uma diluição com água ultrapura de uma solução PBS 10x. As emulsões foram produzidas utilizando um equipamento de ultrassons 20 KHz *Sonics & Materials Vibracell CV 33*, acoplado a um banho de gelo, com uma microponeta de titânio de 3 mm de diâmetro, colocada na interface água/óleo. A ultrasonicação foi realizada durante 3 minutos com uma amplitude de 40%.<sup>47</sup> As nanoemulsões foram guardadas num frigorífico a 4°C, exceto as nanoemulsões preparadas com o ácido palmítico que foram armazenadas à temperatura ambiente.

De modo a verificar a estabilidade das nanoemulsões, o pH destas foi medido mensalmente com recurso a uma fita indicadora de pH da *Metria*.

#### a) Caracterização de nanoemulsões

##### i. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Nesta técnica foi medido o diâmetro das partículas (nm), o índice de polidispersividade - PDI e o potencial zeta (mV) com recurso a um *Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)*, a 25°C. As amostras a ser analisadas foram preparadas através de uma diluição 10x das nanoemulsões. A diluição das nanoemulsões foi feita com PBS 1x (pH=7,4) ou água destilada (pH=5,6) para todas as medições do tamanho e com água destilada (pH=5,6) para todas as medições do potencial zeta. A medição do tamanho das nanopartículas foi feita com recurso a uma célula de espectrofotómetro (ZEN0040) e um tempo de calibração de 60 segundos, enquanto a medição do potencial zeta recorreu a uma célula de elétrodos (DTS1070) com um tempo de calibração de 30 segundos. A estabilidade das nanopartículas foi medida semanalmente durante o primeiro mês e posteriormente mensalmente.

## ii. Nanosight

Nesta técnica foi medida a concentração de partículas na amostra, bem como o tamanho das mesmas com recurso a um aparelho *Nanotraking analysis (NTA)* – NS500 da marca *Salisbury*. O aparelho é composto por uma câmara que permite a visualização e rastreamento das nanopartículas em suspensão e que permitiu a captura de um vídeo de 60 segundos. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, sendo que nesta técnica apenas foram analisadas as amostras em água que se revelaram estáveis durante 4 semanas por DLS (compostos **6b**, **6d**, **6e** e **7a**). As amostras analisadas foram previamente diluídas com água destilada, com um fator de diluição 10x, no caso do éster **6b** e **7a** e 100x, no caso do éster **6d** e **6e**. As amostras foram posteriormente injetadas no sistema e analisadas.

### 2.1.6 Encapsulação do corante *Nile Red*

Nos ensaios de encapsulação do corante *Nile Red* apenas foram utilizados os compostos que formaram emulsões mais estáveis, ou seja, os compostos 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**), 2-(2-etoxietoxi)etileleato (**6d**), 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) e 2-etoxietilcanoato (**7a**). O primeiro passo para a encapsulação do corante *Nile Red* foi a dissolução de 1 mg de corante em 3 mL de etanol de modo a construir a reta de calibração do corante. A partir desta solução-mãe foram feitas diluições sucessivas, o que permitiu que a reta de calibração abrangesse concentrações entre 2 mM e 60 mM. O valor de absorvância máximo utilizado na reta de calibração foi obtido através do pico máximo do espectro de absorvância (548 nm) do corante *Nile Red*, dissolvido em etanol, à temperatura ambiente.

#### a) Determinação da solubilidade do *Nile Red* nos ésteres sintetizados

De modo a determinar a concentração máxima do corante nos ésteres sintetizados foi preparada uma solução-mãe com 1 mg de corante em 1,7 mL de éster. Desta solução foram pipetados 10 µL posteriormente dissolvidos em 1 mL de etanol. A absorvância desta solução foi medida num espectrofotómetro UV-visível (espectrofotómetro *BioTek SynergyMx*), em triplicado e à temperatura ambiente. A concentração de corante dissolvida nos ésteres sintetizados foi determinada com recurso à reta de calibração previamente obtida.

## **b) Processo de emulsificação com o corante Nile Red**

As nanoemulsões foram preparadas com 2,5 % e 5% da solução-mãe previamente preparada (1 mg de corante dissolvido em 1,7 mL de éster) e água destilada (pH=5,6). As nanoemulsões foram produzidas utilizando a metodologia descrita anteriormente (seção 2.1.5) e foram armazenadas num frigorífico a 4°C, protegidas da luz, de modo a conservar as suas propriedades fluorescentes.

### **i. Estudos de libertação do *Nile Red* das nanoemulsões**

As nanoemulsões contendo *Nile Red* (4 mL) foram colocadas em tubos de diálise (1 kDa *cut-off*, da marca *GE Healthcare*) com uma solução de 10% etanol em água no exterior (50 mL), sob agitação à temperatura ambiente. A absorvância do conteúdo exterior à membrana foi medida ao longo do tempo foi medida com recurso a uma microplaca de 96 poços, para a qual foram pipetados 200 µL do exterior de cada uma das amostras, e posteriormente analisada num espectrofotómetro UV-visível (espectrofotómetro *BioTek SynergyMx*).

### **ii. Microscopia confocal**

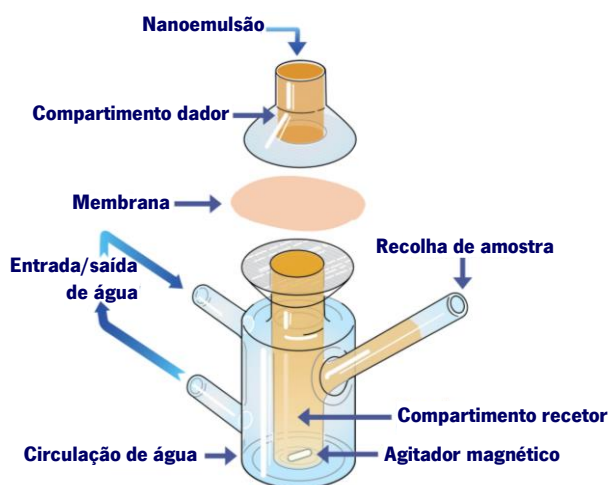
Numa lâmina foram adicionados 2 µL das nanoemulsões com corante produzidas com 2,5% dos ésteres sintetizados. As imagens foram adquiridas num microscópio *Confocal Scanning Laser (Olympus BX61, Model Fluoview 1000)*, com uma ampliação 100x e com recurso ao programa *FV10-Ver4.1.1.5 (Olympus)*. As nanoemulsões com corante foram analisadas com um laser vermelho 559 BA:575-675 e as nanoemulsões sem corante, que funcionam como controlo, foram obtidas em campo claro com recurso à técnica DIC (*Differential interference contrast*).

### **iii. Permeação do corante em modelo de pele através de um sistema de transdermal**

A permeação do corante foi avaliada através de um sistema transdérmico constituído por células de difusão de *Franz* (figura 40). A solução colocada no meio recetor, com uma capacidade de 5 mL, foi uma solução de água destilada, que foi mantida em agitação constante durante 24 horas. O compartimento dador foi preenchido com 500 µL das nanoemulsões previamente preparadas com 2,5 % dos ésteres sintetizados. O sistema foi mantido a uma temperatura de 37°C, através de um banho de água termostático. Os estudos de permeação do corante



utilizaram duas membranas diferentes, uma membrana de fibrina e outra membrana de acetato de celulose, ambas com 25 mm de diâmetro e um poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . A quantidade de corante libertado ao longo do tempo foi medida através das amostras retiradas em intervalos de tempo pré-determinados (1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas e 24 horas) e com recurso a uma microplaca de 96 poços, para a qual foram pipetados 400  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras, e posteriormente analisada num leitor de microplacas (*BioTek Synergy™ HI*) à temperatura ambiente. O volume removido em cada análise foi substituído pela mesma quantidade de solução recetora.



**Figura 40.** Representação das células de difusão de *Franz* (adaptado de <https://permegear.com/franz-cells/>).

### 2.2 *Docking* e simulações de dinâmica molecular

Neste trabalho foram utilizadas técnicas de modelação molecular com o objetivo de compreender, em detalhe, o modo de ligação dos reagentes e dos produtos a três das lipases em estudo, a lipase nativa e modificada da *Aspergillus oryzae* e a lipase nativa da *porcine pancreas*.

*Docking* molecular foi utilizado para perceber a interação e a força de ligação dos reagentes, bem como dos produtos da reação, com as lipases em estudo, sendo que em alguns casos foram necessárias simulações de dinâmica molecular do complexo ligando-lipase para complementar os estudos de *docking* molecular.

Adicionalmente, de modo a compreender a formação espontânea de nanoemulsões a partir dos ésteres sintetizados em meio aquoso, foram realizadas outro tipo de simulações de dinâmica molecular, à frente detalhadas.

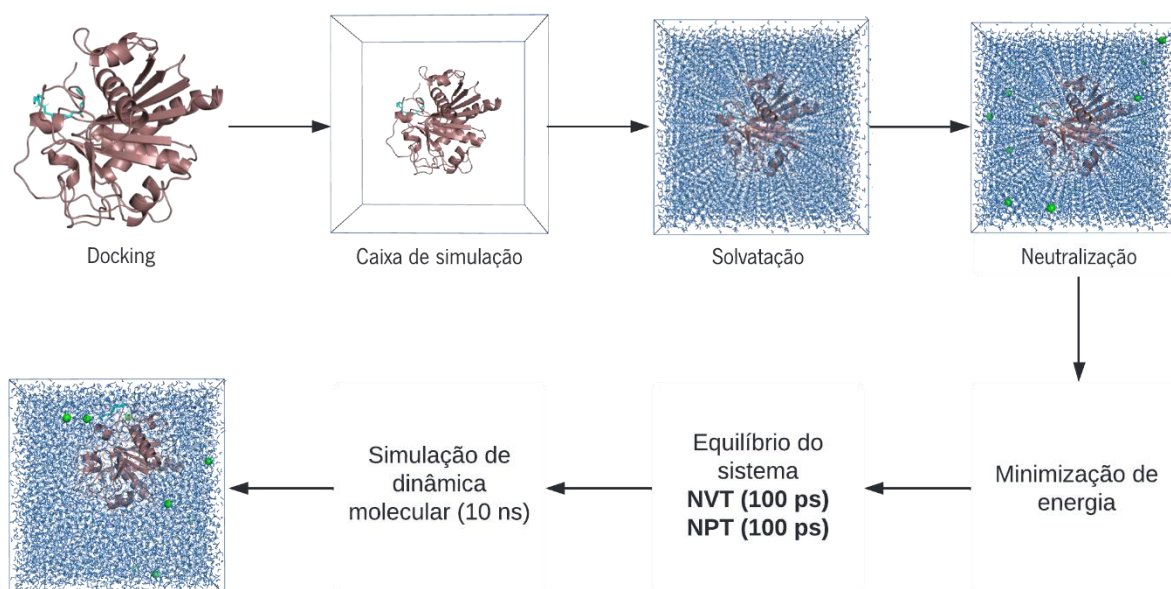
O *docking* molecular recorreu às três lipases em estudo (alvo) e aos ésteres sintetizados com sucesso (ligandos), sendo necessário a divisão dos ligandos com base no tamanho destes. No caso das lipases da *Aspergillus oryzae*, a lipase nativa e a lipase modificada no resíduo 98 com a introdução de uma cadeia de dodecilo na lisina, os estudos de *docking* molecular incidiram na interação das duas lipases com os ésteres sintetizados a partir do transcutool com todos os ácidos carboxílicos em estudo e do 2-etoxietanol com o ácido octanóico e o ácido oleico, bem como os respetivos reagentes de partida. No caso da lipase nativa da *porcine pancreas*, os estudos de *docking* molecular indicaram a interação de ambas as lipases com o produto 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**), representativo dos ligandos de cadeia longa e com o produto 2-etoxietilcanoato (**7a**), o ligando de cadeia curta.

Todos os ligandos utilizados foram otimizados com o *software Gaussian09*<sup>48</sup> através de cálculos *DFT (Density functional theory)*<sup>49</sup> com a base B3LYP/631+G(d,p)<sup>50</sup>, para obtenção da estrutura eletrónica de menor energia e distribuição de cargas. De modo a serem utilizadas no *AutoDock 4.0*<sup>51,52</sup>, as estruturas otimizadas foram convertidas em ficheiros pdbqt através do *OpenBabel*<sup>53</sup>, que preserva as coordenadas otimizadas pelo *DFT* e cargas calculadas.

De modo a executar as experiências de *docking* molecular aos ligandos divididos em dois grupos, consoante o tamanho, foram atribuídas diferentes caixas em tamanho, sendo ambas as caixas centralizadas na cavidade que comporta o centro ativo, com uma resolução de 1 Å e com as dimensões necessárias para comportar a tríade catalítica e os diferentes ligandos. As experiências consistiram em 20 corridas independentes, com um máximo de avaliações de energia de 2500000. A observação das interações entre os ligandos e os aminoácidos ao seu redor, nomeadamente a tríade catalítica foram realizadas com recurso ao programa *PyMol*.<sup>54</sup>

O primeiro tipo de simulações de dinâmica molecular do complexo enzima-ligando foram apenas realizadas com o produto 2-etoxietiloleato (**7d**) na lipase nativa e modificada (figura 41), a partir dos complexos obtidos por *docking* molecular, no qual o ligando apresenta energia mais negativa, ou seja, na qual o ligando faz mais interações com o centro ativo da enzima. Os parâmetros GROMOS do ligando foram obtidos com recurso ao servidor *ATB (Automated Force Field Topology Builder)*.<sup>55,56</sup> Nas caixas de simulação para ligandos de tamanho superior, categoria na qual se inclui o ligando em estudo (**7d**), foi necessário adicionar dez iões de sódio, no caso da caixa da lipase nativa e onze iões de sódio, no caso da caixa da lipase modificada, para que a carga global dos sistemas fosse nula. Em todas as simulações foi utilizado o GROMACS 5.1.4<sup>57</sup> com o campo de forças GROMOS54a7.<sup>58</sup>

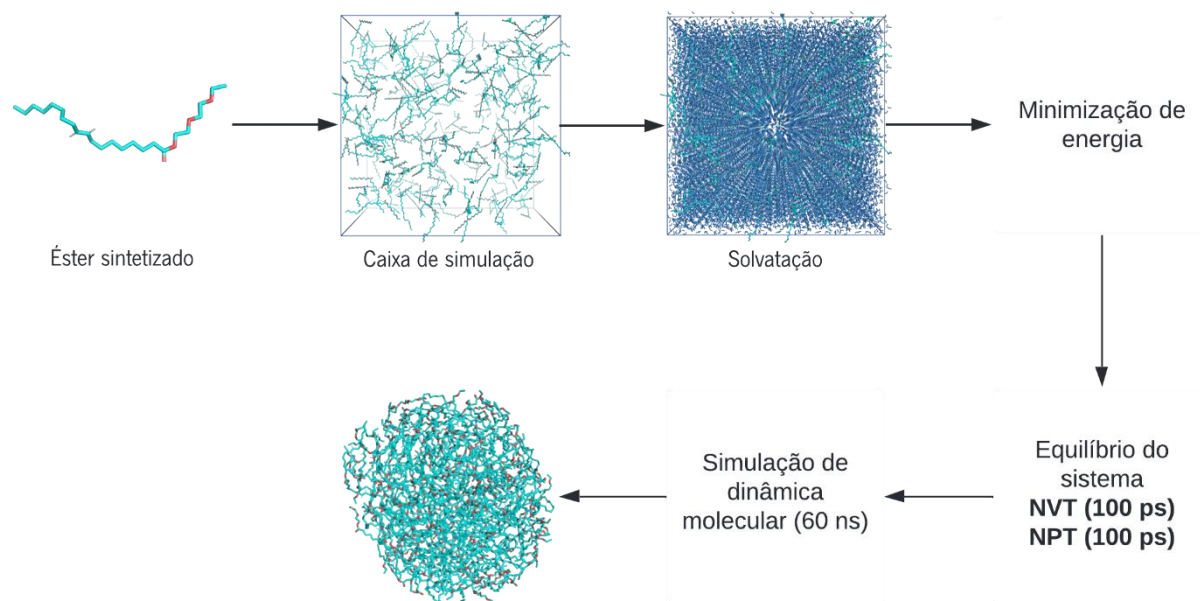
O primeiro passo da simulação de dinâmica molecular foi a minimização de energia do sistema, com o algoritmo *steepest descent* para uma organização global das moléculas de água, do ligando e das cadeias laterais dos aminoácidos, sendo que a minimização de energia foi realizada com um máximo de 50000 passos. O segundo passo foi a inicialização/equilíbrio dos sistemas através da integração da equação do movimento de *Newton* e considerando os *ensembles* (estado termodinâmico) canônico – NVT, que fixa o número de átomos, volume e temperatura, e isobárico/isotérmico – NPT, com número de átomos, pressão e temperatura fixos, sendo a temperatura 310 K (algoritmo *V-rescale*) e a pressão 1 bar (algoritmo *Parrinello-Rahman*).<sup>59</sup> O último passo consistiu na simulação de dinâmica molecular durante 10 nanossegundos (ns), sendo restringidos os ângulos e ligações do sistema com o algoritmo LINCS. Os resultados obtidos nestas simulações foram analisados através da visualização da sua trajetória.



**Figura 41.** Esquema representativo dos passos da simulação de dinâmica molecular entre a lipase *Aspergillus oryzae* modificada e o ligando 2-etoxietiloleato (**7d**). A lipase modificada está representada em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, as moléculas de água a azul e os íons representados a verde. Os átomos de oxigênio estão representados a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*, PDB:1TIB modificada).<sup>44</sup>

O segundo tipo de simulação de dinâmica molecular (figura 42) teve por objetivo observar o processo de *self-assembly* de cada éster sintetizado em meio aquoso. Este tipo de simulação consistiu em distribuir um determinado número de moléculas de cada éster sintetizado numa caixa de simulação, de dimensões 10x10x10. De seguida, a caixa foi solvatada com água e seguiram-se os passos do sistema de simulação explicados para o sistema anterior. Neste caso foi minimizada a

energia do sistema e este foi equilibrado (com os *ensembles* NVT e NPT), realizando-se por fim a simulação de dinâmica molecular durante 60 ns, sendo as opções de cálculo iguais ao passo anterior. Os resultados obtidos foram analisados através da visualização da trajetória dos sistemas. A densidade dos sistemas ao longo da simulação foi calculada com recurso ao campo de forças GROMOS54a7<sup>58</sup> com o objetivo de analisar a evolução do sistema, bem como o estado de equilíbrio no qual este se encontra ao longo da simulação de dinâmica molecular.



**Figura 42.** Esquema representativo dos passos da simulação de dinâmica molecular no processo de para *self-assembly* do ligando 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**). O éster encontra-se representado a ciano e as moléculas de água a azul, sendo que na última imagem do esquema as moléculas de água foram omitidas para melhor visualização. Os átomos de oxigénio estão representados a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa PyMol).

---

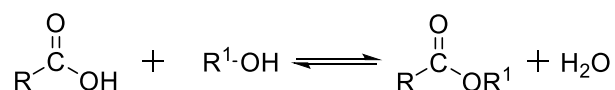
## Discussão de resultados

Esta dissertação está dividida em duas secções. A primeira relata a síntese de novos compostos emulsificantes (ésteres) através de reações de esterificação, com e sem solvente, seguindo-se a sua caracterização. A segunda secção inclui o estudo das propriedades emulsificantes dos compostos sintetizados, através da formação de emulsões óleo em água (O/A), seguindo-se a sua caracterização e posteriormente, a encapsulação de um corante nas emulsões mais estáveis.

Ao longo da discussão de resultados foram incorporados resultados obtidos através de diferentes técnicas de modelação molecular, de forma a justificar alguns resultados experimentais.

### 3.1. Síntese de ésteres

A síntese de novos compostos emulsificantes foi feita através de reações de esterificação, entre um ácido carboxílico e um álcool, como exemplificado na figura seguinte.



**Figura 43.** Esquema representativo da reação de esterificação realizada.

Neste trabalho foram utilizados cinco ácidos carboxílicos (ácido octanóico, ácido decanóico, ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico) e sete álcoois, sendo cinco deles bi-funcionalizados (etilenoglicol, 1,3-propanediol, dietilenoglicol, trietilenoglicol e PEG200) e os restantes monofuncionalizados (transcutol e 2-etoxietanol) (tabela 1). A utilização de diferentes tipos de álcoois teve como objetivo principal o estudo aprofundado das capacidades catalíticas das diferentes lipases.

**Tabela 1.** Tabela representativa dos ácidos e dos álcoois testados na síntese de ésteres, bem como a numeração atribuída aos respetivos produtos desejados

	<b>Ácido octanóico</b>	<b>Ácido decanóico</b>	<b>Ácido palmítico</b>	<b>Ácido oleico</b>	<b>Ácido linoleico</b>
<b>Etilenoglicol</b>	1a	NT	NT	1d	1e
<b>1,3-Propanediol</b>	2a	NT	NT	2d	2e
<b>Dietilenoglicol</b>	3a	NT	NT	3d	3e
<b>Trietilenoglicol</b>	4a	NT	NT	4d	4e
<b>PEG200</b>	5a	NT	NT	5d	5e
<b>Transcutol</b>	6a	6b	6c	6d	6e
<b>2-Etoxietanol</b>	7a	7b	7c	7d	7e

NT: Não testado

As reações de esterificação foram realizadas, numa primeira fase, com solvente (*n*-heptano), de modo a estudar as propriedades catalíticas de quatro lipases (a lipase nativa e modificada da *Aspergillus oryzae*, a lipase nativa da *Candida rugosa* e a lipase nativa da *porcine pancreas*). Posteriormente, as reações com melhores resultados, foram estudadas na ausência de solvente, de modo a obter uma metodologia mais verde, económica e amiga do ambiente.

Nas reações que utilizaram solvente, foi utilizado *n*-heptano anidro, um solvente apolar, tipicamente utilizado em reações de esterificação com lipases. As reações foram realizadas a uma temperatura de 37°C, sendo esta considerada a temperatura ótima da maioria das lipases.<sup>45</sup> A realização das reações em meio anidro é bastante importante, uma vez que a água promove a reação inversa, nomeadamente a hidrólise do éster.<sup>60</sup> As reações foram controladas por titulação ácido-base, uma técnica que permite a quantificação de ácido presente no meio reacional. No final da reação foi efetuada uma extração líquido-líquido com solução aquosa de bicarbonato de sódio e água destilada, com o objetivo de remover os reagentes de partida que não reagiram.

#### **3.1.1. Síntese catalisada pela lipase nativa e modificada da *Aspergillus oryzae* com solvente**

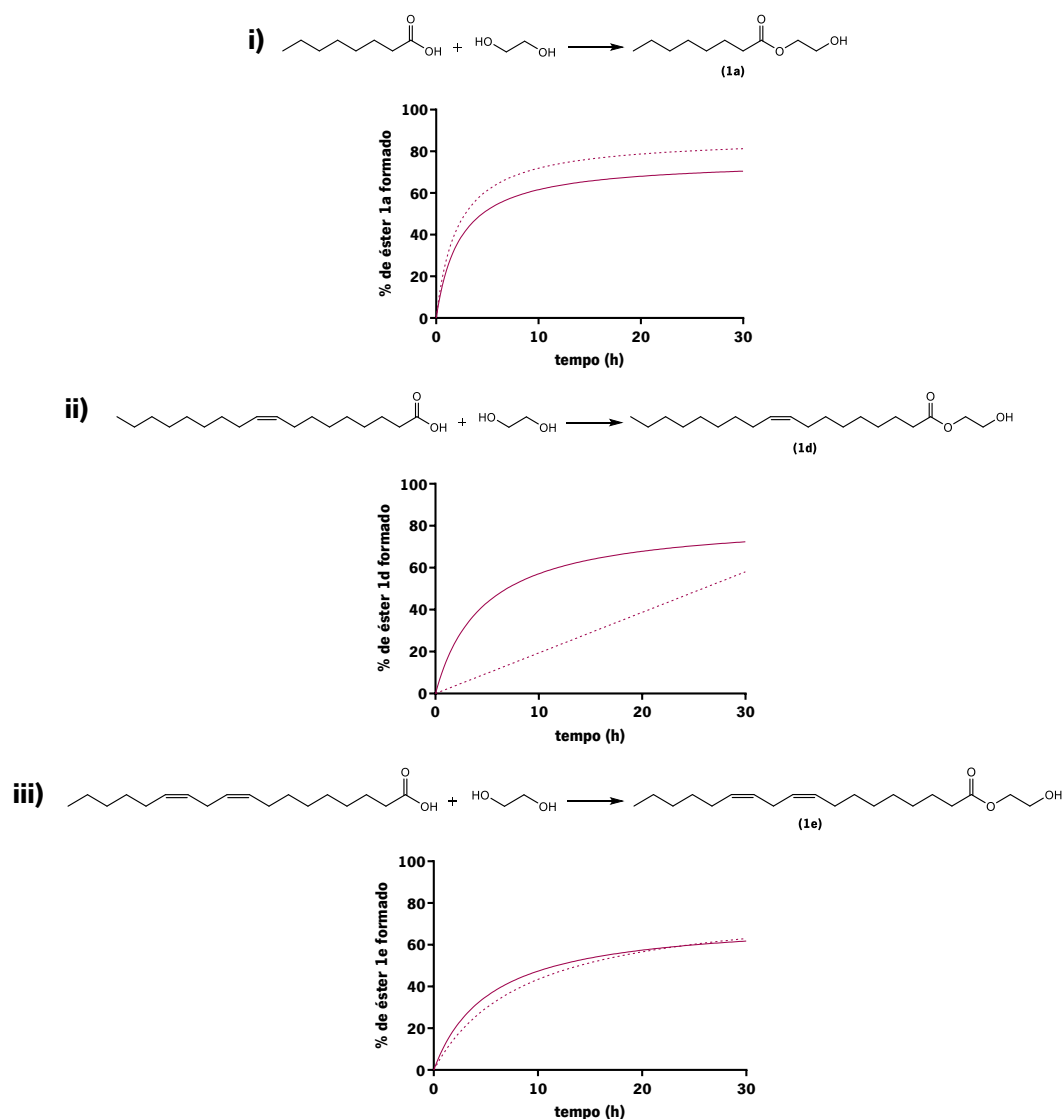
A modificação química da lipase nativa da *Aspergillus oryzae* (Lipolase®) com o dodecil aldeído revelou previamente um aumento da performance catalítica da enzima em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.<sup>45,61</sup>

Atendendo que os álcoois testados são de carácter mais hidrofílico que os substratos típicos destas enzimas, ambas as lipases (nativa e modificada) foram estudadas inicialmente para este propósito na presença de *n*-heptano.

##### **a) Reações de esterificação com diálcoois**

Os álcoois utilizados nestas reações de esterificação são álcoois bifuncionais, variando no tamanho da sua cadeia, composta por átomos de carbono e oxigénio.

Ambas as lipases esterificaram o menor álcool em estudo, o **etilenoglicol**, com os três ácidos carboxílicos testados (ácido octanóico, ácido oleico e ácido linoleico) (figura 44). Os resultados obtidos após 30 horas revelaram que o éster **1a** foi o composto sintetizado com maior percentagem de conversão.



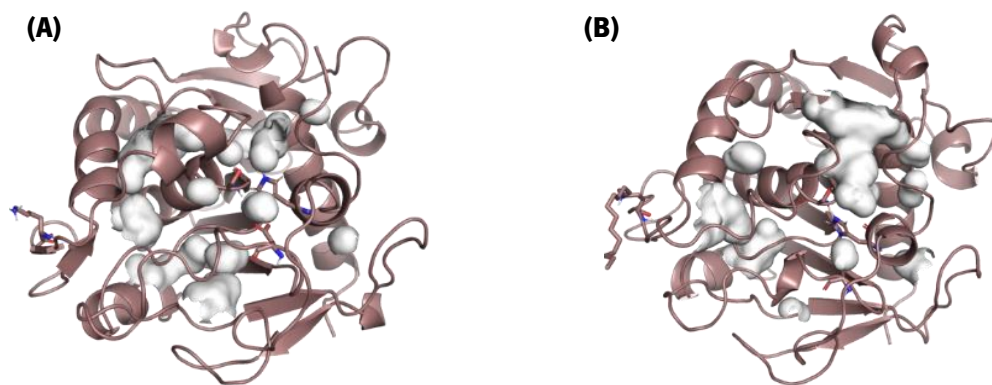
**Figura 44.** Esquemas reacionais e respectivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da *Aspergillus oryzae* com o etilenoglicol ao longo do tempo: **i)** éster 2-hidroxietilcanoato (**1a**), **ii)** éster 2-hidroxietiloleato (**1d**) e **iii)** éster 2-hidroxietil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**1e**).

O produto **1a** foi obtido com uma maior percentagem de conversão quando sintetizado com recurso à lipase nativa (81%) comparativamente à lipase modificada (72%). Contrariamente, o produto **1d** revelou ser sintetizado com maior eficiência quando utilizada a lipase modificada (75%) comparativamente à lipase nativa (62%). O éster **1e** foi obtido de igual forma por ambas as lipases (62%).

De modo a compreender os resultados obtidos, recorreu-se à modelação molecular. Os resultados obtidos revelam que a lipase nativa (figura 45-A) tem uma menor superfície disponível, perto do centro ativo, para comportar novos ligandos do que a lipase modificada (figura 45-B). Este comportamento deriva da modificação do resíduo de lisina 98 presente no *lid* da lipase.<sup>44</sup> Esta

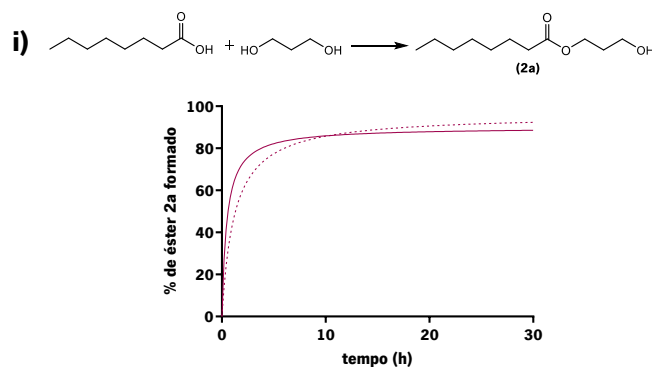


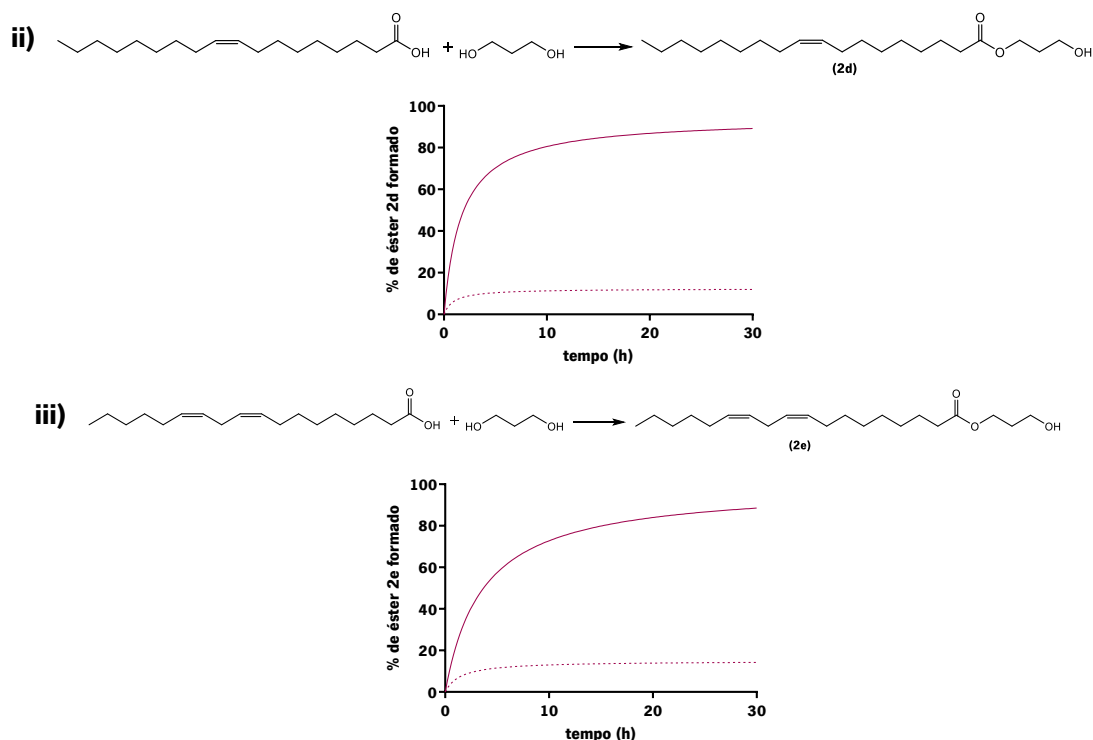
modificação afasta a “tampa” do centro ativo da enzima, o que permite aumentar o espaço livre ao redor deste. Este fenómeno acaba por facilitar a reação entre a lipase modificada e moléculas com uma maior cadeia carbonada, como o éster **1d**, uma vez que o local onde ocorre a reação está menos impedido estereoquimicamente e a molécula consegue aproximar-se mais facilmente do centro ativo da lipase. No caso do éster **1a**, como a sua cadeia carbonada é menor (8 carbonos), adapta-se melhor à cavidade da lipase nativa, provocando uma ligeira diferença de percentagem de conversão face à lipase modificada. O caso do éster **1e** é um pouco diferente, uma vez que o ácido linoleico é menos flexível, devido às suas duas ligações duplas, o que aumenta a dificuldade em adaptar-se a qualquer uma das cavidades enzimáticas. Consequentemente, é mais difícil a sua aproximação ao centro ativo das lipases, o que resulta numa menor conversão em produto.



**Figura 45.** Representação tridimensional da superfície disponível para comportar ligandos na lipase nativa **(A)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(B)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho e as superfícies que indicam cavidades ao redor do centro ativo representadas a cinzento (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

A lipase nativa e modificada da *Aspergillus oryzae* esterificaram o álcool **1,3-propanediol**, que apesar de diferir do etilenoglicol em apenas um (-CH<sub>2</sub>), revelou um comportamento bastante distinto com os três ácidos em estudo, após 30 horas (figura 46).





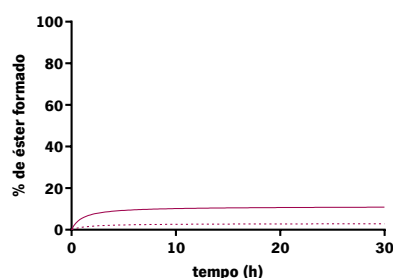
**Figura 46.** Esquemas reacionais e respectivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da *Aspergillus oryzae* com o 1,3-propanediol ao longo do tempo: **i)** éster 3-hidroxipropil octanoato (**2a**), **ii)** éster 3-hidroxipropil oleato (**2d**) e **iii)** éster 3-hidroxipropil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**2e**).

O produto **2a** foi sintetizado com igual percentagem de conversão independentemente da lipase utilizada (87%). Os produtos **2d** e **2e** apenas foram sintetizados quando utilizada a lipase modificada, com uma percentagem de conversão máxima de 87% e 81%, respetivamente. Apesar de diferir do etilenoglicol em apenas um (-CH<sub>2</sub>), observou-se um grande impacto quando utilizado o 1,3-propanediol na atividade da lipase nativa. Em relação ao produto **2a**, como o ácido octanóico é menor que o ácido oleico e o ácido linoleico, ambos os substratos podem ser comportados nas cavidades das lipases, justificando a percentagem de éster formado. Quanto aos produtos **2d** e **2e**, devido ao tamanho de ambos os reagentes de partida, o tamanho da cavidade da enzima nativa demonstrou-se insuficiente para os alojar e posteriormente realizar a reação de esterificação.

Atendendo que os álcoois são bifuncionais, foi efetuada a caracterização dos produtos isolados, de modo a verificar se foi obtido apenas o produto pretendido, ou seja, o produto monofuncionalizado, apenas com um grupo éster. Nas reações realizadas com o **etilenoglicol**, verificou-se a presença do diéster, juntamente com um excesso do álcool de partida nos espetros de ressonância magnética nuclear de protão (<sup>1</sup>H RMN) e por espetrometria de massa. O excesso de álcool livre faz com que estes produtos não possam ser utilizados em formulações cosméticas pela sua elevada toxicidade em vários

órgãos do corpo humano, nomeadamente o coração e os rins,<sup>62</sup> sendo apenas possível a sua utilização se o álcool estiver complexado com outras moléculas. A implementação de um passo extra de purificação, como cromatografia em coluna, tornaria o processo industrial mais caro e demorado, pelo que não foi realizado. No caso do **1,3-propanediol**, foi identificado por <sup>1</sup>H RMN um excesso de ácido carboxílico livre. Também neste caso, foi observado por espectrometria de massa um pico correspondente ao diéster. Os resultados obtidos revelam que ambas as lipases possuem baixa seletividade na obtenção dos produtos pretendidos (monoésteres). A obtenção de misturas de compostos torna inviável o seu estudo como potenciais agentes emulsificantes cosméticos, o que levou a que os estudos com estes produtos não fossem prosseguidos.

De modo a verificar se a seletividade das lipases aumentaria para os produtos desejados (monoésteres), foram estudados diálcoois de tamanho superior. Os resultados obtidos com o **dietilenoglicol**, com o **trietilenoglicol** e com **PEG200**, após 30 horas de reação com o ácido octanóico, o ácido oleico e o ácido linoleico revelam que as reações de esterificação não funcionam com nenhuma das lipases testadas, como exemplificado na figura 47, não tendo sido isolado nenhum dos produtos pretendidos (tabela 2).



**Figura 47.** Gráfico representativo das percentagens de conversão obtidas nas reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da *Aspergillus oryzae* com o dietilenoglicol, trietilenoglicol e PEG200.

**Tabela 2.** Tabela com os produtos pretendidos para as reações de esterificação entre o dietilenoglicol, trietilenoglicol e PEG200 com o ácido octanóico, ácido oleico e ácido linoleico

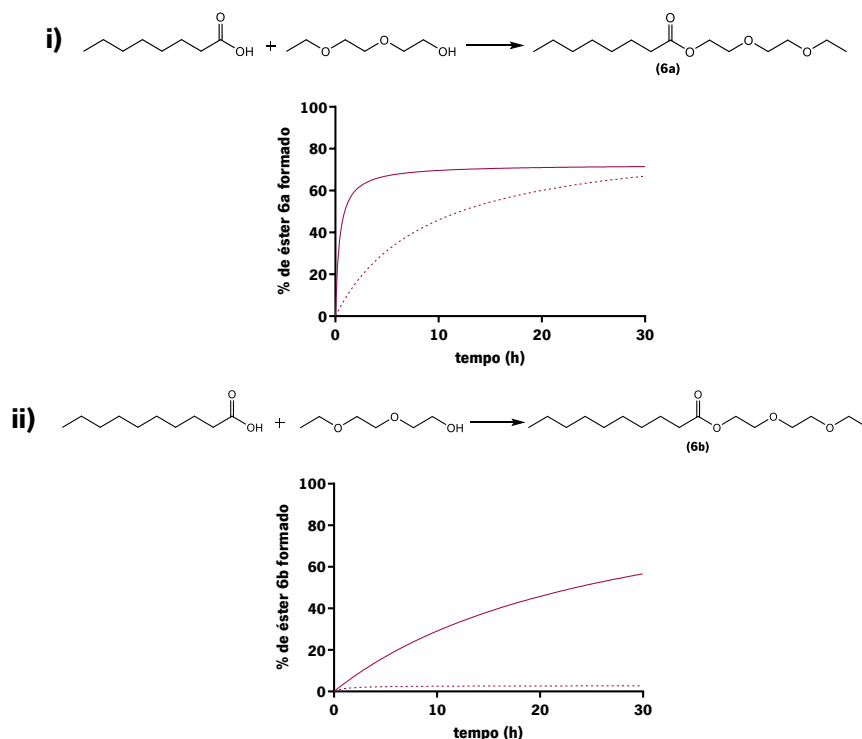
	Ácido octanóico	Ácido oleico	Ácido linoleico
<b>Dietilenoglicol</b>			
<b>Trietilenoglicol</b>			
<b>Polietilenoglicol 200</b>			

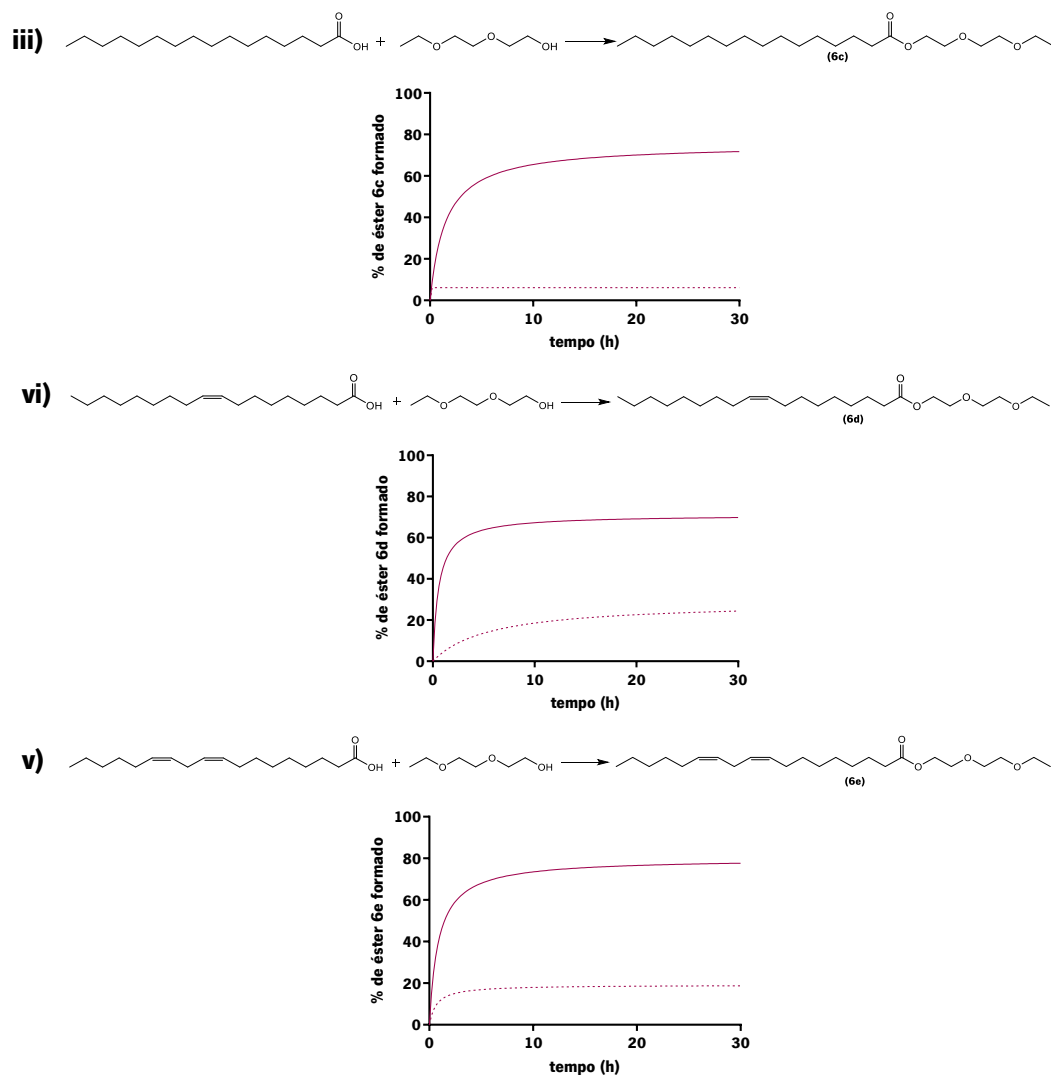
As baixas percentagens de conversão reacionais obtidas para os álcoois **dietilenoglicol**, **trietilenoglicol** e **PEG200** podem ser explicadas pela sua estrutura química. Além de possuírem um tamanho superior, que dificulta a sua acomodação ao centro ativo das lipases, estes também são mais hidrofílicos. Como constatado anteriormente, a ativação interfacial das lipases por compostos hidrofóbicos é crucial para o seu desempenho catalítico, o que resulta no insucesso das reações efetuadas.

### b) Reações de esterificação com álcoois monofuncionais

De modo a evitar a síntese de diésteres, foram posteriormente utilizados álcoois monofuncionais, nomeadamente o transcitol e o 2-etoxietanol, cujo elemento diferenciador é o tamanho da sua cadeia.

O **transcitol** reagiu com todos os ácidos carboxílicos em estudo (ácido octanóico, ácido decanóico, ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico). Os resultados obtidos revelam que, após 30 horas de reação, todos os ésteres foram eficientemente produzidos (figura 48).



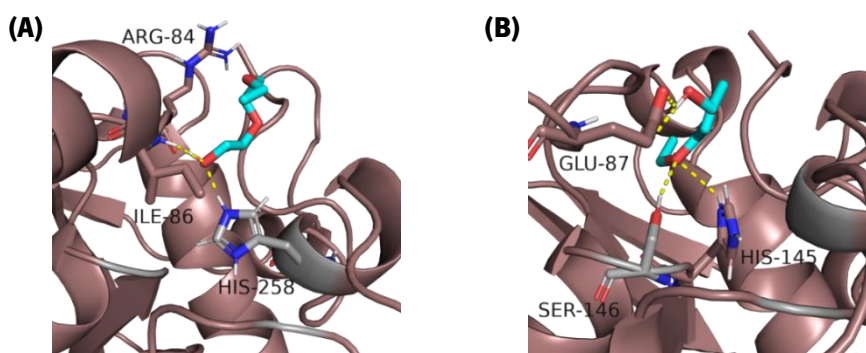


**Figura 48.** Esquemas reacionais e respetivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da *Aspergillus oryzae* com o transcutool ao longo do tempo: **i)** éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**), **ii)** éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**), **iii)** éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**), **iv)** éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) e **v)** éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**).

O produto **6a** foi sintetizado com uma percentagem de conversão superior quando utilizada a lipase modificada (72%) comparativamente à lipase nativa (62%). Os restantes produtos **6b**, **6c**, **6d** e **6e** apenas foram sintetizados quando utilizada a lipase modificada, com uma percentagem de conversão máxima de 68%, 68%, 68% e 75%, respetivamente.

Através da análise da figura 48, é possível inferir que todas as reações de esterificação revelam uma percentagem de conversão superior quando catalisadas pela lipase modificada comparativamente à lipase nativa. Os resultados experimentais obtidos podem ser explicados pela interação do **transcutool**, livre em solução, com os aminoácidos na cavidade das lipases (figura 49). A interação entre o transcutool e a lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -3,0 \text{ kJ/mol}$ ) ocorre através de pontes de hidrogénio entre o

átomo de oxigénio do grupo hidroxilo terminal do álcool e um átomo de hidrogénio de uma amina num aminoácido da tríade catalítica (Histidina 258) e um dos aminoácidos ao redor (Isoleucina 86). Verificou-se ainda uma interação entre o átomo de hidrogénio do mesmo grupo e um átomo de oxigénio do grupo carbonilo de um aminoácido ao redor (Arginina 84). A interação com a lipase modificada ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,1$  kJ/mol) ocorre entre o átomo de oxigénio do grupo éter e átomos de hidrogénio de um aminoácido da tríade catalítica (Serina 146) e um ao redor (Histidina 145), e entre o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo terminal e dois átomos de oxigénio de um aminoácido ao redor (Glutamato 87), por pontes de hidrogénio. A diferença de energias de ligação ( $-1,1$  kJ/mol) e o facto de a parte polar do éster estar mais no centro ativo da lipase modificada, permitindo deste modo mais interações, justifica os resultados obtidos.

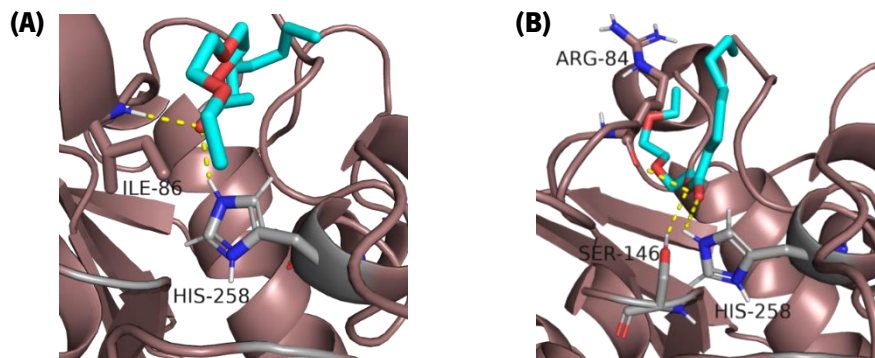


**Figura 49.** *Docking* do transcutol com a lipase nativa **(A)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(B)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

A lipase nativa apenas foi cataliticamente eficiente quando utilizado o ácido octanóico, o ácido carboxílico de cadeia mais curta, quando reagido com o transcutol. Estes resultados são coerentes aos obtidos previamente (secção 3.1.1.a)). A lipase modificada revelou uma atividade de esterificação superior em todos os casos, com os produtos a serem todos obtidos com bons rendimentos (>65%). Estes resultados foram todos estudados com recurso a *docking* molecular.

O éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato **(6a)** (figura 50) revela uma percentagem de conversão superior quando utilizada a lipase modificada (72%) comparativamente à lipase nativa (62%). No caso da lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,1$  kJ/mol), a interação ocorre com um aminoácido da tríade catalítica (Histidina 258) e com um outro aminoácido (Isoleucina 86), através de pontes de hidrogénio. No caso da lipase modificada ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,6$  kJ/mol), a interação ocorre através de pontes de hidrogénio, com dois aminoácidos da tríade catalítica (Histidina 258 e Serina 146) e ainda com um outro resíduo do centro ativo (Arginina 84). Apesar da reação ocorrer com ambas as lipases, verificou-se que a

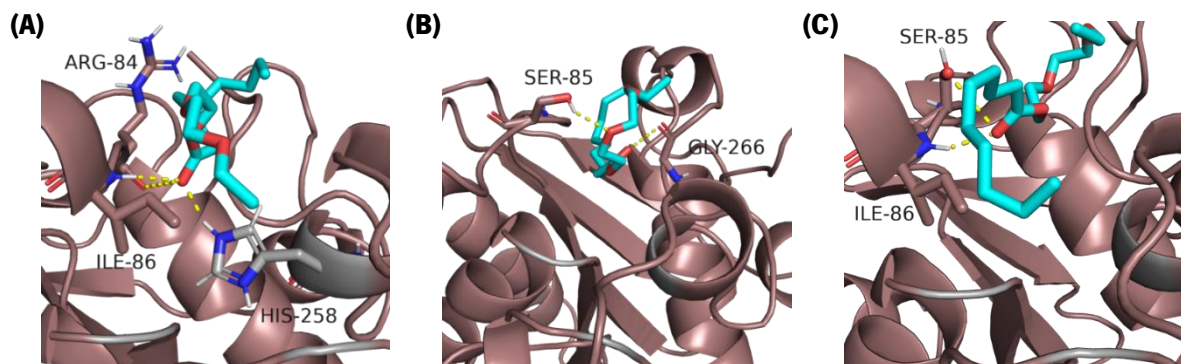
percentagem de conversão com a lipase modificada é superior. Estes resultados são reflexo da interação do produto **6a** com dois resíduos da tríade catalítica, além da melhor adaptação da molécula à cavidade da lipase modificada. A pequena diferença de energias entre as lipases, corrobora o facto de que a reação também ocorre com a lipase nativa, apesar de necessitar de mais tempo.



**Figura 50.** *Docking* do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) com a lipase nativa (**A**) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada (**B**) (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa PyMol).

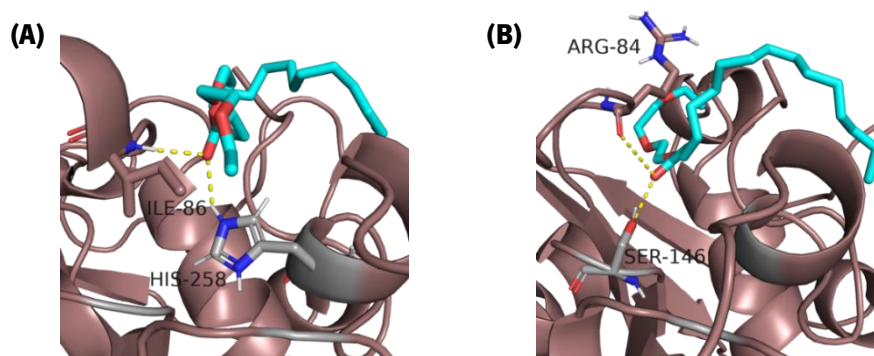
O éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) (figura 51) apenas é obtido quando a reação de esterificação é catalisada pela lipase modificada (68%), mas os estudos de *docking* molecular revelam uma energia de ligação igual para as duas lipases ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,4$  kJ/mol). A interação do produto com a lipase nativa ocorre através de pontes de hidrogénio, com um aminoácido da tríade catalítica (Histidina 258) e com dois aminoácidos ao redor (Arginina 84 e Isoleucina 86), sendo que a interação do produto com a lipase modificada ocorre apenas com dois aminoácidos da cavidade (Serina 85 e Glicina 266). Seria expectável que a reação com a lipase nativa fosse facilitada devido à interação polar com o resíduo de histidina da tríade catalítica, o que não acontece pois, apesar da parte polar do produto estar voltada para a cavidade enzimática, é bastante difícil o produto obter a conformação que permita a interação representada. A observação da figura 51-C permite concluir que ao aumentar as dimensões da *grid box*, o éster tem tendência a afastar-se do centro ativo da enzima e interagir com outros aminoácidos, sendo que este afastamento dificulta a reação de esterificação quando catalisada pela lipase nativa. A *grid box* usada com a lipase modificada, com a cavidade maior, permite obter as mais variadas conformações, o que faz com que as interações representadas sejam mantidas, pois a conformação do éster é estável.





**Figura 51.** *Docking* do éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) com a lipase nativa **(A)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(B)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup> e com a lipase nativa e a *grid box* aumentada **(C)** (PDB:1TIB), sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagem obtida com recurso ao programa *PyMol*).

O éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) (figura 52) é apenas obtido quando utilizada a lipase modificada (68%), porque interage ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -5,2$  kJ/mol) através de interações polares com um aminoácido da tríade catalítica (Serina 146) e um aminoácido ao redor (Arginina 84). No caso da lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,3$  kJ/mol), interage com um aminoácido da tríade catalítica (Histidina 258) e outro aminoácido ao redor (Isoleucina 86). No entanto, apesar da parte polar do éster estar próxima do centro ativo, o que permite interações semelhantes, a conformação obtida pelo éster na lipase nativa é pouco estável, o que requer mais energia para obter a conformação representada. A energia mais negativa associada à lipase modificada, faz com que a reação ocorra quando catalisada por esta, mas não quando catalisada pela lipase nativa.

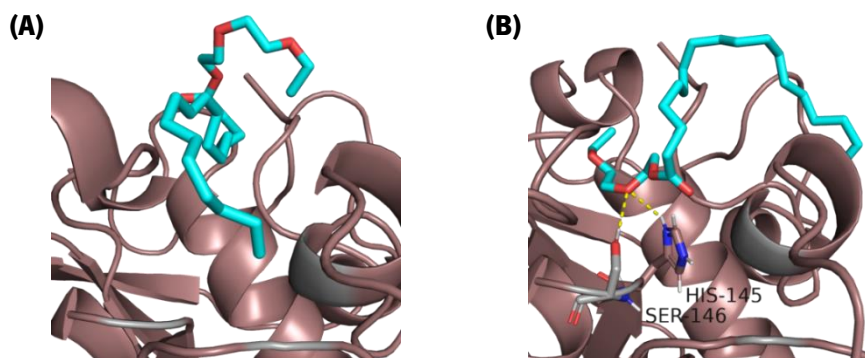


**Figura 52.** *Docking* do éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) com a lipase nativa **(A)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(B)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

O éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) (figura 53) foi também apenas sintetizado quando catalisado pela lipase modificada (68%). Os estudos de modelação molecular, revelam uma interação

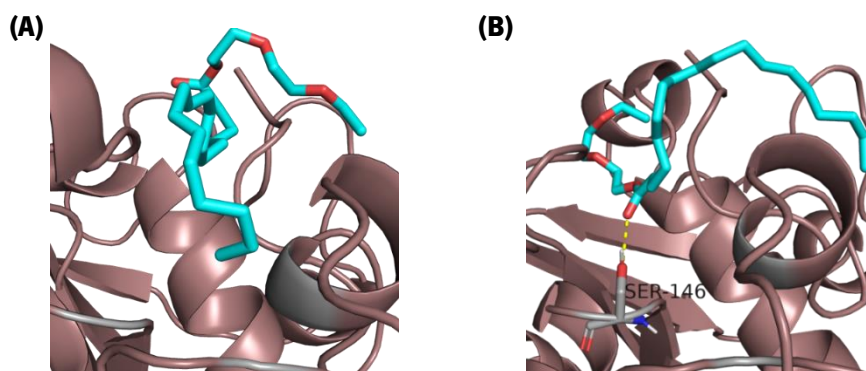


mais favorável ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -5,3$  kJ/mol), obtida através de pontes de hidrogénio com um aminoácido da tríade catalítica (Serina 146) e um aminoácido ao redor do centro ativo (Histidina 145). No caso da lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,6$  kJ/mol) a interação ocorre apenas através de forças de *Van der Waals*, uma vez que a parte polar da molécula fica mais afastada da tríade catalítica, não se verificando qualquer interação do composto **6d** com aminoácidos da tríade. Este tipo de interação é menos forte que a interação polar, o que juntado à conformação pouco estável adquirida pela molécula, explica o facto de a reação não ocorrer.



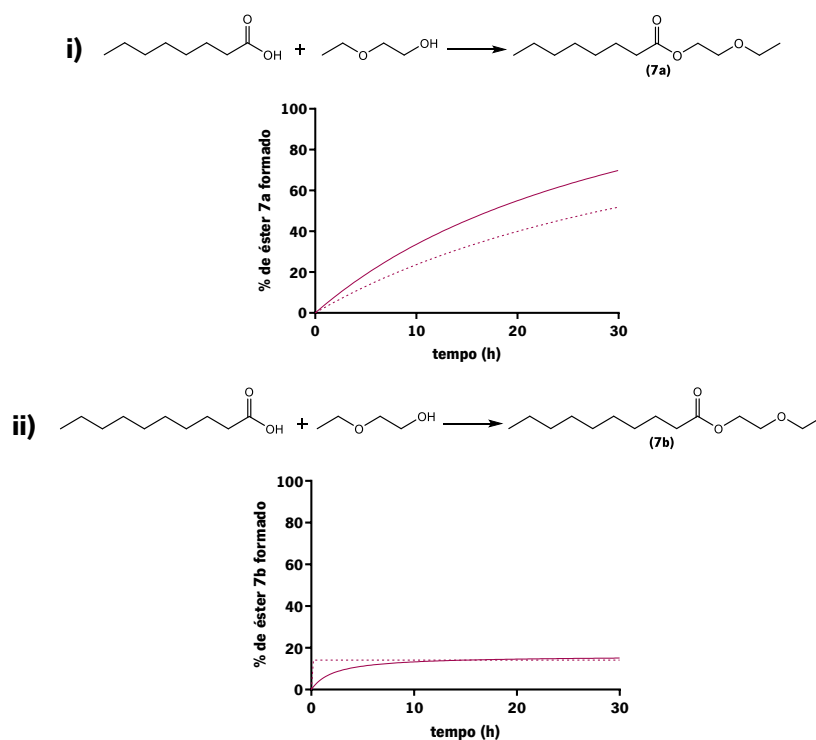
**Figura 53.** Docking do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) com a lipase nativa (**A**) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada (**B**) (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

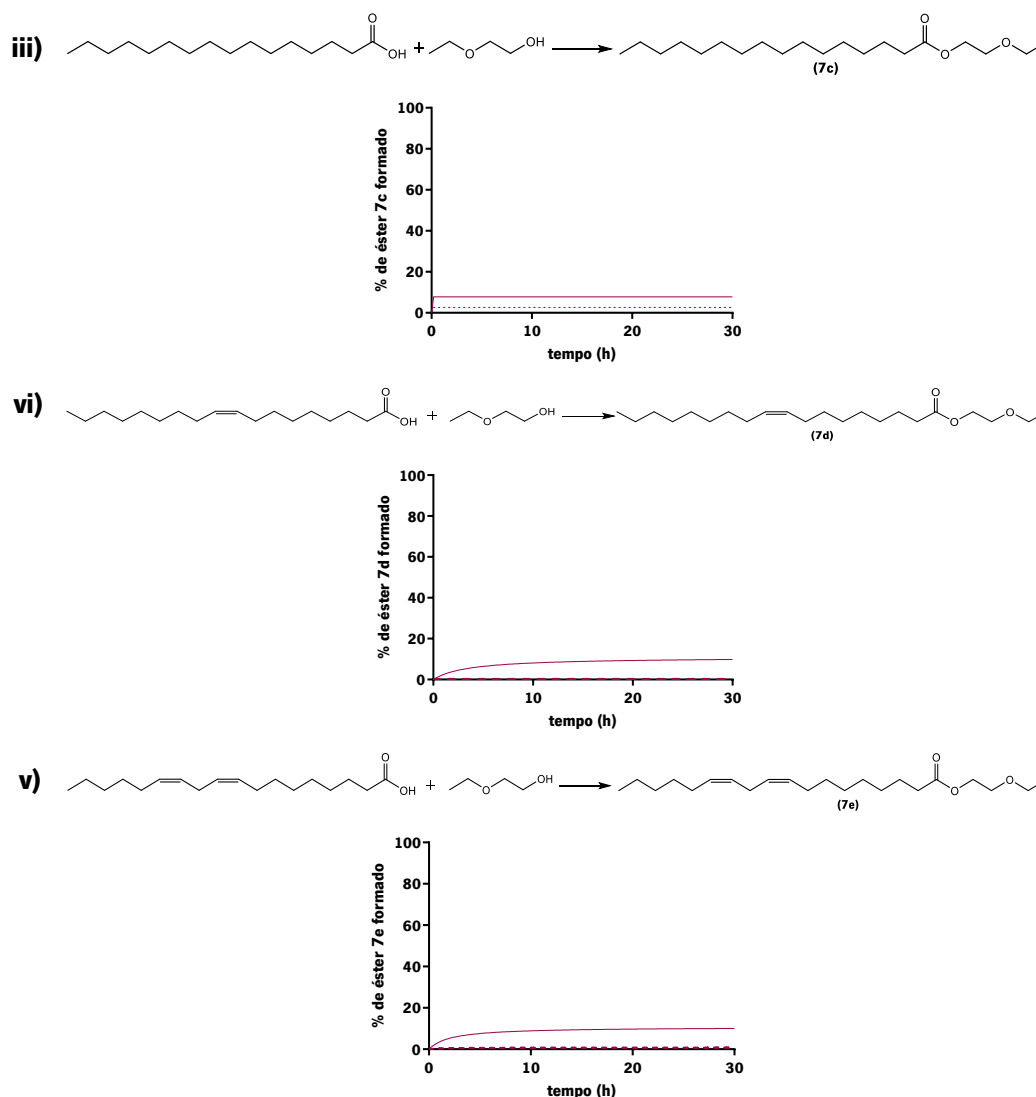
De um modo semelhante ao produto **6d**, o éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) (figura 54) é obtido apenas quando a reação é catalisada pela lipase modificada (75%). A interação ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -5,6$  kJ/mol) entre estes ocorre por pontes de hidrogénio com um aminoácido da tríade catalítica (Serina 146). No caso da lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -5,1$  kJ/mol), como a parte polar do éster fica voltada para o lado oposto da tríade catalítica, apenas são estabelecidas interações apolares. Apesar da pequena diferença de energia obtida, a conformação adquirida pelo éster quando em contacto com a lipase nativa é pouco estável, uma vez que a cadeia carbonada está bastante enrolada, o que pode ser explicado pela pouca flexibilidade do ácido e consequente maior dificuldade de adaptação à cavidade da lipase nativa.



**Figura 54.** *Docking* do éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) com a lipase nativa (**A**) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada (**B**) (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

Posteriormente foi utilizado o álcool **2-etoxietanol**, estruturalmente semelhante ao transcutool, mas com menos uma unidade (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O). Contrariamente ao esperado, este álcool apenas reagiu efetivamente com o ácido octanóico, formando o produto 2-etoxietiloctanoato (**7a**), após 30 horas (figura 55).

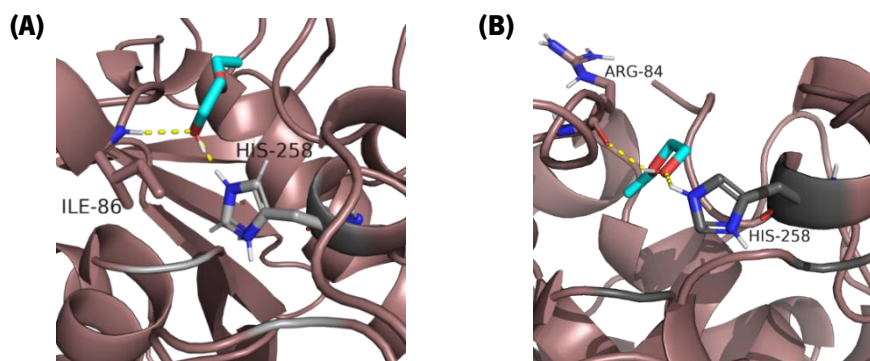




**Figura 55.** Esquemas reacionais e respetivos gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pelas lipases nativa (linha tracejada) e modificada (linha contínua) da *Aspergillus oryzae* com o 2-etoxietanol ao longo do tempo: **i)** éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**), **ii)** éster 2-etoxietildecanoato (**7b**), **iii)** éster 2-etoxietilpalmitato (**7c**), **iv)** éster 2-etoxietiloleato (**7d**) e **v)** éster 2-etoxietil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**7e**).

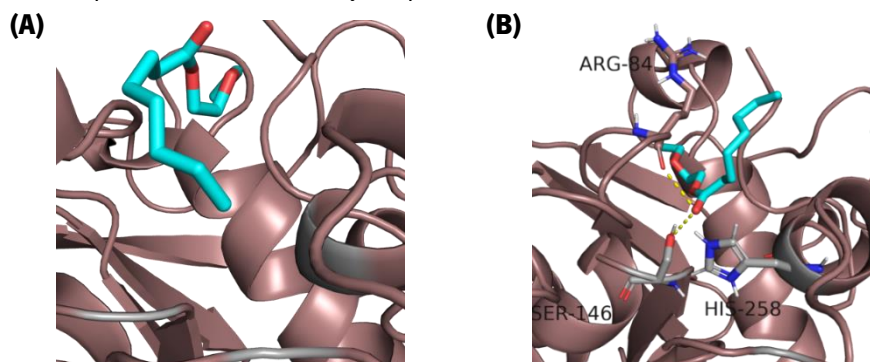
Os resultados obtidos não foram de acordo com os resultados esperados, uma vez que com a diminuição da cadeia, seria expectável uma igual ou melhor performance enzimática. De modo a explicar os resultados obtidos, estudou-se por modelação molecular a interação entre o **2-etoxietanol** e ambas as lipases (figura 56). No caso da lipase modificada, verifica-se uma interação, entre a lipase e o ligando mais forte, uma vez que a sua energia de ligação é mais negativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -3,6$  kJ/mol) quando comparada à lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -2,8$  kJ/mol). A interação entre a enzima e o álcool ocorre entre a parte polar deste e os aminoácidos polares que constituem a enzima, sendo que em ambos os casos as interações ocorrem com um aminoácido da tríade catalítica (Histidina 258) e um aminoácido ao redor desta. No entanto, é possível observar na figura seguinte que a molécula fica mais inserida na

cavidade enzimática da lipase modificada do que na lipase nativa, o que facilita a reação quando catalisada pela lipase modificada.



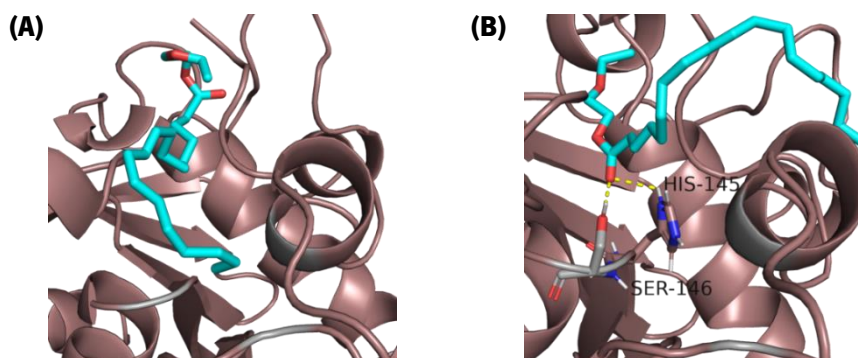
**Figura 56.** Docking do 2-etoxietanol com a lipase nativa **(A)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(B)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

O 2-etoxietiloctanoato (**7a**) (figura 57) é sintetizado com uma percentagem de conversão superior quando catalisado pela lipase modificada (72%) comparativamente à lipase nativa (56%), o que pode ser explicado pela posição do éster no centro ativo. No caso da lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,2$  kJ/mol), as interações são apenas apolares, uma vez que a cadeia carbonada está mais próxima do centro ativo do que a parte polar do éster. No caso da lipase modificada ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,5$  kJ/mol), as interações ocorrem através de pontes de hidrogénio entre a parte polar do éster e dois aminoácidos da tríade catalítica (Histidina 258 e Serina 146) e um aminoácido ao redor (Arginina 84), o que diminui a energia de ligação necessária, pois as interações são mais fortes. O produto **7a** tem um balanço hidrofóbico-hidrofílico estável, uma vez que a parte hidrofóbica, ou seja, a cadeia carbonada é de tamanho semelhante à parte hidrofílica, proveniente do álcool. Neste caso, a parte hidrofílica tem tamanho suficiente para manter as interações polares estabelecidas.



**Figura 57.** Docking do éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**) com a lipase nativa **(A)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(B)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

No caso dos restantes ésteres (**7b**, **7c**, **7d** e **7e**), exemplificados pelo produto **7d** na figura 58, os resultados obtidos experimentalmente e os resultados do *docking* molecular são contraditórios, uma vez que experimentalmente a reação não ocorre com nenhuma lipase, mas os estudos de *docking* molecular tornam expectável que a reação ocorra quando catalisada pela lipase modificada ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -5,6$  kJ/mol), mas não quando catalisada pela lipase nativa ( $\Delta G_{\text{ligação}} = -4,8$  kJ/mol). Isto acontece porque as interações do produto **7d** com a lipase nativa são apolares e com a lipase modificada são interações polares (pontes de hidrogénio) com um resíduo da tríade catalítica (Serina 146) e um aminoácido ao redor (Histidina 145), como ilustrado na figura seguinte.

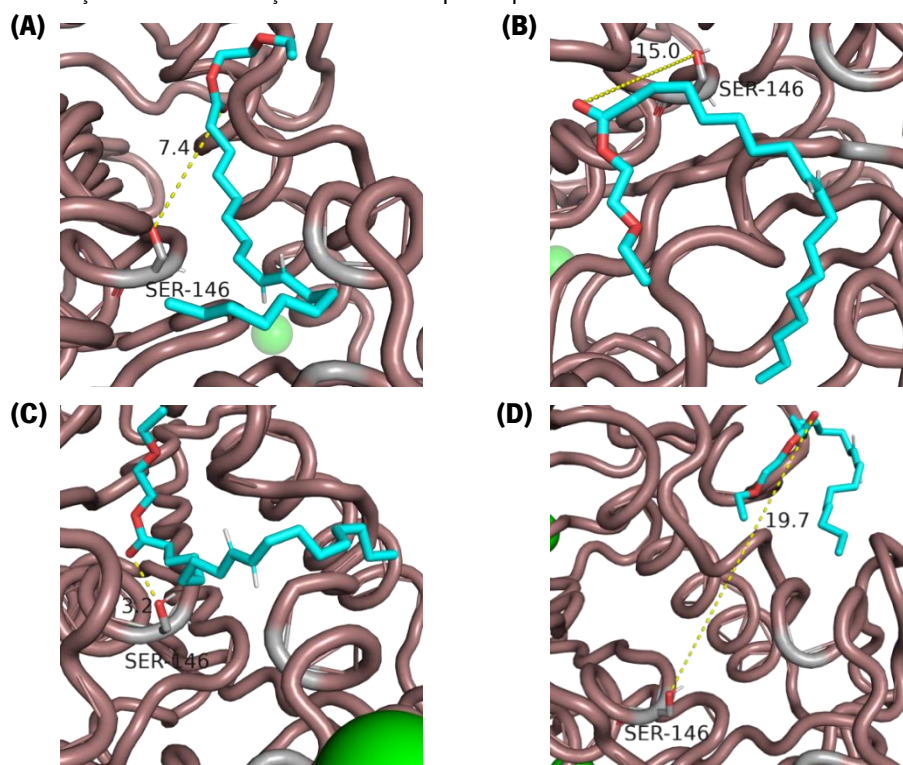


**Figura 58.** *Docking* do éster 2-etoxietiloleato (**7d**) com a lipase nativa (**A**) (PDB:1TIB) e com a lipase modificada (**B**) (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

De modo a clarificar os resultados obtidos foi realizada uma simulação de dinâmica molecular. É importante realçar que o centro ativo enzimático de ambas as lipases é maioritariamente polar, atendendo aos aminoácidos que o constituem, tornando possível a existência de interações polares no complexo ligando-lipase. Os ligandos utilizados permitem que possa existir algum impedimento estérico, o que pode resultar na incapacidade do ligando se manter na conformação sugerida na análise de *docking* molecular.

No caso da lipase nativa, é possível observar, no início da simulação (figura 59-A), que a distância do grupo carbonilo do éster até ao grupo álcool do resíduo de serina 146, pertencente à tríade catalítica, é de 8,3 Å, ou seja, não é possível estabelecer interações polares, uma vez que a distância entre os grupos em questão é superior a 3,5 Å. Este facto está em concordância com os resultados obtidos no *docking* molecular (figura 58-A), uma vez que não se encontra representada nenhuma interação entre o éster sintetizado e o resíduo de serina 146. No último *frame* de simulação (figura 59-B), é possível observar que a distância entre os dois grupos referidos anteriormente aumenta, ou seja, o éster revela uma tendência a afastar-se do centro ativo da enzima. Estes

resultados adicionados ao resultado obtido através de *docking* molecular revelam que o enfraquecimento das interações estabelecidas entre a enzima e o éster permite explicar o motivo pelo qual a reação não ocorre quando catalisada pela lipase nativa. Os resultados obtidos com a lipase modificada também estão em concordância com os resultados obtidos no *docking* molecular (figura 58-B). No início da simulação de dinâmica molecular, a distância entre o grupo carbonilo do éster e o grupo álcool do resíduo de serina 146 da lipase modificada é de 3,2 Å (figura 59-C). No final dos 10 ns de simulação de dinâmica molecular, ou seja, na última estrutura obtida pelo éster, é possível observar que a distância entre os grupos funcionais referidos anteriormente aumentou bastante, sendo o valor obtido de 19,7 Å (figura 59-D). É possível concluir que o éster se afasta do centro ativo da enzima, de tal maneira, que acaba por sair da cavidade enzimática. Este resultado mostra que, apesar da interação inicial com o centro ativo, o éster tem tendência a sair do centro da enzima, justificando o insucesso da reação de esterificação catalisada pela lipase modificada.

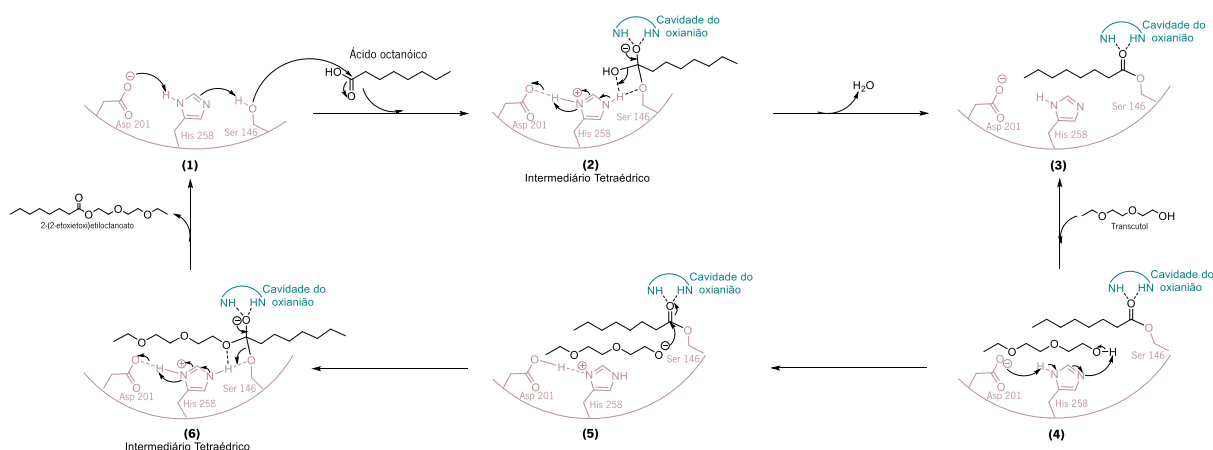


**Figura 59.** Representação da posição adquirida pelo éster 2-etoxietiloleato (**7d**) no início da simulação de dinâmica molecular com a lipase nativa **(A)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(C)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup> e no final da simulação com a lipase nativa **(B)** (PDB:1TIB) e com a lipase modificada **(D)** (PDB:1TIB modificada)<sup>44</sup>, sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de oxigênio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

O mecanismo de catálise enzimática para as reações de esterificação rege-se de modo semelhante para todos os ésteres sintetizados com sucesso. Com base na literatura<sup>38</sup>, foi possível



propor, na figura 60, o mecanismo para a síntese do éster **6a**. A transferência de prótons entre os resíduos da tríade catalítica (Serina 146, Aspartato 201 e Histidina 258) constitui o primeiro passo do mecanismo proposto, ativando o grupo hidroxilo da serina (**1**). Este resíduo de serina, que funciona como nucleófilo, ataca o grupo carbonilo do ácido carboxílico (ácido octanóico), formando assim o primeiro intermediário tetraédrico (**2**). A carga negativa é estabilizada pela cavidade do oxianião, através das ligações de hidrogênio das amidas da lipase. Em seguida, regenera-se o grupo carbonilo, levando à libertação de água e a formação do complexo acil-enzima (**3**). O passo seguinte é a ativação do álcool (transcutol) executada pelo resíduo de histidina (**4**). O último passo é o ataque nucleofílico do grupo hidroxilo do álcool (transcutol) ao grupo carbonilo do éster (**5**) (ácido octanóico-serina), formando o segundo intermediário tetraédrico (**6**). Este último passo provoca a libertação do produto reacional (éster **6a**) e a regeneração da tríade catalítica da enzima.

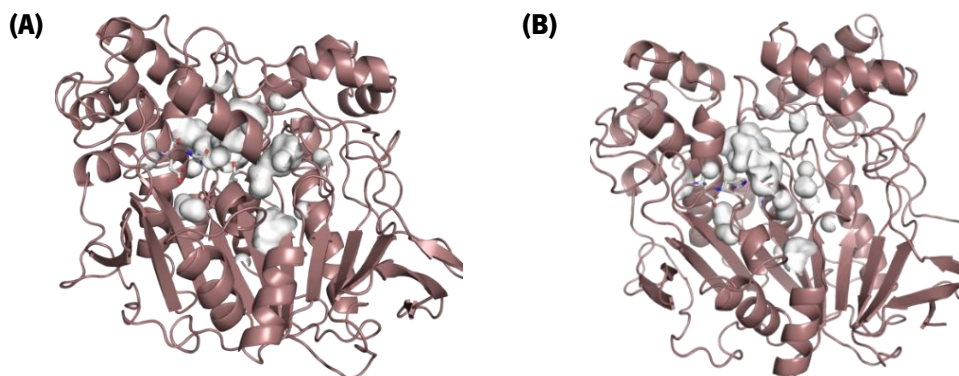


**Figura 60.** Mecanismo proposto para a reação de esterificação do 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) catalisada pela lipase *Aspergillus oryzae*. A tríade catalítica encontra-se representada a rosa, a enzima a azul e o éster/ácido/álcool a preto (adaptado de <sup>38</sup>).

### 3.1.2. Síntese catalisada pela lipase nativa da *Candida rugosa* com solvente

A síntese de ésteres com o transcutol e com o 2-etoxietanol foi também realizada com outras lipases, com o objetivo de observar a sua capacidade catalítica na síntese de ésteres anfifílicos. A lipase nativa da *Candida rugosa* é uma enzima bastante explorada na síntese de ésteres para aplicações industriais, nomeadamente de óleos e aromas na indústria cosmética e farmacêutica. Neste trabalho, verificou-se que esta lipase não possuía nenhuma atividade de esterificação para a síntese dos compostos emulsificantes desejados, recuperando-se os reagentes de partida no final das reações.

Os resultados obtidos foram explicados por modelação molecular. A tríade catalítica desta enzima é formada pelos resíduos de Serina 209, o Glutamato 341 e a Histidina 449, sendo que o glutamato funciona como parte ácida da tríade catalítica, ou seja, forma uma ligação de hidrogénio com a histidina, que é um resíduo básico, restringindo a rotação deste aminoácido. Na conformação fechada (figura 61-A), a superfície livre que existe perto do centro ativo para alojar novas moléculas é de difícil acesso, devido ao impedimento estereoquímico. Na conformação aberta (figura 61-B), ou seja, após decorrer a ativação interfacial, a “tampa” abre e conseqüentemente expõe o centro ativo. No entanto, esta exposição não é suficiente, uma vez que o espaço disponível nesta conformação para alojar novas moléculas aparece na parte superior do centro ativo e não no centro da tríade catalítica, que é o local onde ocorre a reação. O difícil acesso à tríade catalítica, mesmo em conformação aberta pelos reagentes de partida utilizados, justifica a ineficiência catalítica desta enzima nas reações de esterificação em estudo.



**Figura 61.** Representação tridimensional da superfície disponível para alojar novos ligandos na lipase nativa *Candida rugosa* na conformação fechada (A) (PDB: 1TRH) e na conformação aberta (B) (PDB: 1CRL), sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho e as superfícies que indicam cavidades ao redor do centro ativo representadas a cinzento. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigénio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

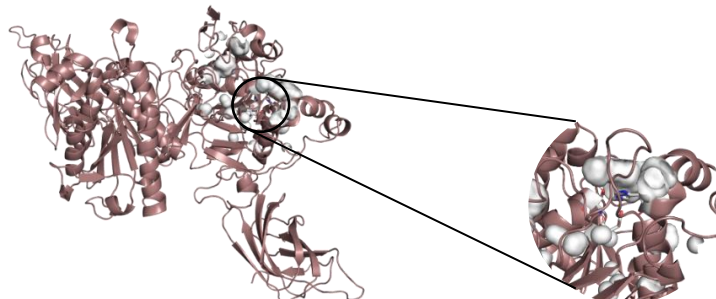
### 3.1.3. Síntese catalisada pela lipase nativa da *porcine pancreas* com solvente

A lipase nativa da *porcine pancreas* também foi estudada, uma vez que é uma das enzimas mais económicas comercialmente disponíveis. Os resultados obtidos com o transcutool e com o 2-etoxietanol foram bastante semelhantes aos resultados obtidos com a lipase nativa da *Candida rugosa*, uma vez que nenhum dos compostos pretendidos foram sintetizados. De modo semelhante, recorreu-se ao *docking* molecular para compreender os resultados obtidos.

Esta enzima é constituída por duas cadeias e a tríade catalítica é constituída por um resíduo que funciona como nucleófilo (Serina 153), um resíduo ácido (Aspartato 177) e um resíduo básico

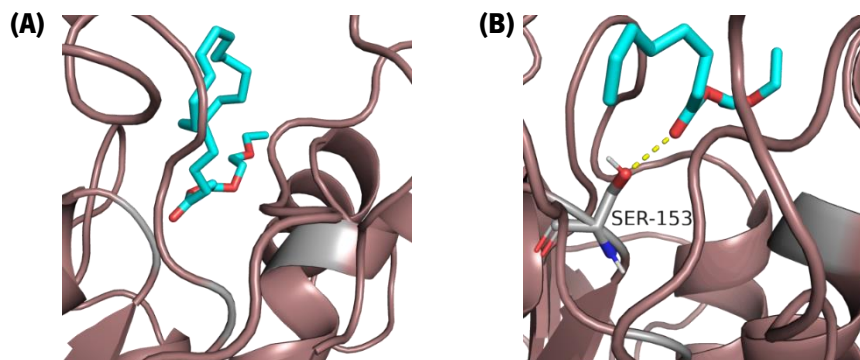


(Histidina 264). Na figura 62 é ilustrado o espaço disponível para alojar novos ligandos nesta lipase, verificando-se que este se encontra acima do centro ativo. Estes resultados demonstram que a interação entre os reagentes de partida e os aminoácidos polares do centro ativo é dificultada, levando a que a reação não ocorra.



**Figura 62.** Representação tridimensional da superfície disponível para alojar novos ligandos na lipase nativa da *porcine pancreas* (PDB:1ETH), sendo a enzima representada em *cartoon* castanho e as superfícies que indicam cavidades ao redor do centro ativo representadas a cinzento. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

De modo a clarificar as diferenças entre ligandos com cadeia comprida e cadeia curta, foram realizados estudos de *docking* molecular. No caso do 2-etoxietilcanoato (**7a**), o único ligando de cadeia curta, é possível observar uma interação polar com um resíduo da tríade catalítica. No entanto este não está completamente inserido na cavidade enzimática, o que abre a possibilidade de afastamento do éster e conseqüente quebra de interação. No caso dos restantes ésteres, a interação com a enzima ocorre através de interações apolares e é possível observar que o éster se encontra acima do centro ativo.



**Figura 63.** *Docking* de um ligando de cadeia comprida - 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) (A) e um ligando de cadeia curta - 2-etoxietilcanoato (**7a**) (B) com a lipase nativa da *porcine pancreas* (PDB:1ETH), sendo as enzimas representadas em *cartoon* castanho, o éster representado a ciano, o centro ativo a cinzento e as interações polares a tracejado amarelo. Os átomos de azoto estão destacados a azul e os átomos de oxigênio a vermelho (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

Outro fator que pode justificar o insucesso das reações quando utilizadas as lipases nativas da *Candida rugosa* ou da *porcine pancreas* é o facto de o álcool poder causar inibição da enzima, fazendo com que esta não exerça a sua função catalítica.<sup>63</sup>

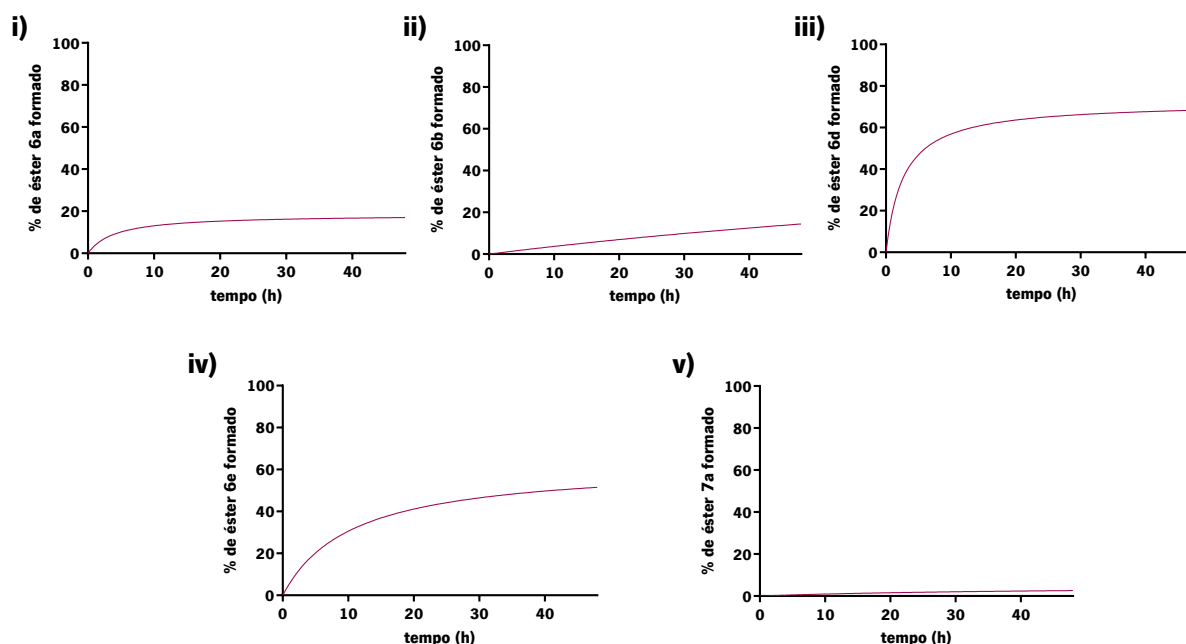
#### **3.1.4. Síntese catalisada pela lipase modificada da *Aspergillus oryzae* sem solvente**

De entre as quatro lipases testadas, a lipase modificada da *Aspergillus oryzae* demonstrou-se como sendo a mais eficiente, levando ao isolamento dos compostos **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e** e **7a**. De modo a tornar o processo de síntese mais amigo do ambiente e económico, as mesmas reações foram testadas na ausência de *n*-heptano. O produto 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) não foi sintetizado, uma vez que o ácido palmítico é sólido à temperatura reacional (37°C), o que torna o processo inviável.

Os resultados obtidos (figura 64) revelam que apenas foram sintetizados os produtos **6d** e **6e**, no final de 48 horas de reação, com uma percentagem de conversão de 74% e 50%, respetivamente. A baixa mobilidade da enzima perante um sistema mais viscoso (sem solvente) pode justificar os resultados obtidos.

O papel do solvente em reações de esterificação catalisadas por enzimas é bastante relevante devido ao fenómeno de ativação interfacial, sendo este necessário para abrir a “tampa” e consequentemente ativar a enzima, para que esta possa catalisar a reação de esterificação. Estudos anteriores<sup>64</sup> revelam que as lipases são mais ativas em solventes pouco polares ou apolares, uma vez que a abertura da “tampa” provoca pequenas alterações conformacionais que desempenham um papel fundamental no mecanismo de ativação. Deste modo, a enzima sem solvente é pouco ativa, devido ao carácter hidrofílico dos álcoois usados, regendo-se exclusivamente pela hidrofobicidade do ácido. No caso do ácido oleico e do ácido linoleico, que são ácidos gordos insaturados e de maior tamanho de cadeia carbonada, verifica-se uma maior eficiência na ativação enzimática e por isso a reação ocorre na ausência de solvente. No caso do ácido octanóico e do ácido decanóico, como são ácidos saturados e de menor tamanho de cadeia, a hidrofobicidade global torna-se insuficiente para ocorrer a ativação da enzima, levando consequentemente ao insucesso das reações de esterificação.

A obtenção dos produtos **6d** e **6e** foi confirmada através do espectro de <sup>1</sup>H RMN, pela integração dos prótons constituintes da molécula, comparando aos produtos isolados anteriormente (secção 2.1.2).



**Figura 64.** Gráficos com a percentagem de conversão das reações catalisadas pela lipase modificada da *Aspergillus oryzae* sem solvente ao longo do tempo: **i)** éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**), **ii)** éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**), **iii)** éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**), **iv)** éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) e **v)** éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**).

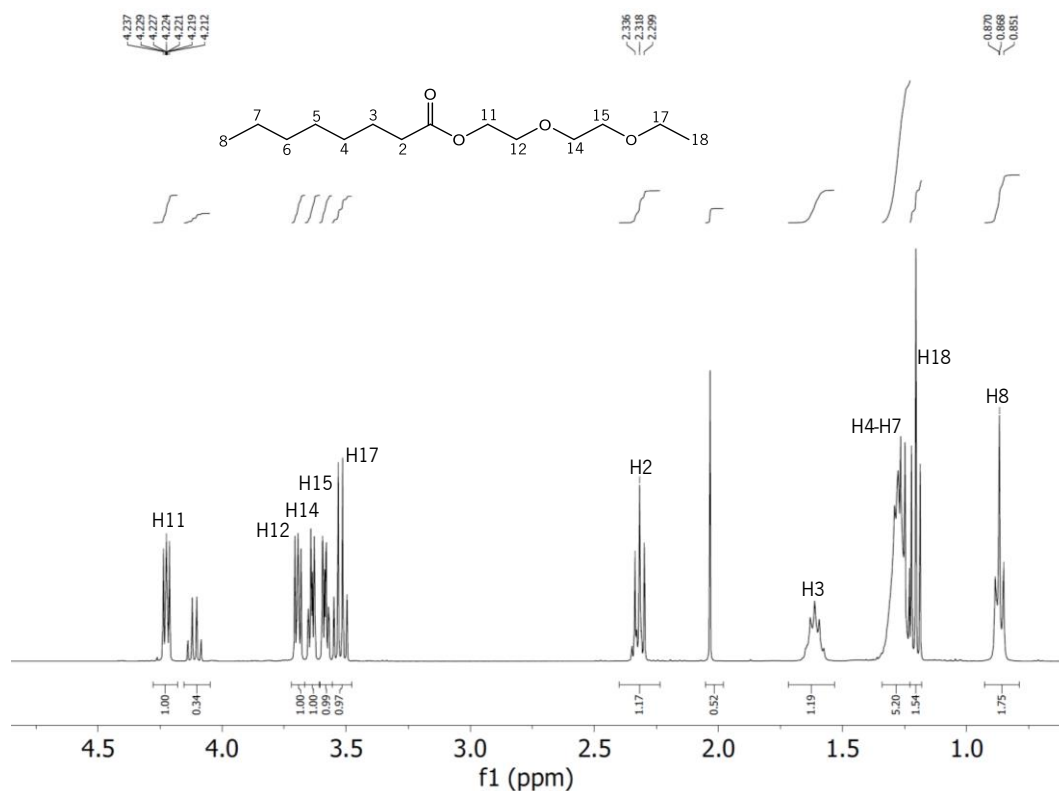
### 3.1.5. Caracterização dos ésteres isolados

Os ésteres sintetizados com sucesso, através da utilização da lipase modificada da *Aspergillus oryzae* (tabela 3) como catalisador, foram sujeitos a uma caracterização mais aprofundada.

**Tabela 3.** Tabela representativa dos ésteres sintetizados com sucesso posteriormente caracterizados

	Ácido octanóico	Ácido decanóico	Ácido palmítico	Ácido oleico	Ácido linoleico
<b>Transcutol</b>	✓6a	✓6b	✓6c	✓6d	✓6e
<b>2-Etoxietanol</b>	✓7a				

A obtenção dos produtos acima referidos foi confirmada através do espectro de  $^1\text{H}$  RMN, pela integração dos prótons constituintes da molécula. No caso dos ésteres sintetizados foi possível observar os picos característicos da parte polar do éster, ou seja, da parte proveniente do álcool, no intervalo de desvios químicos  $\delta_{\text{H}}$  3,5 e 4,5 ppm e os picos característicos da cadeia carbonada, entre os  $\delta_{\text{H}}$  0,5 e 2,5 ppm (exemplificado na figura 65). Os prótons adjacentes ao oxigênio do grupo éster surgem como um novo sinal a  $\delta_{\text{H}}$  4,22 ppm. Os desvios químicos mais elevados na parte polar da molécula, podem ser justificados pela maior desblindagem dos átomos de hidrogênio, devido à nuvem eletrônica do átomo de oxigênio. Os restantes espectros são semelhantes ao representado (apêndice B).

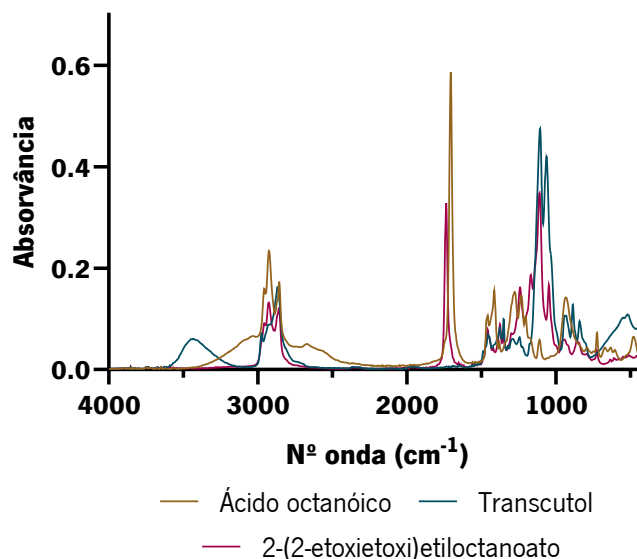


**Figura 65.** Espetro  $^1\text{H}$  RMN do composto 2-(2-etoxietoxi)etil octanoato (**6a**).

Todos os produtos sintetizados foram caracterizados por espectrometria de massa, tendo sido obtido o valor de peso molecular esperado.

A análise de FTIR (exemplificada na figura 66) foi bastante relevante para confirmar a obtenção do produto pretendido, uma vez que foi possível observar uma banda intensa a aproximadamente  $1100\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento da ligação simples C-O do éster. Igualmente relevante é o desaparecimento da banda característica correspondente ao grupo hidroxilo terminal do álcool (-OH), no intervalo  $3400\text{ cm}^{-1}$  -  $3000\text{ cm}^{-1}$ . A banda correspondente à ligação simples C-O do ácido carboxílico encontra-se a aproximadamente  $1300\text{ cm}^{-1}$ , enquanto a banda correspondente à mesma ligação no éster encontra-se a aproximadamente  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Esta alteração pode ser explicada pela ligação mais forte no ácido carboxílico, uma vez que este pode formar pontes de hidrogénio intermoleculares, ou seja, esta ligação necessita de mais energia para alongar, o que faz com que o se encontre a um número de onda superior. A banda correspondente ao grupo carbonilo (C=O), no espectro do ácido carboxílico encontra-se aproximadamente a  $1700\text{ cm}^{-1}$  e no espectro do éster sintetizado situa-se aproximadamente a  $1750\text{ cm}^{-1}$ , o que pode ser explicado pela maior conjugação do ácido em relação ao éster, o que reduz o número de onda. O alongamento simétrico e assimétrico correspondente aos grupos  $\text{CH}_2$  que constituem a cadeia carbonada verificam-se nos reagentes e nos produtos da reação

numa banda a aproximadamente  $2900\text{ cm}^{-1}$ . Os restantes espectros são semelhantes ao representado (apêndice B).



**Figura 66.** Espectro de FTIR do composto 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) e respetivos reagentes de partida (ácido octanóico e transcutool).

Diversas outras técnicas, como a medição do pH, índice de refração, viscosidade, propagação, polaridade, densidade e da tensão superficial e a determinação do coeficiente de partição e a análise termogravimétrica foram realizadas de modo a obter uma caracterização mais aprofundada dos ésteres sintetizados (tabela 4). Esta extensiva caracterização foi efetuada atendendo à necessidade da implementação futura destes compostos numa formulação cosmética. A única exceção verificou-se para o éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**), uma vez que este é sólido à temperatura ambiente, tendo um ponto de fusão de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Os valores de pH obtidos estão no intervalo de 3,6 a 4,4, como representado na tabela 4. No entanto, estes valores são mais ácidos do que o esperado, uma vez que o composto sintetizado é um éster, logo o seu pH deveria estar no intervalo de 6-7. O valor obtido pode ser explicado pela presença de uma quantidade residual de ácido (reagente de partida), que não é visível no espectro de  $^1\text{H}$  RMN. Os valores de pH, embora ácidos são aceitáveis tendo em conta o pH da pele (4,1 - 5,8) e das formulações cosméticas (4 - 6)<sup>65</sup>.

Os valores do índice de refração obtidos para os ésteres sintetizados foram bastante semelhantes entre si, atendendo às suas semelhanças estruturais. Através da tabela 4 é possível observar que o éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**), tem o valor mais elevado (1,4558) o que significa que a luz passa entre meios a uma velocidade menor e o éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**) tem o valor mais baixo (1,4192), ou seja, a luz transita a uma velocidade superior.

Os resultados obtidos no teste de propagação e a viscosidade dos ésteres sintetizados podem ser relacionados entre si, como relatado em estudos anteriores.<sup>66</sup> Geralmente, quanto maior a viscosidade do éster, menor a sua propagação. Apesar da relação quase direta entre as duas propriedades, existem outros fatores necessários a considerar como a densidade e a tensão superficial. Neste caso, os resultados obtidos revelam que os ésteres 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) e 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) não estão de acordo com esta relação, o que pode ser explicado pela estrutura do composto. Estes dois ésteres revelam insaturações na sua estrutura, sendo este fator relevante quando avaliada a viscosidade do composto, uma vez que o grau de insaturação está relacionado com valores superiores de viscosidade.

**Tabela 4.** Caracterização dos ésteres sintetizados com o valor do pH, do índice de refração, da viscosidade e da propagação

	pH	Índice de refração (nD)	Viscosidade (mPa)	Propagação (mm <sup>2</sup> /min)
<b>6a</b>	4,05	1,4540	3,26	14,3
<b>6b</b>	4,21	1,4280	4,41	10,4
<b>6c</b>	4,19	ND	4,59 <sup>a</sup>	ND
<b>6d</b>	4,45	1,4558	17,8	12,3
<b>6e</b>	3,68	1,4312	15,0	16,5
<b>7a</b>	4,34	1,4192	2,50	20,9

<sup>a</sup>Medição efetuada a 37°C.

ND: Não determinado atendendo à natureza do éster **6c** (sólido à temperatura ambiente).

Os resultados do logaritmo do coeficiente de partição (log P) e os valores de energia de transição molar obtidos para os ésteres sintetizados, representados na tabela 5, podem ser relacionados entre si. Os valores de energia de transição molar indicam a capacidade de um solvente dissolver substâncias e estão diretamente relacionados com a polaridade do composto sintetizado. Neste teste, quanto maior a energia de transição molar, menos polar o composto e, neste caso, as substâncias utilizadas como referência foram a água e o etanol, que apresentaram valores de 50,96 kcal/mol e 55,41 kcal/mol, respetivamente. Os valores relativos aos ésteres sintetizados e aos reagentes de partida encontram-se no intervalo das referências utilizadas, de onde é possível concluir que os compostos 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**), 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) e 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) são mais polares que o composto **7a**, uma vez que os valores são mais próximos do valor obtido para a água. No entanto, no caso dos ésteres **6d** e **6e**, os valores obtidos são

superiores ao valor do etanol, o que se traduz numa menor polaridade do composto. Este valor pode ser explicado pelo maior carácter hidrofóbico dos ésteres, pois contêm as cadeias carbonadas mais longas, traduzindo-se também num valor superior do logaritmo do coeficiente de partição. No caso do éster **6c** este revela uma menor polaridade, mas um logaritmo do coeficiente de partição superior aos restantes ésteres com a mesma polaridade. Este resultado pode ser justificado pelo maior carácter hidrofóbico do ácido palmítico, visto que o seu valor de energia de transição molar é 69,5645 kcal/mol (411 nm). Os valores da densidade revelam que os ésteres sintetizados são menos densos que a água e podem também ser relacionados com a sua tensão superficial, pois, de um modo geral, quanto maior a densidade, maior a tensão superficial.<sup>67</sup>

**Tabela 5.** Tabela com os valores de polaridade, do coeficiente de partição, da densidade e da tensão superficial dos ésteres sintetizados

	<b>Energia de transição molar (kcal/mol) (<math>\lambda</math>, nm)</b>	<b>Log P<sup>a</sup></b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Tensão superficial (mN/m)</b>
<b>6a</b>	54,047 (529)	3,29	0,906	25,525±0,098
<b>6b</b>	54,047 (529)	4,30	0,899	27,260±0,097
<b>6c</b>	54,047 (529)	7,33	0,887	ND
<b>6d</b>	57,877 (494)	7,86	0,920	27,010±0,012
<b>6e</b>	61,092 (468)	7,13	0,939	30,873±0,010
<b>7a</b>	54,983 (520)	3,50	0,882	25,887±0,057

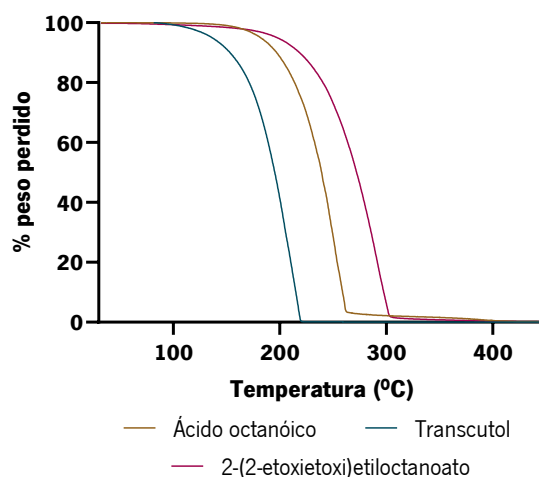
<sup>a</sup>Valor teórico calculado a partir do site <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>

ND: Não determinado atendendo à natureza do éster **6c** (sólido à temperatura ambiente).

Os resultados obtidos na análise termogravimétrica revelam que a temperatura de degradação máxima dos produtos sintetizados é de 290°C para o produto **6a** (exemplificado na figura 67), 303°C para o produto **6b**, 363°C para o produto **6c**, 371°C para o produto **6d**, 359°C para o produto **6e** e 253°C para o produto **7a**. A tabela seguinte revela que a percentagem de peso perdido não corresponde totalmente à amostra analisada, uma vez que a percentagem perdida até aos 100°C corresponde a água contida na amostra. Todos os produtos obtidos são termicamente mais estáveis que os reagentes de partida, tal como o esperado, atendendo a outros exemplos reportados na literatura.<sup>68</sup> Os restantes espectros são semelhantes ao representado (apêndice B).

**Tabela 6.** Patamares de degradação da análise termogravimétrica dos ésteres sintetizados, bem como dos seus reagentes de partida

		$\Delta_{\text{peso}} (\%)$	$T_{\text{dmáx}} (^\circ\text{C})$
<b>Ácido carboxílico</b>	Ácido octanóico	97,404	249,49
	Ácido decanóico	96,220	274,08
	Ácido palmítico	94,892	340,52
	Ácido oleico	93,987	350,60
	Ácido linoleico	95,358	350,44
<b>Álcool</b>	Transcutol	99,924	215,66
	2-etoxietanol	99,814	168,90
<b>Éster</b>	6a	97,734	290,38
	6b	88,484	303,28
	6c	96,838	363,62
	6d	97,675	371,35
	6e	91,243	359,00
	7a	98,459	253,33

**Figura 67.** Gráfico representativo da análise termogravimétrica do composto 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) e dos seus reagentes de partida.

### 3.2. Propriedades emulsificantes de ésteres

Nos últimos anos, o consumo de produtos cosméticos tem aumentado em todos os pontos do globo. Um mundo mais sustentável levou a que a indústria cosmética tivesse necessidade de inovar os

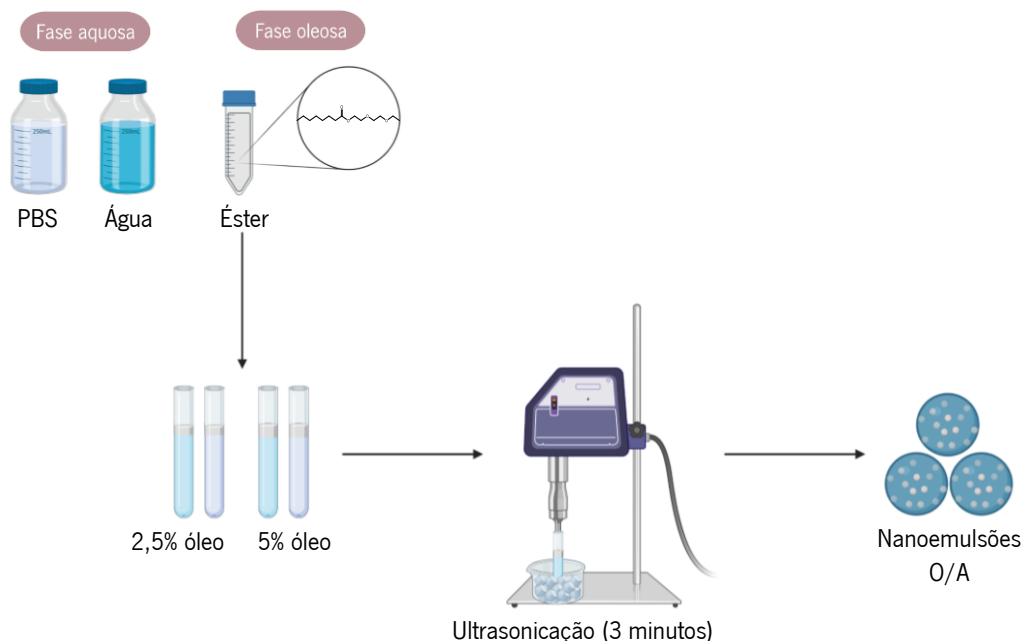


seus métodos de produção, com o objetivo de responder às novas necessidades de mercado. A produção de cosméticos passou, por isto, a considerar essencial o balanço entre a produção química e natural de um produto.<sup>69</sup> A maioria dos produtos cosméticos produzidos atualmente têm um processo de produção com base em ingredientes naturais, derivados de recursos renováveis, utilizando práticas ecologicamente corretas. Na indústria cosmética, a escolha de ingredientes naturais que substituam os utilizados até à data pode ser desafiante, uma vez que cada ingrediente reflete o seu efeito na pele, e deste modo, é necessário garantir a segurança e a estabilidade da formulação produzida, bem como a manutenção da sua qualidade e eficácia, considerando esta alteração. Um dos ingredientes que tem sido substituído por alternativas mais amigas do ambiente é o emulsificante, uma vez que este estabiliza nanoemulsões, que são cada vez mais utilizadas em formulações cosméticas. Os emulsificantes não iónicos são moléculas com carácter hidrofóbico e hidrofílico, pelo que podem ser substituídos por outros ésteres, desde que a síntese destes se revele amiga do ambiente (sem solvente, baixas temperaturas e com recurso a biocatalisadores).<sup>70</sup>

Deste modo, o potencial emulsificante dos ésteres previamente sintetizados com sucesso (éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato **(6a)**, 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato **(6b)**, 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato **(6c)**, 2-(2-etoxietoxi)etiloleato **(6d)**, 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato **(6e)** e 2-etoxietiloctanoato **(7a)**) foi explorado para a produção de nanoemulsões O/A. Especificamente, o éster foi utilizado como fase oleosa e diferentes fases aquosas foram inicialmente investigadas, de modo a observar o efeito dos sais e pH na produção e estabilização das nanoemulsões. As emulsões O/A foram produzidas com 2,5% e 5% de fase oleosa, com base em estudos anteriores (figura 68).<sup>71</sup> As quantidades de fase oleosa testadas não foram superiores a 5%, uma vez que estudos anteriores revelam que quantidades superiores de fase oleosa são pouco eficientes na formação de nanoemulsões, pelo seu potencial nocivo.<sup>71</sup> Neste caso, como as duas fases são imiscíveis, foi necessário recorrer a um método de emulsificação de alta energia, no qual as forças são geradas através de métodos mecânicos, como a ultrasonicação.<sup>5</sup> Este método é necessário porque a energia das duas fases separadas é menor do que a energia da nanoemulsão. Baseado neste facto, a ultrasonicação é feita num banho de gelo, com o objetivo de diminuir a energia necessária para o processo de emulsificação, em condições previamente otimizadas<sup>47</sup>. Foi previamente reportado que, nestas condições, as nanopartículas obtidas são mais pequenas e estáveis.<sup>72</sup>

As nanoemulsões foram inicialmente estudadas com tampões com pH próximo ao pH da pele (4,1-5,8): ácido cítrico/citrato de sódio (0,1 M; pH=5), ácido cítrico/fosfato dissódico (0,1 M/ 0,2 M;

pH=5,8) e hidrogenofosfato dissódico/dihidrogenofosfato de sódio (0,2 M; pH=5,9). No entanto, estas não se revelaram estáveis, o que levou a que as nanoemulsões fossem posteriormente feitas com o tampão fosfato-salino (PBS) e com água. A solução-tampão de PBS foi utilizada pois as concentrações de iões e o poder osmótico são bastante semelhantes às do corpo humano e não é tóxico para a maioria das células do corpo humano <sup>73</sup>.



**Figura 68.** Esquema de formação das nanoemulsões (exemplificado com o éster **6a**) (Imagem criada em *Biorender.com*).

### 3.2.1 Caracterização das emulsões

A caracterização das nanoemulsões formadas a partir dos ésteres previamente sintetizados teve como foco principal a verificação da estabilidade destas ao longo do tempo com recurso à técnica do espalhamento dinâmico de luz (DLS). Esta técnica permite medir o tamanho das nanopartículas e o potencial zeta associado às mesmas. O *Nanosight* também foi utilizado, uma vez que, para além de medir o tamanho das nanopartículas, permite ainda obter a concentração de partículas na nanoemulsão.

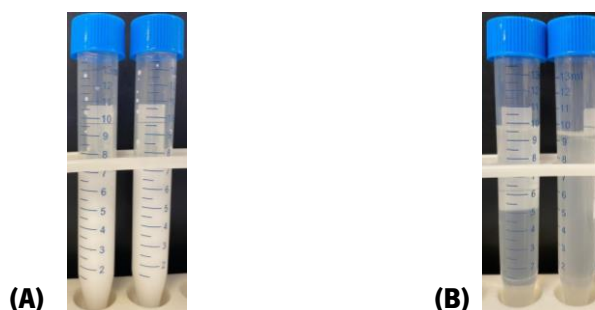
A estabilidade das nanoemulsões foi seguida também através da medição do pH das amostras ao longo dos meses. Todas as nanoemulsões revelaram a manutenção do seu pH desde a sua produção até 1 mês (no caso do tampão PBS) e 4/6 meses (no caso da água destilada), uma vez que depois desse tempo, as nanopartículas deixam de ser estáveis. No caso das nanopartículas em PBS, o pH varia entre 7 e 8, enquanto que no caso das nanopartículas em água, o pH varia entre 5 e 6.

### a) Técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A caracterização através da técnica de DLS foi efetuada a todas as emulsões produzidas, fornecendo informações sobre o tamanho das nanopartículas (diâmetro), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta, ou seja, a carga superficial da nanopartícula. Simulações de dinâmica molecular também foram efetuadas nesta parte do trabalho, de modo a observar se a agregação das moléculas emulsificantes, em meio aquoso, ocorre de forma organizada ou aleatória.<sup>74,75</sup>

A aplicação cosmética das nanoemulsões produzidas faz com que o tamanho ideal das nanopartículas produzidas seja no intervalo de 20 nm a 200 nm, no entanto, são aceitáveis nanopartículas com tamanho até 500 nm. Geralmente, ao aumentar a quantidade de emulsificante utilizado, a tendência é a diminuição do tamanho das nanopartículas obtidas.<sup>6</sup> O índice de polidispersividade descreve o grau de uniformidade das nanopartículas que constituem as nanoemulsões e varia entre 0 (amostra uniforme) e 1 (amostra altamente polidispersa).<sup>76</sup> O potencial zeta associado às nanopartículas indica o grau de repulsão entre partículas adjacentes de carga semelhante, sendo 25 mV (valor positivo ou negativo) o valor considerado arbitrário que separa superfícies de alta carga das de baixa carga, uma vez que este valor foi considerado suficiente para criar uma barreira de energia entre as nanopartículas e evitar agregação.<sup>77</sup> Por um lado, um elevado valor de potencial zeta confere estabilidade à nanoemulsão, levando as partículas a resistir à coalescência molecular, e, por outro lado, quando o valor de potencial zeta é baixo, a atração excede a repulsão e as partículas revelam uma tendência de coalescência. Quanto mais negativo for este parâmetro, maior será a carga elétrica das partículas e mais estável será a emulsão.<sup>73,78</sup>

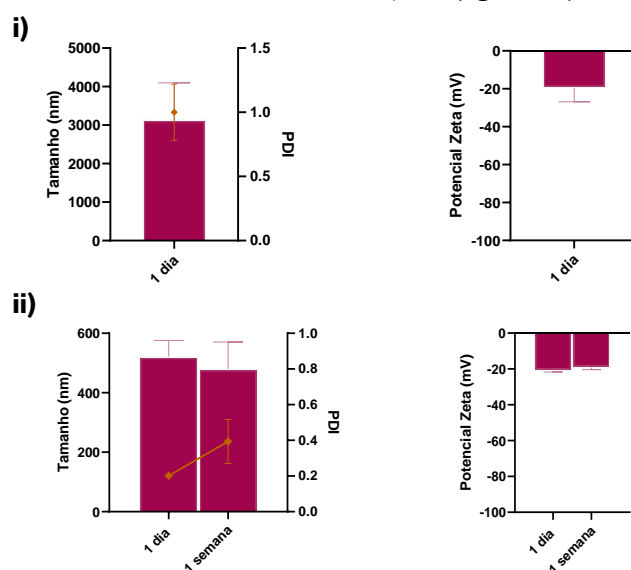
Todas as nanoemulsões preparadas revelaram um aspeto homogêneo, fluido e branco (A), como representado na figura 69, enquanto estáveis, passando a um aspeto heterogêneo e transparente (B) quando instáveis, observando-se nitidamente uma separação de fases.



**Figura 69.** Representação do aspeto das nanoemulsões preparadas enquanto estáveis - homogêneo, fluido e branco (A) e quando deixam de ser estáveis - heterogêneo e transparente (B).

As nanoemulsões O/A produzidas foram avaliadas em termos de tamanho, PDI e potencial zeta desde a sua formação até deixarem de ser estáveis.

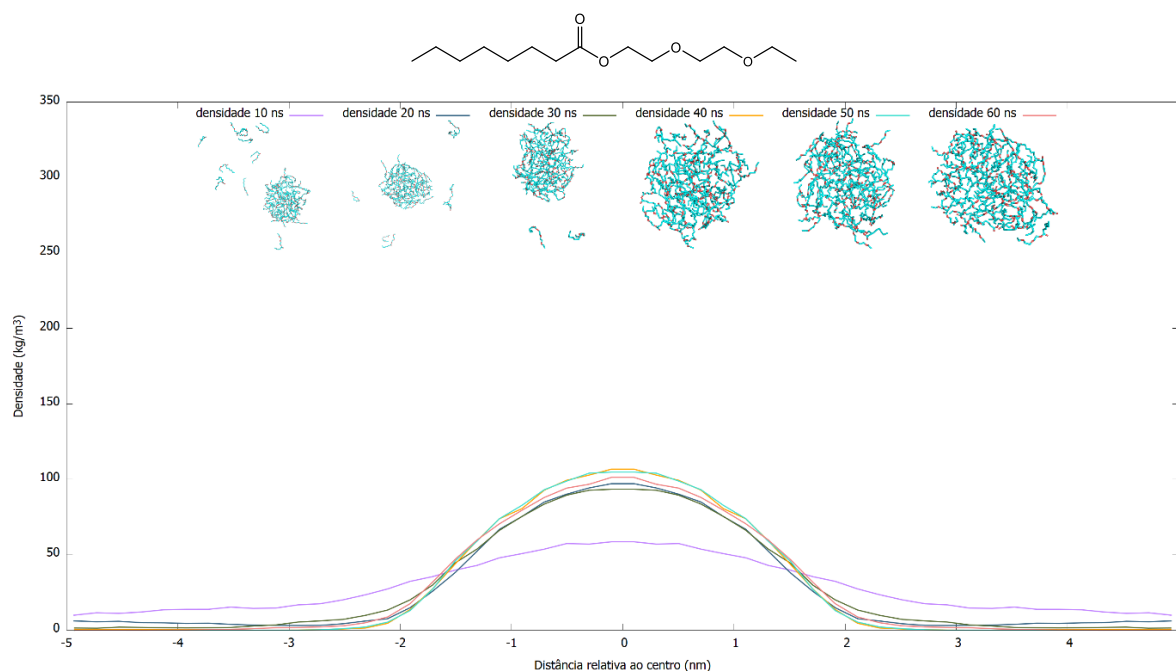
Os resultados obtidos com o produto 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) revelaram que as nanoemulsões formadas a partir deste éster não são estáveis, com nenhuma das fases aquosas testadas. O tamanho das nanopartículas obtidas no tampão PBS foi de aproximadamente 3000 nm com um índice de polidispersividade associado de 1. No caso do tamanho das nanopartículas em água, o tamanho é superior a 500 nm com um PDI de 0,300 (figura 70).



**Figura 70.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) com: **i**) o tampão PBS e **ii**) água, armazenadas a 4°C durante 1 semana e 1 mês, respetivamente (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).

Atendendo ao seu elevado tamanho, as nanoemulsões formadas com o éster **6a** não podem ser utilizadas para aplicação cosmética, pelo que a sua caracterização não foi avante. Em ambos os casos, o potencial zeta é menor que -25 mV, o que significa que a atração entre as nanopartículas excede a repulsão, provocando coalescência da nanoemulsão. Este facto foi observado através da separação de fases ao final de um dia após formação, no caso do tampão PBS e após uma semana, no caso da água. Estes resultados podem ser explicados pelo maior carácter hidrofílico do composto em causa, uma vez que a interação com a água é mais forte que a interação com outras moléculas de emulsificante. Simulações de dinâmica molecular também permitiram observar a causa de instabilidade na nanoemulsão. A densidade do agregado formado ao longo dos 60 ns revela a formação de um agregado com perfil micelar (figura 71). A instabilidade da nanoemulsão pode ser explicada pela diferença observada nas curvas de densidade do agregado formado ao longo do tempo, que são pouco acentuadas, indicando que a densidade no centro deste não é muito elevada.<sup>79</sup> Estes

fatores são indicativos de um sistema pouco estável. Além disso, é possível observar a reversão da aproximação das moléculas de emulsificante durante a simulação, pois a densidade aos 40 e 50 nanossegundos de simulação é superior à densidade nos 60 nanossegundos de simulação.

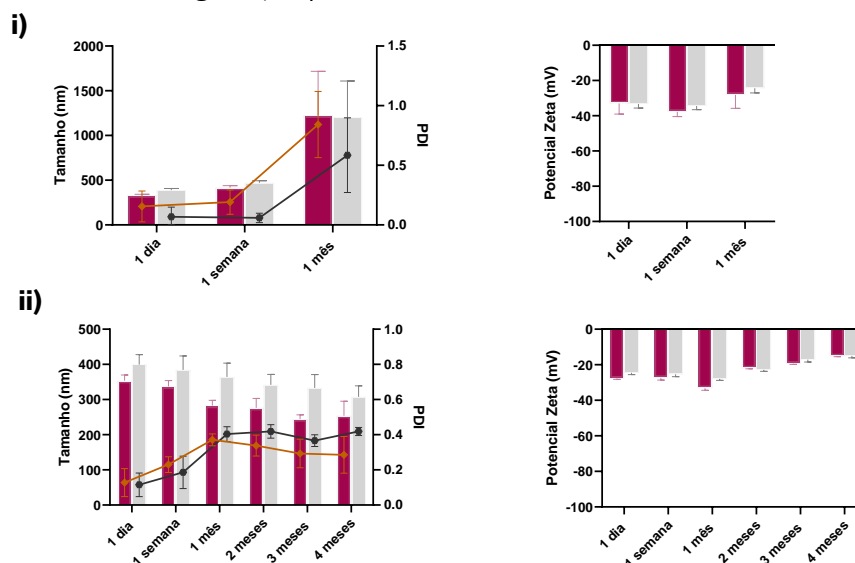


**Figura 71.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6a**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de *cluster* em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

Os resultados com o produto 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) revelaram que as nanoemulsões formadas com este éster são menos estáveis quando formadas com o tampão PBS do que quando formadas com água (figura 72). No caso das nanoemulsões feitas com o tampão PBS, o tamanho das nanopartículas esteve no intervalo aceitável para aplicação cosmética e com um índice de polidispersividade inferior a 0,500. O potencial zeta revelou uma diminuição na medição do primeiro mês, o que pode ser resultado da coalescência das nanopartículas e consequentemente provocando um aumento do PDI da amostra, bem como a alteração do aspeto. No entanto, após 1 mês de produção, verificou-se o aumento substancial no seu tamanho (1200 nm).

No caso das nanoemulsões em água, verifica-se uma elevada estabilidade, observando-se até aos 4 meses de produção, tamanhos de nanopartículas entre os 300 nm e 400 nm e valores de PDI entre 0,200 e 0,400. O potencial zeta destas nanopartículas apresenta um valor mais negativo que -25 mV (entre -27 mV e -33 mV), o que significa que esta superfície é de carga relativamente alta, o que faz com que seja criada uma barreira de energia entre as nanopartículas e evita a coalescência da nanoemulsão. Os resultados obtidos com os dois rácios testados, 2,5% e 5%, são bastante

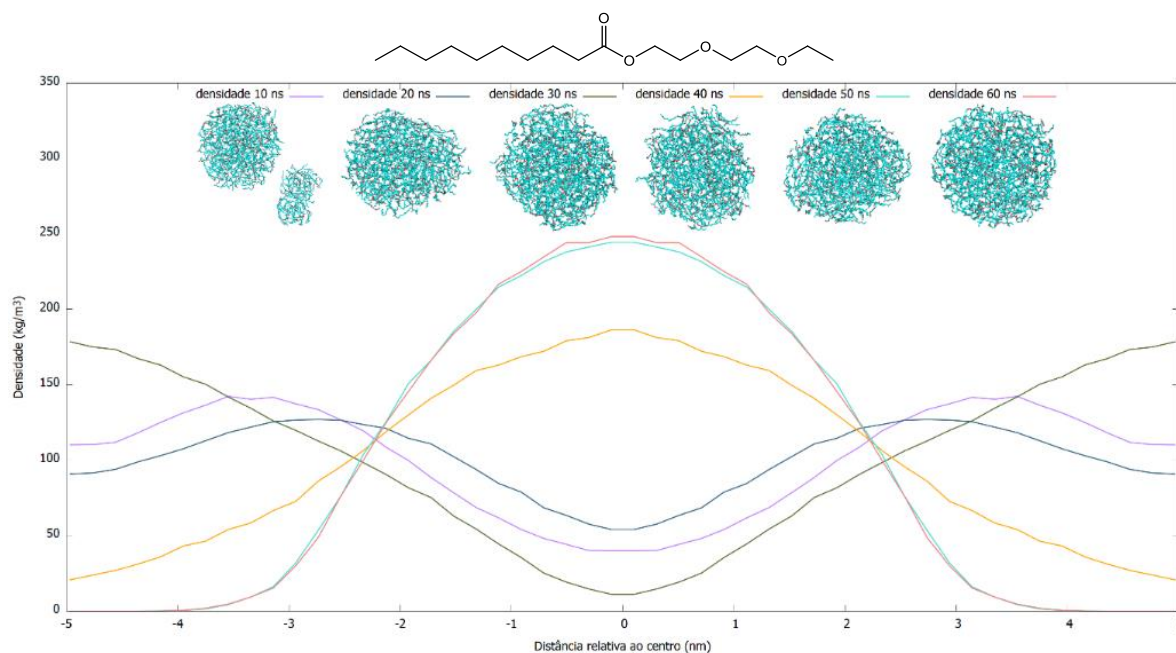
semelhantes, no entanto, as nanoemulsões com 5% de óleo formam nanopartículas de menor tamanho e com potencial zeta mais negativo, o que as torna mais estáveis.



**Figura 72.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) com: **i)** o tampão PBS e **ii)** água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respectivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).

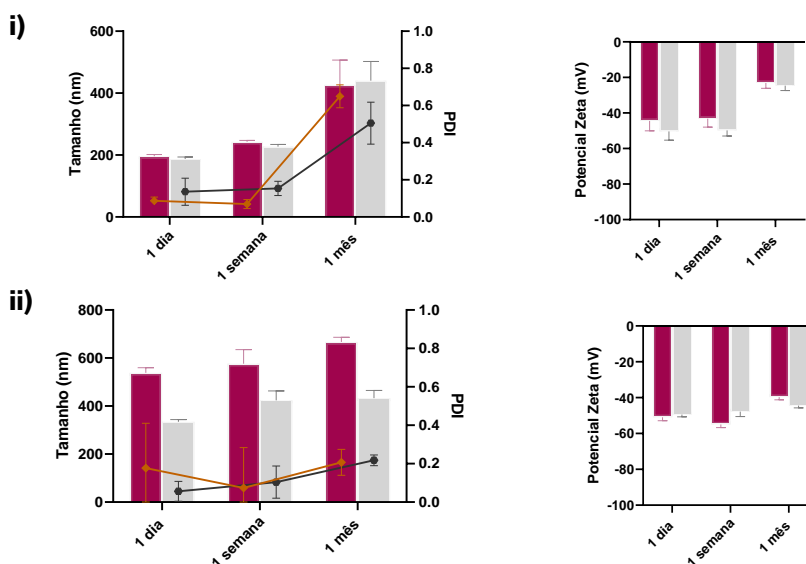
A estabilidade deste sistema é comprovada através de dinâmica molecular (figura 73), na qual é possível observar a estabilização do sistema a partir dos 50 ns, através da aproximação das curvas de densidade. Neste caso, ao fim de 20 ns é possível observar a formação de um agregado molecular, com perfil micelar, que aumenta a sua densidade no decorrer da simulação, uma vez que a curva com um valor mais elevado de densidade corresponde aos 60 ns.<sup>79</sup> A simulação de dinâmica molecular permite também observar que o arranjo destas moléculas ocorre de forma organizada, sendo que as cadeias carbonadas da molécula têm tendência a manter-se no interior da micela formada, enquanto a parte polar fica voltada para o exterior, interagindo com a água na caixa de simulação.

### 3. Discussão de resultados



**Figura 73.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de *cluster* em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

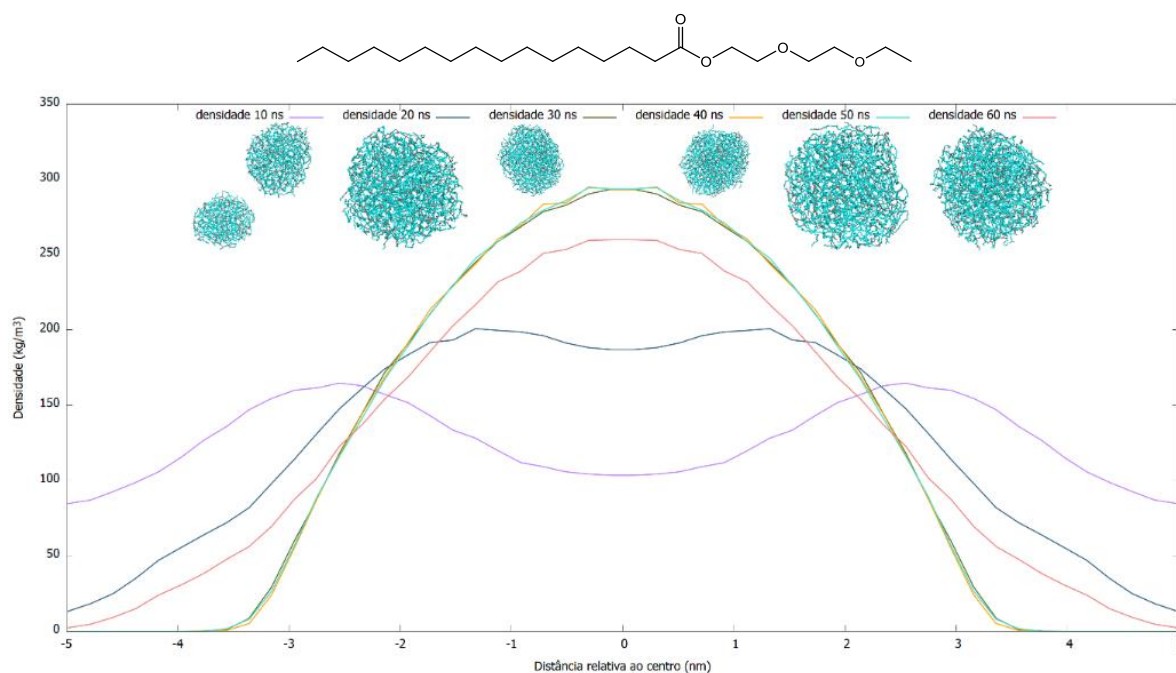
Os resultados com o produto 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) revelam que as nanoemulsões são estáveis apenas no primeiro mês após produção com ambas as fases aquosas usadas (figura 74).



**Figura 74.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) com: **i**) tampão PBS e **ii**) água, armazenadas à temperatura ambiente durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).

No caso das nanoemulsões formadas com o tampão PBS, o tamanho das nanopartículas inicial é inferior a 500 nm, no entanto, o seu índice de polidispersividade e consequente instabilidade após 1 mês, impossibilita a sua aplicação cosmética. No caso das nanoemulsões em água, apesar das amostras se revelarem homogêneas e possuírem baixo PDI, é observado um tamanho de partícula superior a 500 nm. O potencial zeta revela, em ambos os casos, uma diminuição ao longo do tempo, o que pode ser indicativo de perda de estabilidade.

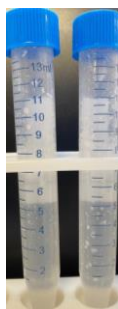
A densidade ao longo da simulação de dinâmica molecular permite concluir que a formação de nanoemulsões com este composto emulsificante é pouco estável, uma vez que a curva correspondente aos 60 ns revela um menor valor de densidade que as restantes (figura 75). Neste caso, após 20 ns de simulação, as moléculas de emulsificante começam a formar um agregado, que segue um perfil micelar, isto é, a densidade é superior no centro da micela e vai diminuindo do centro à superfície.<sup>79</sup> Este agregado mantém-se estável entre os 30 ns e 50 ns de simulação, no entanto, no final da simulação, as moléculas parecem afastar-se.



**Figura 75.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de *cluster* em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

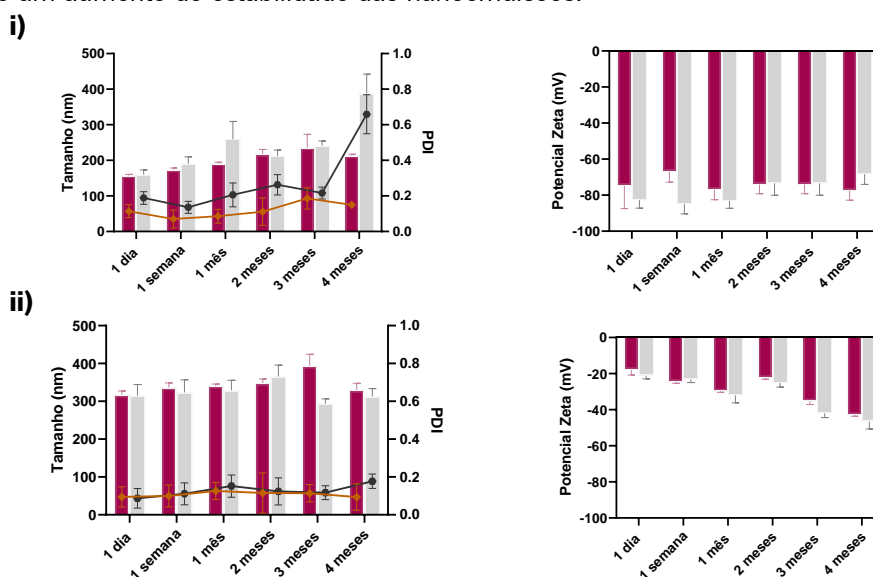
O éster **6c** é sólido à temperatura ambiente, sendo o único composto ao qual foi necessário proceder previamente à sua fusão antes do processo de emulsificação. Verificou-se, após 1 mês de formação, a precipitação do éster (figura 76), coincidindo com a instabilidade das nanoemulsões.





**Figura 76.** Aspetto das nanoemulsões O/A com o éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) precipitado ao final de um mês.

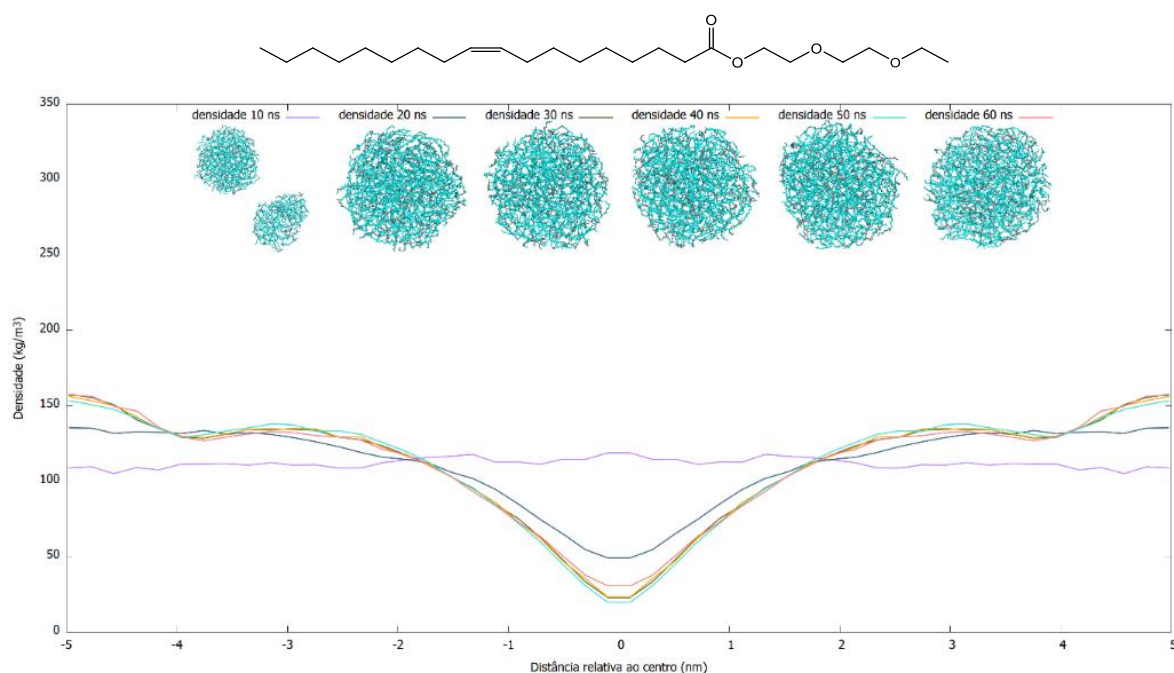
As nanoemulsões obtidas com o produto 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) (figura 77) revelaram ser as nanoemulsões mais estáveis, até um período de, pelo menos, 6 meses com ambas as fases aquosas testadas. No caso das nanopartículas com o tampão PBS, o seu tamanho varia entre 150 nm e 250 nm e com um PDI relativamente baixo ( $<0,400$ ), demonstrando elevado potencial para aplicação cosmética. O potencial zeta destas nanopartículas é bastante negativo, aproximadamente  $-70$  mV, o que se traduz numa elevada estabilidade. No caso das nanoemulsões com água, o tamanho das nanoemulsões é ligeiramente superior (aproximadamente 330 nm) e o seu índice de polidispersividade é bastante baixo (entre 0,1 e 0,2), revelando um elevado potencial para aplicação cosmética. O potencial zeta associado a estas nanopartículas vai sendo mais negativo ao longo do tempo, o que é indicativo de um aumento de estabilidade das nanoemulsões.



**Figura 77.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) com: **i)** o tampão PBS e **ii)** água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).

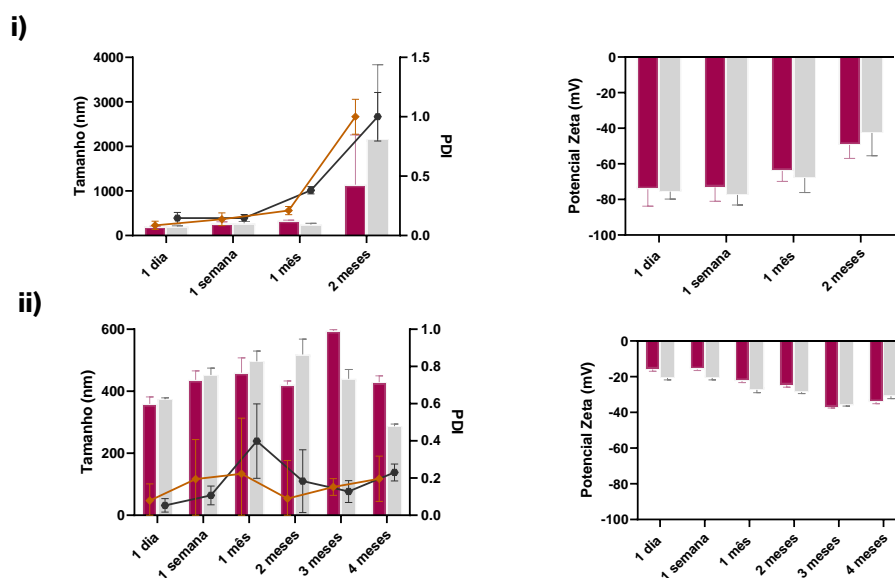
Os resultados obtidos com os dois rácios testados, 2,5% e 5% revelam que com ambas as fases aquosas utilizadas, as nanoemulsões com 2,5% de éster têm um tamanho superior do que as formuladas com 5%. Os valores obtidos de potencial zeta são semelhantes para ambos os rácios, apresentando valores negativos o suficiente para que a repulsão entre nanopartículas seja superior à atração. As nanoemulsões com o tampão PBS são menores e com um potencial zeta mais negativo. Estes resultados indicam que estas partículas são mais estáveis do que as nanoemulsões em água, uma vez que quanto mais pequenas as nanopartículas, mais tempo demoram a aproximarem-se e coalescerem.

Neste caso, o perfil da simulação obtido ao longo da simulação de dinâmica molecular é diferente dos obtidos anteriormente, sendo semelhante ao perfil de densidade de uma bicamada fosfolipídica.<sup>80,81</sup> A densidade da bicamada fosfolipídica é maior nas extremidades, locais onde se encontram as partes hidrofílicas dos emulsificantes e menor no centro, pois tem um vazio (figura 78). O sistema revela-se estável, uma vez que nas zonas de maior densidade, ou seja, nas mais distantes do centro, as curvas de densidade entre os 30 ns e 60 ns estão bastante próximas, o que é indicativo de que o agregado que se forma se mantém estável ao longo da simulação e de que o sistema se encontra em equilíbrio.



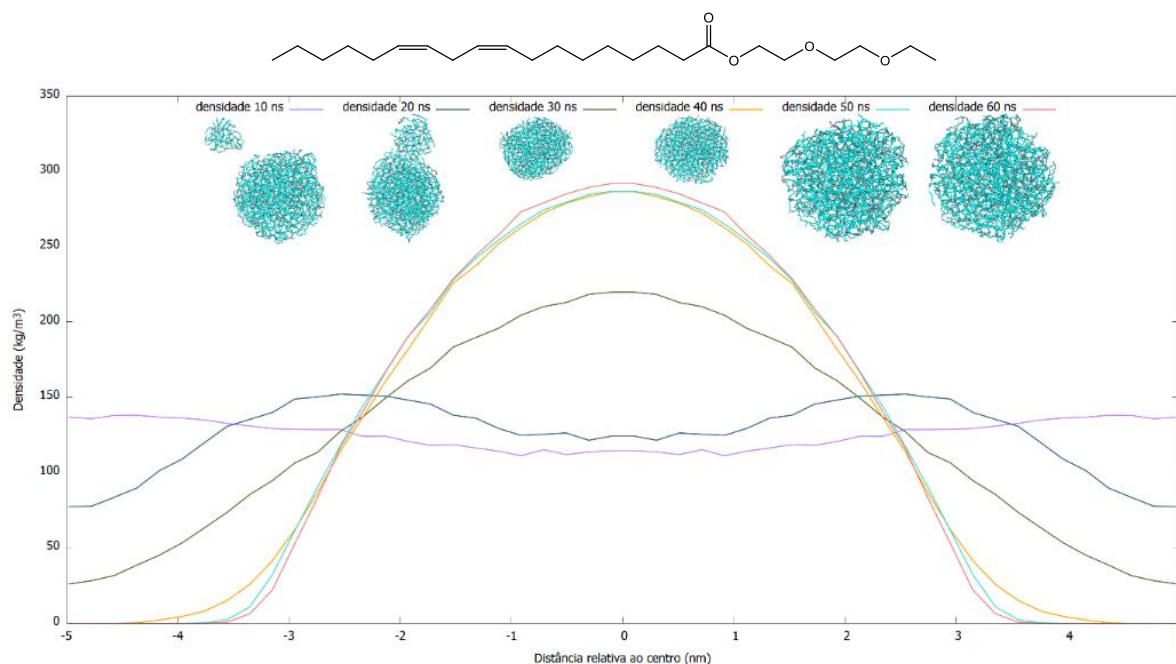
**Figura 78.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de cluster em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

Os resultados com o produto 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) revelaram que as nanoemulsões são estáveis durante mais tempo em água do que em tampão PBS (figura 79). No caso das nanoemulsões formadas com o tampão PBS, após 2 meses, o tamanho das nanopartículas é cerca de 1100 nm (5% de óleo) e 2100 nm (2,5% de óleo) e bastante polidisperso, impossibilitando a sua aplicação cosmética. O potencial zeta destas nanopartículas diminui ao longo do tempo, indicando instabilidade. No caso das nanoemulsões em água, que são estáveis até pelo menos 6 meses, o tamanho das partículas varia entre 350 nm e 500 nm, o que permite que sejam aplicadas em formulações cosméticas, sendo as nanoemulsões homogêneas, com um valor de PDI baixo (entre 0,1 e 0,2). O potencial zeta destas mantém-se relativamente estável ao longo do tempo, o que confere uma certa estabilidade à nanoemulsão. O tamanho destas nanopartículas é superior às restantes nanopartículas produzidas, possivelmente devido às insaturações no ácido linoleico, levando a um menor empacotamento das cadeias. Os resultados obtidos com os dois rácios testados, nos dois meios aquosos, revelam-se bastante semelhantes.



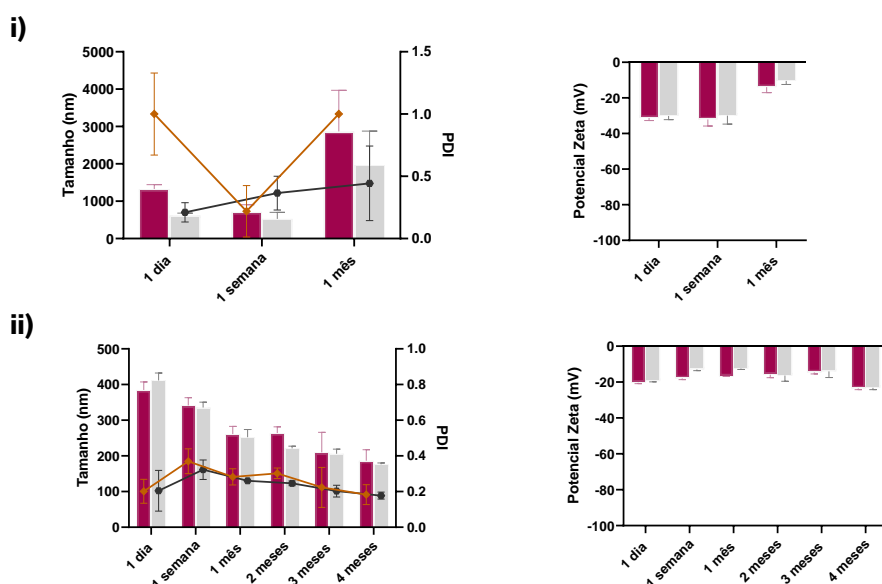
**Figura 79.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) com: **i)** o tampão PBS e **ii)** água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).

Nas simulações de dinâmica molecular, a aproximação das moléculas de emulsificante verifica-se a partir dos 30 ns e mantém-se até ao final da simulação. O perfil micelar (figura 80) de aproximação destas moléculas é facilitado pela maior hidrofobicidade do composto, o que também explica os valores elevados de densidade.<sup>79</sup> No gráfico da densidade deste agregado, a partir dos 40 ns verifica-se a aproximação das curvas de densidade, o que permite concluir que este sistema é bastante estável.



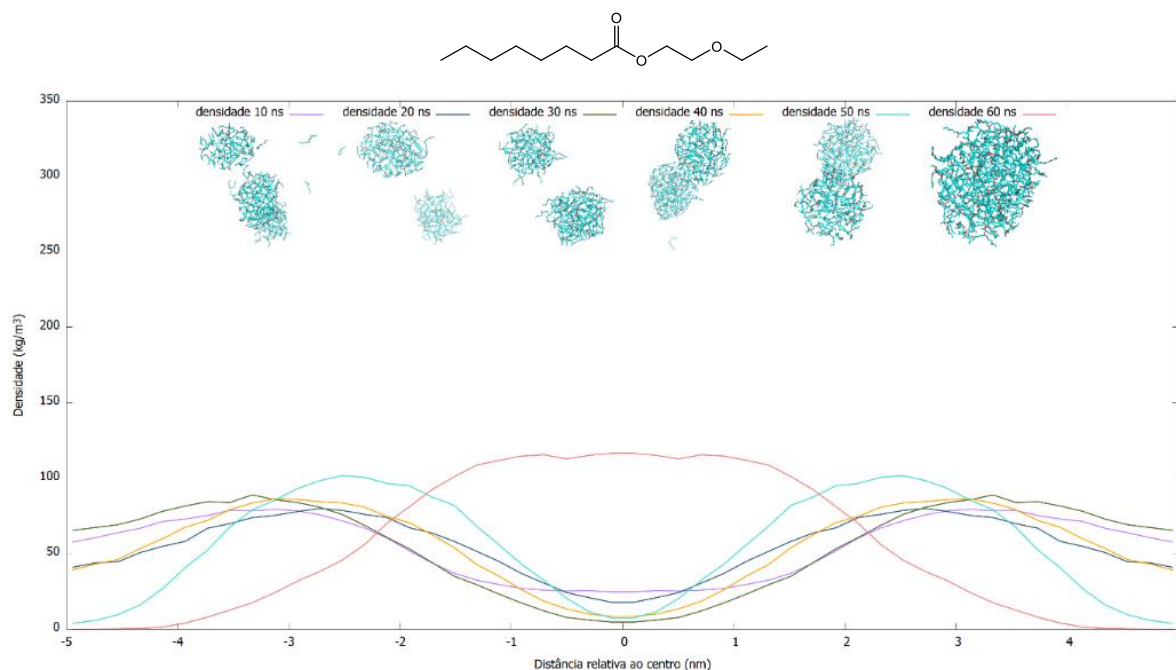
**Figura 80.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de *cluster* em intervalos de 10 nanossegundos (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

Os resultados com o produto 2-etoxietiloctanoato (**7a**) revelaram que as nanoemulsões são menos estáveis em tampão PBS do que em água (figura 81). No caso do tampão PBS, as nanoemulsões são heterogêneas, com tamanho bastante superior a 500 nm e um potencial zeta que diminui ao longo do tempo. No caso das nanoemulsões em água, o tamanho das nanopartículas varia entre 200 nm e 400 nm, sendo o tamanho bastante uniforme, o que é confirmado pelo baixo valor do índice de polidispersividade (<0,400). O potencial zeta não revela grandes variações, o que permite concluir que o sistema em água é estável. Os resultados obtidos com os dois rácios em estudo, revelam que o tamanho das nanopartículas produzidas com o menor rácio, é menor, mas o potencial dos dois rácios é semelhante.



**Figura 81.** Estabilidade das nanoemulsões O/A formadas com 2,5 % e 5% do éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**) com: **i)** o tampão PBS e **ii)** água, armazenadas a 4°C durante 1 mês e 4 meses, respetivamente. Nos gráficos relativos ao tamanho e PDI, o tamanho das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o PDI associado representado pela linha cor-de-laranja e o tamanho das nanoemulsões 2,5 % O/A é representado pela coluna cinzenta e o PDI associado representado pela linha preta. Nos gráficos relativos ao potencial zeta, o potencial das nanoemulsões 5% O/A é representado pela coluna cor-de-rosa e o potencial das nanoemulsões 2,5% O/A é representado pela coluna cinzenta (os erros associados aos valores obtidos resultam de duas medições independentes).

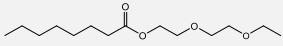
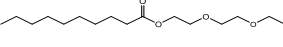
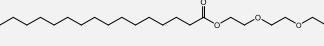
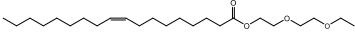
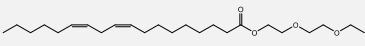
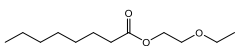
Neste caso, o potencial é menor que os restantes emulsificantes, o que revela que o sistema é menos estável. Este éster é o mais pequeno em tamanho, o que faz com que as moléculas demorem mais tempo a aproximar-se. Consequentemente, é posteriormente formado um agregado com uma distribuição uniforme e um perfil micelar, ou seja, mais compacto e uniformemente denso. No início da simulação, o perfil deste éster era semelhante ao perfil de uma bicamada fosfolipídica, o que indicava que a maior densidade estava nas zonas mais afastadas do centro.<sup>81</sup> No entanto, é possível observar, no gráfico da figura 82, que ao longo da simulação, os valores de densidade do centro vão aumentando e nos 60 ns de simulação de dinâmica molecular, ou seja, quando é formado o agregado molecular, a organização das moléculas de emulsificante adquire um perfil micelar.<sup>79</sup>



**Figura 82.** Gráfico da densidade em relação à distância relativa ao centro da agregação das moléculas do éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**) ao longo da simulação de dinâmica molecular em água e representação da análise de *cluster* em intervalos de 10 ns (Imagens obtidas com recurso ao programa *PyMol*).

Resumidamente, os resultados obtidos (tabela 7) revelam que as nanoemulsões produzidas em tampão PBS são menos estáveis do que as nanoemulsões formadas unicamente com água. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de as emulsões produzidas serem derivadas de ésteres não iónicos, não ocorrendo uma estabilização electrostática com os sais do tampão PBS. O maior tamanho dos ésteres **6d** e **6e** leva a que os agregados moleculares sejam formados mais cedo, traduzindo-se numa maior estabilidade, comparativamente aos ésteres de menor tamanho (**6b** e **7a**). Este facto é também corroborado pelos valores de potencial zeta mais negativo. A organização do agregado no éster **6d** é diferente dos restantes. O éster **6e** agrega-se do mesmo modo que os ésteres de menor tamanho, ou seja, com um perfil micelar e não como uma bicamada fosfolipídica, ao contrário do que se verifica geralmente nos ácidos gordos, devido ao seu elevado tamanho e rigidez estrutural.

**Tabela 7.** Tabela resumo com o tempo de estabilização das nanoemulsões em PBS e água, tipo de organização adquirido pelo agregado molecular em água e observações finais

	Estabilidade		Organização do agregado	Observações finais
	PBS	Água		
 <b>6a</b>	1 dia	1 semana	Micelar	Não forma emulsões estáveis (balanço hidrofóbico-hidrofílico)
 <b>6b</b>	2 meses	4 meses	Micelar	Forma emulsões estáveis em água (310 nm (2,5%); PDI: 0,30)
 <b>6c</b>	1 mês	1 mês	Micelar	Não forma emulsões estáveis (estado sólido)
 <b>6d</b>	6 meses	6 meses	Bicamada fosfolipídica	Forma emulsões estáveis em água (280 nm (2,5%); PDI: 0,17)
 <b>6e</b>	2 meses	6 meses	Micelar	Forma emulsões estáveis em água (440 nm (2,5%); PDI: 0,10)
 <b>7a</b>	2 meses	4 meses	Micelar	Forma emulsões estáveis em água (180 nm (2,5%); PDI: 0,18)

Nota: Os tamanhos e PDI indicados nas observações finais correspondem à estabilidade máxima (indicada na tabela) de cada nanoemulsão produzida.

### b) *Nanosight*

As nanoemulsões produzidas com os ésteres sintetizados (2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**), 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**), 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) e 2-etoxietiloctanoato (**7a**)) foram analisadas através da técnica de *Nanoparticle tracking analysis (NTA)*. As nanoemulsões produzidas a partir dos ésteres 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) e 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**), atendendo à sua instabilidade, não foram analisados. À semelhança do DLS esta técnica permite determinar o tamanho das emulsões, sendo, no entanto, possível a obtenção da concentração de partículas. O *Nanosight* permite a captura de um vídeo de 60 segundos, possibilitando a visualização das partículas em suspensão.

Na tabela 8 constam os valores do tamanho das nanoemulsões obtidos através de ambas as técnicas realizadas. É possível observar que os valores obtidos são semelhantes, à exceção das nanoemulsões formadas com o composto **7a**. Estas partículas demoram mais tempo a agregar-se e consequentemente a estabilizar-se, o que faz com que os dados medidos através de DLS revelem um tamanho superior, pela elevada influência de partículas com tamanhos maiores.<sup>82</sup> O armazenamento das nanoemulsões à temperatura ambiente ao longo do dia de medições é também um fator que diminui a estabilidade das partículas produzidas. A medição das nanopartículas no dia em que foram produzidas é uma possível explicação para que o tamanho das nanopartículas não seja uniforme, o que é detetado pelos valores relativamente elevados do índice de polidispersividade e pela análise através de *NTA* não revelar apenas um pico. Esta hipótese é confirmada pelo tamanho D10, D50 e D90 ser diferente na análise de *NTA* realizada, sendo que estes parâmetros indicam que 10%, 50% e 90%, respetivamente, se encontram abaixo do tamanho destes parâmetros.

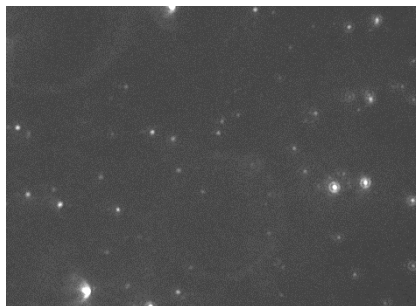
A concentração obtida com os diferentes rácios vai de encontro ao esperado, uma vez que as concentrações com 5% de éster sintetizado são superiores às concentrações com o rácio de 2,5%. No caso das nanoemulsões com 5% de óleo é possível concluir que a maior concentração corresponde ao menor éster sintetizado, ou seja, o composto **7a**, ao qual também corresponde a menor concentração com o rácio de 2,5%. Isto acontece porque o éster é de menor peso molecular, o que torna mais difícil a formação de agregados.

**Tabela 8.** Tamanho e concentração das nanopartículas que formam nanoemulsões O/A medidas através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e através de *Nanosight (NTA)*

		DLS		Nanosight
		Tamanho (nm)	Tamanho (nm)	Concentração de nanopartículas (partículas/mL)
<b>6b</b>	2,5%	368	356	69 x 10 <sup>8</sup>
	5%	373	338	104 x 10 <sup>8</sup>
<b>6d</b>	2,5%	315	293	98 x 10 <sup>8</sup>
	5%	383	315	156 x 10 <sup>8</sup>
<b>6e</b>	2,5%	370	346	51 x 10 <sup>8</sup>
	5%	554	417	149 x 10 <sup>8</sup>
<b>7a</b>	2,5%	486	354	40 x 10 <sup>8</sup>
	5%	431	320	167 x 10 <sup>8</sup>



Os resultados obtidos revelam que as partículas têm tendência a agregar-se, o que anteriormente foi confirmado através de simulação de dinâmica molecular, e funcionar como emulsificante, como ilustra a figura 83.



**Figura 83.** Imagem obtida através da técnica de *Nanosight* das nanopartículas formadas com 2,5% de éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**).

### 3.2.2 Encapsulação do corante *Nile Red*

As nanoemulsões mais estáveis em água, ou seja, as nanoemulsões formadas a partir dos ésteres 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**), 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**), 2-(2-etoxietoxi)etil(9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) e 2-etoxietiloctanoato (**7a**) foram testadas relativamente à encapsulação do corante hidrofóbico *Nile Red*. Este corante foi utilizado para testar a capacidade de encapsulação das nanoemulsões e observar a sua libertação, assim como para estudar a sua permeação utilizando um modelo de pele através de um sistema de transdermal. As propriedades fluorescentes deste corante permitem também detetar a forma das nanopartículas sintetizadas através de microscopia confocal. A escolha deste corante, deveu-se à possibilidade do *Nile Red* ser utilizado quer em leituras de fluorescência como de absorvância, demonstrando alta sensibilidade.<sup>83</sup>

O primeiro passo consistiu em determinar a concentração de corante que cada um dos ésteres sintetizados conseguia solubilizar, procedendo-se inicialmente à construção de uma curva de calibração do corante. Esta curva (2 mM - 60 mM) foi construída com base no espectro de absorvância do corante, em etanol, que revela o seu pico de absorvância máxima aos 548 nm.

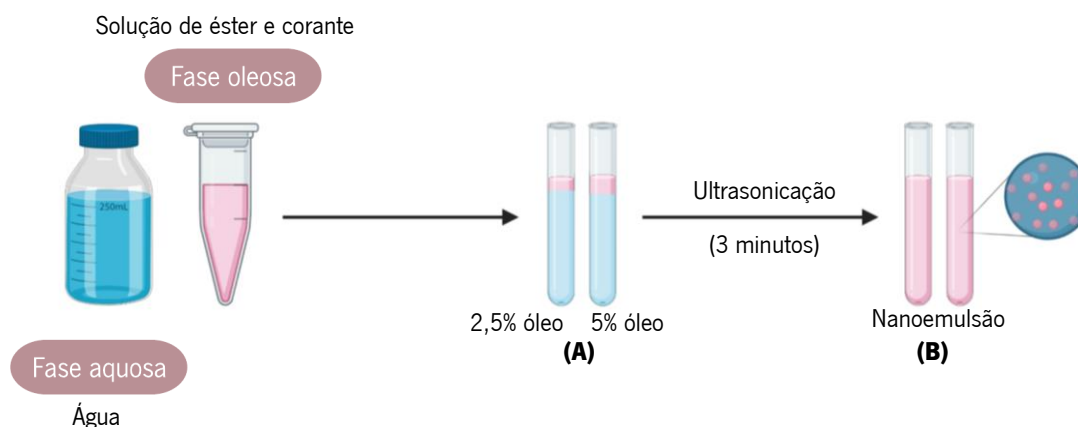
A regressão linear do corante, com equação  $Absorvância = 0,0174 \times Concentração - 0,0247$ , e um coeficiente de correlação de  $r^2=0,9963$  permite determinar a concentração de corante em cada uma das amostras, através da substituição na equação obtida. As concentrações de corante encapsulado são bastante semelhantes entre os vários ésteres, à exceção do composto **6d**, que revela um valor inferior (tabela 9). Previamente, verificamos que o éster **6d** se organizava em meio aquoso de modo diferente dos restantes, uma vez que este apresenta um perfil de bicamada fosfolipídica. Através

deste facto, é possível constatar que a hidrofobicidade, assim como a organização estrutural das moléculas, desempenham um papel crucial na capacidade de solubilização e posterior encapsulação.

**Tabela 9.** Tabela com a concentração de corante encapsulado nos ésteres sintetizados

	Absorvância	Concentração (mM)
<b>6b</b>	0,467	26,5
<b>6d</b>	0,249	15,7
<b>6e</b>	0,451	27,3
<b>7a</b>	0,467	28,3

O processo de emulsificação (figura 84) foi semelhante ao discutido anteriormente, sendo a única diferença o uso das soluções do éster com o corante solubilizado.



**Figura 84.** Representação do processo de emulsificação com o corante *Nile Red* previamente solubilizado no éster estado inicial **(A)** e no estado final **(B)** (Imagem criada em *Biorender.com*).

### a) Estudos de libertação do *Nile Red* das nanoemulsões

As nanopartículas, pelo seu pequeno tamanho e grande área superficial, revelam um aumento de solubilidade dos fármacos e conseqüente biodisponibilidade, o que faz com que estes sistemas tenham mais facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica.<sup>84</sup> Deste modo, são feitos estudos de libertação de fármacos em nanoemulsões com o objetivo de avaliar a segurança, eficácia e qualidade de sistemas de libertação de alguns compostos farmacêuticos. Numa primeira avaliação, são utilizados corantes como compostos modelo, para uma melhor visualização da libertação. Nos estudos cinéticos de libertação é possível obter informação sobre a capacidade de as nanopartículas alterarem a libertação do fármaco.<sup>85</sup>

Neste trabalho, o corante utilizado foi o *Nile Red*, um composto hidrofóbico, e realizaram-se estudos de libertação ao longo de 240 horas. O tamanho das nanopartículas também foi monitorizado (tabela 10).

**Tabela 10.** Tamanho das nanopartículas no início dos estudos de libertação do corante *Nile Red* (48 horas) e no final dos estudos (240 horas)

	48 horas		240 horas		
	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI	
<b>6b</b>	2,5 %	284,4	0,236	185	0,313
	5 %	289,9	0,418	201,3	0,332
<b>6d</b>	2,5 %	303,9	0,196	368,2	0,247
	5 %	326,6	0,136	331,0	0,325
<b>6e</b>	2,5 %	557,3	0,083	553,9	0,250
	5 %	692,3	0,244	528,1	0,265
<b>7a</b>	2,5 %	163,6	0,280	152,1	0,249
	5 %	152,1	0,249	181,5	0,227

Até às 240 horas, apenas se observaram quantidades vestigiais (cerca de 0,5%) de corante libertado por todas as nanoemulsões em estudo. Os tamanhos das nanopartículas são semelhantes ao longo do tempo, uma vez que não é libertada praticamente nenhuma percentagem de corante. Os resultados obtidos são contraditórios aos resultados esperados, uma vez que seria expectável que o corante inicialmente fosse libertado em quantidade elevada e essa quantidade estabilizasse posteriormente.

Estudos anteriores revelaram que, em emulsificantes que se organizam de acordo com perfil micelar, o corante está situado na interface da micela. Isto é, algumas moléculas de corante estão localizadas mais perto da água e outras estão mais perto das caudas hidrofóbicas dos ésteres anfífilicos.<sup>86</sup> Os resultados obtidos podem ser explicados pela hidrofobicidade do corante, uma vez que, a maior parte do corante está mais perto das caudas hidrofóbicas, pelas interações mais fortes entre estas duas moléculas, contrariamente ao que acontece com a água. Neste caso, o corante localiza-se no interior da micela formada, no caso dos ésteres **6b**, **6e** e **7a** e no interior da bicamada no caso do éster **6d**. Todos os sistemas demonstraram previamente ser bastante estáveis, o que faz com que seja difícil o corante ser libertado do agregado formado. O etanol utilizado como solvente, que confere um carácter hidrofóbico à solução utilizada como tampão, deveria interagir com o corante e fazer com que

fosse libertado. Isto não se verificou, o que pode ser indicativo da necessidade de uma solução-tampão com maior carácter hidrofóbico.

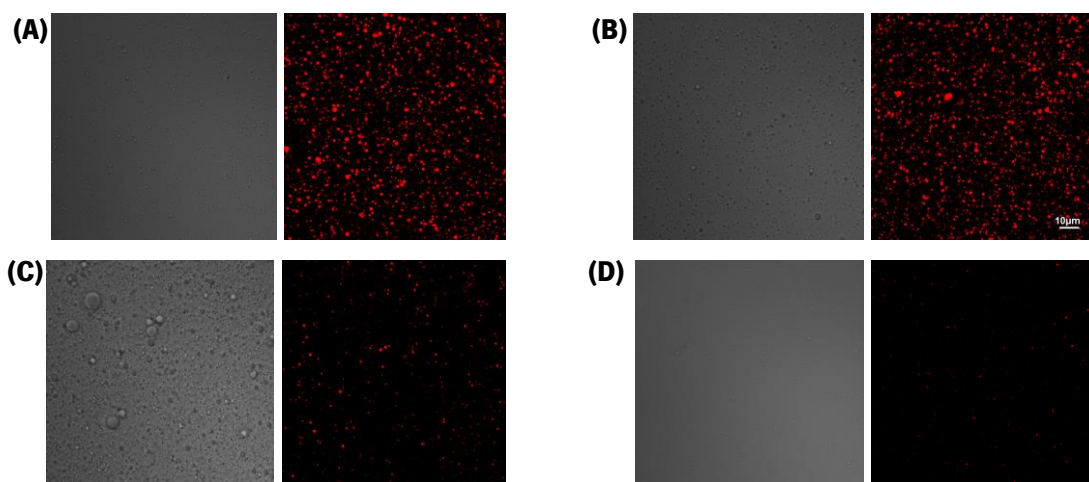
#### **b) Microscopia confocal**

O tipo de microscopia normalmente utilizado para a caracterização do tamanho e da forma de nanopartículas é a microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*) de alta resolução, pela simplicidade de obtenção e análise de resultados.<sup>87</sup> No entanto, neste caso as nanopartículas têm movimento, pelo que não é possível utilizar este tipo de microscopia para obter uma imagem 3D.

Nas técnicas de microscopia são bastante utilizados corantes, nomeadamente o *Nile Red*, com o objetivo de aumentar o contraste na imagem microscópica. As propriedades fluorescentes do corante *Nile Red* fazem com que as nanoemulsões produzidas possam ser observadas através de microscopia confocal, que utiliza ótica de fluorescência e, deste modo, observar se a encapsulação do corante nas nanopartículas foi eficiente.<sup>88</sup> No entanto, as nanopartículas com um rácio de 5% revelam excesso de fase oleosa e conseqüentemente de corante, o que faz com que não sejam utilizadas neste estudo e sejam apenas utilizadas as nanopartículas com um rácio de 2,5%.

Os resultados obtidos revelaram que o corante ficou encapsulado nas nanopartículas, uma vez que são visíveis as partículas totalmente coradas de vermelho.<sup>89</sup> Na figura 85 é possível observar que as nanopartículas sem corante, como não têm propriedades fluorescentes, não são visíveis no campo de visualização. Neste caso, é possível observar alguma polidispersividade no tamanho das partículas, sendo a grande maioria das partículas de forma esférica. Algumas partículas podem parecer ligeiramente esticadas na imagem obtida, o que pode ser explicado pelo movimento das mesmas na solução.

Através da figura 85, é possível observar que o tamanho das partículas é diferente consoante o éster sintetizado. As imagens obtidas revelam que as nanopartículas dos compostos **6b** e **6d** têm tamanho semelhante, enquanto as nanopartículas com o composto **7a** são bastante menores, o que pode ser explicado pelo facto de este composto ser de tamanho inferior relativamente aos restantes. As nanopartículas formadas a partir do composto **6e** revelam um tamanho superior, como ilustrado na referência na figura 85-C, o que pode ser explicado pelo tamanho superior deste éster. Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos pela técnica de DLS.

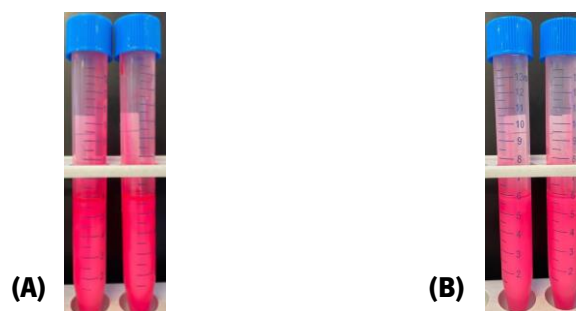


**Figura 85.** Imagem microscópica das nanopartículas sem corante (à esquerda) e com corante (à direita) dos ésteres **6b** (A), **6d** (B), **6e** (C) e **7a** (D) com uma ampliação 100x (cor vermelha corresponde às partículas encapsuladas com corante).

### c) Permeação do corante em modelo de pele através de um sistema de transdermal

As células de difusão de *Franz* são uns dos dispositivos mais utilizados para avaliar a libertação transdérmica de fármacos, sendo normalmente utilizadas membranas sintéticas porosas, como membranas de acetato de celulose.<sup>90</sup> Neste caso, foi avaliada a capacidade de permeação das nanoemulsões encapsuladas com *Nile Red*.

No sistema transdérmico utilizado foram testadas duas membranas, uma membrana de fibrina e outra membrana de acetato de celulose. O sistema foi colocado a uma temperatura de 37°C, induzindo na membrana em teste uma temperatura próxima à temperatura da superfície da pele (32°C). Nestes estudos apenas foram utilizadas as nanoemulsões com um rácio de 2,5%, atendendo à observação de duas fases imiscíveis quando utilizados 5% de éster, como demonstrado na figura 86.



**Figura 86.** Aspeto das nanoemulsões obtidas quando produzidas com o corante *Nile Red* com um rácio de 5% (A) e 2,5% (B).

Os resultados obtidos revelam que não foi libertado corante através de nenhuma das membranas em estudo, ao longo de 24 horas.

A membrana de fibrina é uma membrana hidrofóbica, o que torna expectável que o corante não seja libertado, mas que fique retido na mesma. A encapsulação do corante na zona mais interior das nanoemulsões, pode também justificar a baixa capacidade de libertação do mesmo.<sup>91</sup> Esta membrana é bastante semelhante à pele de porco, que normalmente é utilizada nestes ensaios pela sua semelhança com a pele humana.<sup>92</sup>

Deste modo, foi utilizada uma membrana de acetato de celulose, que é mais hidrofílica, com o objetivo de facilitar a passagem do corante encapsulado.<sup>93</sup> Todavia, os mesmos resultados foram obtidos. Neste caso a membrana hidrofílica está em contacto com a parte exterior do agregado, de carácter semelhante. É possível constatar que a interação do corante com as caudas hidrofóbicas dos ésteres é extremamente forte, demonstrando ser inviável a sua libertação.

A medição do tamanho das partículas permitiu suportar os resultados obtidos, uma vez que este é semelhante no início e no final dos ensaios realizados (tabela 11), relevando a manutenção estrutural das nanoemulsões. Os resultados apresentados na tabela 11 corroboram a informação obtida na microscopia confocal relativa à polidispersividade das partículas com corante.

**Tabela 11.** Tabela com o tamanho das nanopartículas libertadas ao longo do tempo do ensaio de transdermal

	1 hora		24 horas		
	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI	
Membrana de fibrina	6b	297,6	0,586	367,0	0,580
	6d	226,0	0,083	217,2	0,255
	6e	456,1	0,533	493,1	0,530
	7a	210,8	0,311	200,5	0,247
Membrana de acetato	6b	209,6	0,534	179,8	0,360
	6d	172,0	0,060	181,8	0,381
	6e	266,4	0,302	293,4	0,295
	7a	225,7	0,395	215,3	0,396

---

## Considerações finais e perspectivas futuras

O objetivo visado nesta dissertação, a biossíntese de compostos com propriedades emulsificantes para futura aplicação cosmética, foi atingido. Para tal, foram exploradas quatro lipases, nomeadamente, as lipases nativa e modificada da *Aspergillus oryzae* e as lipases nativas da *Candida rugosa* e da *porcine pancreas*.

As reações de esterificação, com solvente, catalisadas pela lipase nativa da *Aspergillus oryzae* obtiveram, de modo geral, um menor rendimento do que as mesmas reações catalisadas pela lipase modificada da *Aspergillus oryzae*. As reações catalisadas pela lipase modificada permitiram a síntese bem sucedida de seis agentes emulsificantes O/A não iónicos: o éster 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato (**6a**) (72%), o éster 2-(2-etoxietoxi)etildecanoato (**6b**) (68%), o éster 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato (**6c**) (68%), o éster 2-(2-etoxietoxi)etiloleato (**6d**) (68%), o éster 2-(2-etoxietoxi)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato (**6e**) (75%) e o éster 2-etoxietiloctanoato (**7a**) (72%). Estes resultados foram justificados através de estudos de *docking* molecular, pela energia de ligação mais negativa e interações mais fortes entre aminoácidos do éster sintetizado e o centro ativo polar da lipase modificada.

As reações de esterificação com o transcitol e o 2-etoxietanol, com solvente, foram também estudadas com a lipase nativa da *Candida rugosa* e a lipase nativa da *porcine pancreas*, de modo a avaliar a sua capacidade catalítica. Os resultados obtidos com estas lipases revelam que estas não possuem nenhuma atividade de esterificação, uma vez que nenhum dos compostos pretendidos foi sintetizado. Estes resultados podem ser justificados pelo espaço livre para comportar novos ligandos estar situado acima do centro ativo da enzima, o que dificulta a interação entre os reagentes e a lipase e consequentemente a reação de esterificação.

Uma abordagem sintética mais amigável ao ambiente foi posteriormente estudada com a lipase modificada da *Aspergillus oryzae*, removendo o solvente do meio reacional. Neste caso, apenas os produtos **6d** e **6e** foram sintetizados, com uma percentagem de conversão de 74% e 50%, respetivamente. Estas reações apenas funcionam com o ácido oleico e com o ácido linoleico, visto que são os ácidos gordos de maior cadeia carbonada, incrementando a ativação interfacial da enzima.

As propriedades emulsificantes destes ésteres foram testadas através da formação de nanoemulsões O/A em tampão PBS e água e posterior avaliação da sua estabilidade através da técnica de DLS e de *Nanosight*. Os resultados obtidos através da técnica de DLS revelaram que as emulsões em água são mais estáveis que em PBS, uma vez que os emulsificantes não têm carga. As nanoemulsões formadas a partir do éster **6a** não são estáveis, uma vez que o composto tem uma maior componente hidrofílica do que hidrofóbica. O mesmo se verificou para o éster **6c**, devido ao seu



estado sólido à temperatura ambiente. As nanoemulsões em água formadas a partir dos restantes ésteres (**6b**, **6d**, **6e** e **7a**) revelaram-se estáveis durante, pelo menos, 4 meses, o que foi justificado com base em simulações de dinâmica molecular (60ns), através da aproximação das curvas de densidade ao longo da simulação. Foi possível concluir que o agregado formado pelo éster **6d** tem um perfil de bicamada fosfolipídica, sendo que os restantes agregados apresentam um perfil micelar. Posteriormente, um corante hidrofóbico, o *Nile Red*, foi utilizado como corante modelo para as quatro nanoemulsões mais estáveis (**6b**, **6d**, **6e** e **7a**), devido à sua hidrofobicidade e propriedades fluorescentes. O corante foi encapsulado nas nanoemulsões, o que foi confirmado através de microscopia confocal. No entanto, não foi observada a sua libertação das nanoemulsões, nem em estudos de permeação utilizando um modelo de pele através de um sistema de transdermal. Estes resultados sugerem que o corante ficou encapsulado dentro do agregado formado, juntamente à parte mais hidrofóbica da nanoemulsão.

As perspectivas futuras desta dissertação são baseadas na aplicação cosmética dos agentes emulsificantes O/A não iónicos produzidos. Uma das aplicações possíveis destes agentes seria num creme hidratante, com o objetivo de formar uma emulsão estável entre a fase aquosa e oleosa. Outra aplicação possível seria num produto capilar com função reparadora. Neste caso, o emulsificante seria aplicado para estabilizar a emulsão O/A e ver se o produto mantinha o efeito reparador. Este produto seria aplicado num fio de cabelo danificado, bem como o produto comercial, que serviria de controlo, e o fio de cabelo seria observado por microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*) de alta resolução, com o objetivo de observar o processo de reparação do fio capilar. As formulações produzidas seriam caracterizadas através de testes organoléticos, análise de textura e outras técnicas relevantes. Estas formulações poderiam ser uma alternativa às formulações comerciais e seriam mais adequadas para satisfazer as necessidades atuais do mercado cosmético, uma vez que se baseiam numa síntese mais verde.

---

## Referências bibliográficas

1. Saad MA, Kamil M, Abdurahman NH, Yunus RM, Awad OI. An Overview of Recent Advances in State-of-the-Art Techniques in the Demulsification of Crude Oil Emulsions. *Processes*. 2019;7(7):470. doi:10.3390/pr7070470
2. Sikora E. *Cosmetic Emulsions*. Kraków: Politechnika Krakowska; 2019.
3. Gurpreet K, Singh SK. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian J Pharm Sci*. 2018;80(5):781-789. doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422
4. Akbari S, Nour AH. Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *Int J Innov Res Sci Stud*. 2018;1(1):11-17. doi:10.53894/ijirss.v1i1.4
5. Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice J, Benson H, Roberts M. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics*. 2017;9(4):37. doi:10.3390/pharmaceutics9040037
6. Nanda A, Nanda S, Nguyen T, Rajendran S, Slimani Y, eds. *Nanocosmetics*. Elsevier; 2020. doi:10.1016/C2019-0-00468-2
7. Gupta V, Mohapatra S, Mishra H, Farooq U, Kumar K, Iqbal Z. Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals – A Review. *Gels*. 2022;8(153):1-31. doi:10.3390/gels8030173
8. Souto EB, Fernandes AR, Martins-Gomes C, et al. Nanomaterials for skin delivery of cosmeceuticals and pharmaceuticals. *Appl Sci*. 2020;10(5):1-24. doi:10.3390/app10051594
9. Montenegro L, Lai F, Offerta A, et al. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2016;32:100-112. doi:10.1016/j.jddst.2015.10.003
10. Zoabi A, Touitou E, Margulis K. Recent Advances in Nanomaterials for Dermal and Transdermal Applications. *Colloids and Interfaces*. 2021;5(1):18. doi:10.3390/colloids5010018
11. Souto EB, Cano A, Martins-gomes C, Coutinho TE. Microemulsions and Nanoemulsions in Skin Drug Delivery. *Bioengineering*. 2022;9(158):1-22. doi:10.3390/bioengineering9040158
12. Aziz ZAA, Mohd-Nasir H, Ahmad A, et al. Role of Nanotechnology for Design and Development of Cosmeceutical: Application in Makeup and Skin Care. *Front Chem*. 2019;7(November):1-15. doi:10.3389/fchem.2019.00739
13. Yukuyama MN, Ghisleni DDM, Pinto TJA, Bou-Chacra NA. Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics - A review. *Int J Cosmet Sci*. 2016;38(1):13-24. doi:10.1111/ics.12260
14. Dănilă E, Moldovan Z, Albu Kaya MG, Ghica MV. Formulation and characterization of some oil in water cosmetic emulsions based on collagen hydrolysate and vegetable oils mixtures. *Pure Appl Chem*. 2019;91(9):1493-1507. doi:10.1515/pac-2018-0911
15. Erythropel HC, Zimmerman JB, De Winter TM, et al. The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chem*. 2018;20(9):1929-1961. doi:10.1039/c8gc00482j
16. Bom S, Fitas M, Martins AM, Pinto P, Ribeiro HM, Marto J. Replacing Synthetic Ingredients by Sustainable Natural Alternatives: A Case Study Using Topical O/W Emulsions. *Molecules*. 2020;25(21):1-18. doi:10.3390/molecules25214887
17. Semenzato A, Costantini A, Meloni M, Maramaldi G, Meneghin M, Baratto G. Formulating O/W

- Emulsions with Plant-Based Actives: A Stability Challenge for an Effective Product. *Cosmetics*. 2018;5(4):59. doi:10.3390/cosmetics5040059
18. Guerrero-Hernández L, Meléndez-Ortiz HI, Cortez-Mazatan GY, Vaillant-Sánchez S, Peralta-Rodríguez RD. Gemini and Bicephalous Surfactants: A Review on Their Synthesis, Micelle Formation, and Uses. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1-25. doi:10.3390/ijms23031798
  19. Somasundaran P, Mehta SC, Purohit P. Silicone emulsions. *Adv Colloid Interface Sci*. 2007;128-130:103-109. doi:10.1016/j.cis.2006.11.023
  20. O'Lenick AJ. *Silicones for Personal Care*. 2nd Editio. (Kozlowski AC, ed.). Allured Publishing Corporation; 2008.
  21. Li Y, Zhou J, Zhang Y, et al. Synthesis and Properties of Primary Alcohol Ethoxylates Using Different Catalytic Systems. *ACS Omega*. 2021;6(44):29774-29780. doi:10.1021/acsomega.1c04232
  22. Lukosek M, Emmons-Burzyńska M, Alejski K, Szwach I. Physicochemical Characterization of Ethoxylation Products of Fatty Acid Esters. *Front Chem Eng*. 2021;3(648):1-12. doi:10.3389/fceng.2021.617701
  23. Shahinuzzaman M, Yaakob Z, Moniruzzaman M. Medicinal and cosmetics soap production from *Jatropha* oil. *J Cosmet Dermatol*. 2016;15(2):185-193. doi:10.1111/jocd.12209
  24. Okeke UC, Snyder CR. Polymerizable Multifunctional Quaternary Ammonium Compounds. *Molecules*. 2019;24(1464):1-11. doi:10.3390/molecules24081464
  25. Hue BTB, Hong LTP, Phuoc NTN, et al. Monoglyceride and monoglyceride derivatives from glycerol generated in catfish based biodiesel production process. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. 2019;620(1). doi:10.1088/1757-899X/620/1/012012
  26. Alhadj MJ, Montero N, Yarce CJ, Salamanca CH. Lecithins from Vegetable, Land, and Marine Animal Sources and Their Potential Applications for Cosmetic, Food, and Pharmaceutical Sectors. *Cosmetics*. 2020;7(87):1-19. doi:10.3390/cosmetics7040087
  27. Burnett CL, Bergfeld WF, Belsito D V., et al. Safety Assessment of Alkyl Betaines as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*. 2018;37(1\_suppl):28S-46S. doi:10.1177/1091581818773354
  28. Kelleppan VT, King JP, Butler CSG, Williams AP, Tuck KL, Tabor RF. Heads or tails? The synthesis, self-assembly, properties and uses of betaine and betaine-like surfactants. *Adv Colloid Interface Sci*. 2021;297(September):102528. doi:10.1016/j.cis.2021.102528
  29. O'Lenick J. Silicone emulsions and surfactants. *J Surfactants Deterg*. 2000;3(3):387-393. doi:10.1007/s11743-000-0143-y
  30. Zoller U, Sosis P, eds. Handbook of Detergents - Part F: Production. In: *Handbook of Detergents*. 1st Editio. CRC Press; 2008:35.
  31. Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*. 2012;485(7397):185-194. doi:10.1038/nature11117
  32. Lei J, Qi L, Luo Z. Pickering Emulsion-Based Microreactors for Size-Selective Interfacial Enzymatic Catalysis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(August):1-9. doi:10.3389/fbioe.2020.00950

33. Gamayurova VS, Zinov'eva ME, Shnaider KL, Davletshina GA. Lipases in Esterification Reactions: A Review. *Catal Ind.* 2021;13(1):58-72. doi:10.1134/S2070050421010025
34. Khan NR, Rathod VK. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.* 2015;50(11):1793-1806. doi:10.1016/j.procbio.2015.07.014
35. Vilas Bôas RN, de Castro HF. A review of synthesis of esters with aromatic, emulsifying, and lubricant properties by biotransformation using lipases. *Biotechnol Bioeng.* 2022;119(3):725-742. doi:10.1002/bit.28024
36. Ferreira Gonçalves GR, Ramos Gandolfi OR, Brito MJP, Bonomo RCF, da Costa Ilhéu Fontan R, Veloso CM. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. *Process Biochem.* 2021;111(October):114-123. doi:10.1016/j.procbio.2021.10.027
37. Bezborodov AM, Zagustina NA. Lipases in catalytic reactions of organic chemistry. *Appl Biochem Microbiol.* 2014;50(4):313-337. doi:10.1134/S0003683814040024
38. Castillo E, Casas-Godoy L, Sandoval G. Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. *Biocatalysis.* 2016;1(1). doi:10.1515/boca-2015-0013
39. Mendes AA, Oliveira PC, De Castro HF. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *J Mol Catal B Enzym.* 2012;78:119-134. doi:10.1016/j.molcatb.2012.03.004
40. Chen ZS, Wu Y Da, Hao JH, et al. Molecular Dynamic Simulation of the Porcine Pancreatic Lipase in Non-aqueous Organic Solvents. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(July). doi:10.3389/fbioe.2020.00676
41. Subroto E, Indiarito R, Pangawikan AD, Huda S, Yarlina VP. Characteristics, immobilization, and application of *Candida rugosa* lipase: A review. *Food Res.* 2020;4(5):1391-1401. doi:10.26656/fr.2017.4(5).060
42. Vanleeuw E, Winderickx S, Thevissen K, et al. Substrate-Specificity of *Candida rugosa* Lipase and Its Industrial Application. *ACS Sustain Chem Eng.* 2019;7(19):15828-15844. doi:10.1021/acssuschemeng.9b03257
43. Yan H De, Guo BH, Wang Z, Qian JQ. Surfactant-modified *Aspergillus oryzae* lipase as a highly active and enantioselective catalyst for the kinetic resolution of (RS)-1-phenylethanol. *J Biotech.* 2019;9(7):1-9. doi:10.1007/s13205-019-1796-3
44. Noro J, Castro TG, Cavaco-Paulo A, Silva C. Substrate hydrophobicity and enzyme modifiers play a major role in the activity of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Catal Sci Technol.* 2020;10(17):5913-5924. doi:10.1039/D0CY00912A
45. Noro J, Cavaco-Paulo A, Silva C. Chemically Modified Lipase from *Thermomyces lanuginosus* with Enhanced Esterification and Transesterification Activities. *ChemCatChem.* 2021;13(21):4524-4531. doi:10.1002/cctc.202101050
46. Freitas DS, Rocha D, Castro TG, et al. Green Extraction of Cork Bioactive Compounds Using Natural Deep Eutectic Mixtures. *ACS Sustain Chem Eng.* 2022;10(24):7974-7989. doi:10.1021/acssuschemeng.2c01422
47. Noro J, Loureiro A, Gonçalves F, et al. Oil-based cyclo-oligosaccharide nanodevices for drug

- encapsulation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;159:259-267. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.055
48. Tomberg A. GAUSSIAN 09W TUTORIAL (An introduction to computational chemistry using G09W and Avogadro software). 2013. doi:10.5281/zenodo.6637572
49. Baseden KA, Tye JW. Introduction to density functional theory: Calculations by hand on the helium atom. *J Chem Educ*. 2014;91(12):2116-2123. doi:10.1021/ed5004788
50. Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Performance of B3LYP density functional methods for a large set of organic molecules. *J Chem Theory Comput*. 2008;4(2):297-306. doi:10.1021/ct700248k
51. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785-2791. doi:10.1002/jcc.21256
52. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*. 1998;19(14):1639-1662. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B
53. Swain C. Open Babel Documentation. 2014.
54. LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:PyMOL+User's+Guide#2>.
55. Malde AK, Zuo L, Breeze M, et al. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. *J Chem Theory Comput*. 2011;7(12):4026-4037. doi:10.1021/ct200196m
56. Stroet M, Caron B, Visscher KM, Geerke DP, Malde AK, Mark AE. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. *J Chem Theory Comput*. 2018;14(11):5834-5845. doi:10.1021/acs.jctc.8b00768
57. Abraham M, Hess B, Van Der Spoel D, Lindahl E. *Gromacs - Groningen Machine for Chemical Simulations (Reference Manual - Version 5.1.4)*; 2017.
58. Schmid N, Eichenberger AP, Choutko A, et al. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J*. 2011;40(7):843-856. doi:10.1007/s00249-011-0700-9
59. Castro TG, Munteanu FD, Cavaco-Paulo A. Electrostatics of tau protein by molecular dynamics. *Biomolecules*. 2019;9(3). doi:10.3390/biom9030116
60. Rusli S, Grabowski J, Drews A, Kraume M. A multi-scale approach to modeling the interfacial reaction kinetics of lipases with emphasis on enzyme adsorption at water-oil interfaces. *Processes*. 2020;8(9). doi:10.3390/pr8091082
61. Noro J, Cavaco-Paulo A, Silva C. Chemical modification of lipases: A powerful tool for activity improvement. *Biotechnol J*. 2022;17(8):2100523. doi:10.1002/biot.202100523
62. Leth PM, Gregersen M. Ethylene glycol poisoning. *Forensic Sci Int*. 2005;155(2-3):179-184. doi:10.1016/j.forsciint.2004.11.012
63. Mates A. Inhibition of staphylococcus aureus lipase activity by alcohol. *Lipids*. 1973;8(10):549-552. doi:10.1007/BF02532710

64. Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z, Wang Y. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5(MAR):1-13. doi:10.3389/fbioe.2017.00016
65. Lukić M, Pantelić I, Savić SD. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics.* 2021;8(3):69. doi:10.3390/cosmetics8030069
66. Douguet M, Picard C, Savary G, Merlaud F, Loubat-bouleuc N, Grisel M. Spreading properties of cosmetic emollients: Use of synthetic skin surface to elucidate structural effect. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2017;154:307-314. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.028
67. Alizadeh Osgouei H, Parsafar GA, Akbarzadeh H. Density and temperature dependencies of liquid surface tension. *Iran J Chem Chem Eng.* 2011;30(2):79-90.
68. Mallick D, Poddar MK, Mahanta P, Moholkar VS. Discernment of synergism in pyrolysis of biomass blends using thermogravimetric analysis. *Bioresour Technol.* 2018;261(March):294-305. doi:10.1016/j.biortech.2018.04.011
69. Dini I, Laneri S. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules.* 2021;26(13):3921. doi:10.3390/molecules26133921
70. Bom S, Jorge J, Ribeiro HM, Marto J. A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *J Clean Prod.* 2019;225:270-290. doi:10.1016/j.jclepro.2019.03.255
71. Ševčíková P, Kašpárková V, Vltavská P, Krejčí J. On the preparation and characterization of nanoemulsions produced by phase inversion emulsification. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2012;410:130-135. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.06.031
72. Lago AMT, Neves ICO, Oliveira NL, Botrel DA, Minim LA, de Resende JV. Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. *Ultrason Sonochem.* 2019;50(July 2018):339-353. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.09.036
73. Jadhav RP, Koli VW, Kamble AB, Bhutkar MA. A Review on Nanoemulsion. *Asian J Res Pharm Sci.* 2020;10(2):103. doi:10.5958/2231-5659.2020.00020.x
74. Fang M. Application of molecular dynamics simulation in self-assembly. *J Phys Conf Ser.* 2021;2108(1). doi:10.1088/1742-6596/2108/1/012085
75. Mahfud R, Lacks D, Ishida H, Qutubuddin S. Molecular dynamic simulations of self-assembly of amphiphilic comb-like anionic polybenzoxazines. *Langmuir.* 2014;30(40):11858-11865. doi:10.1021/la501466z
76. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):1-17. doi:10.3390/pharmaceutics10020057
77. De Azevedo Ribeiro RC, Barreto SMAG, Ostrosky EA, Da Rocha-Filho PA, Verissimo LM, Ferrari M. Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extract as moisturizing agent. *Molecules.* 2015;20(2):2492-2509. doi:10.3390/molecules20022492
78. Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Golniya Z, Daniels AU. Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. *Ceram Int.* 2011;37(7):2311-2316.

- doi:10.1016/j.ceramint.2011.03.026
79. Müller P, Bonthuis DJ, Miller R, Schneck E. Ionic Surfactants at Air/Water and Oil/Water Interfaces: A Comparison Based on Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*. 2021;125(1):406-415. doi:10.1021/acs.jpcc.0c08615
  80. Benz RW, Castro-Román F, Tobias DJ, White SH. Experimental validation of molecular dynamics simulations of lipid bilayers: A new approach. *Biophys J*. 2005;88(2):805-817. doi:10.1529/biophysj.104.046821
  81. Moradi S, Nowroozi A, Shahlaei M. Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study. *RSC Adv*. 2019;9(8):4644-4658. doi:10.1039/C8RA08441F
  82. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*. 2010;27(5):796-810. doi:10.1007/s11095-010-0073-2
  83. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*. 1985;100(3):965-973. doi:10.1083/jcb.100.3.965
  84. Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J*. 2018;26(1):64-70. doi:10.1016/j.jsps.2017.10.012
  85. Weng J, Tong HHY, Chow SF. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: Development and validation of a novel method. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):1-18. doi:10.3390/pharmaceutics12080732
  86. Stuart MCA, Van De Pas JC, Engberts JBFN. The use of Nile Red to monitor the aggregation behavior in ternary surfactant-water-organic solvent systems. *J Phys Org Chem*. 2005;18(9):929-934. doi:10.1002/poc.919
  87. Vladár AE, Hodoroba V-D. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. In: *Characterization of Nanoparticles*. Elsevier; 2020:7-27. doi:10.1016/B978-0-12-814182-3.00002-X
  88. Elgegren M, Kim S, Cordova D, et al. Ultrasound-Assisted Encapsulation of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo.) Oil in Alginate-Chitosan Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2019;11(8):1245. doi:10.3390/polym11081245
  89. Mei L, Ji Q, Jin Z, et al. Nano-microencapsulation of tea seed oil via modified complex coacervation with propolis and phosphatidylcholine for improving antioxidant activity. *Lwt*. 2022;163(March):113550. doi:10.1016/j.lwt.2022.113550
  90. Ng SF, Rouse J, Sanderson D, Eccleston G. A Comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using franz diffusion cells. *Pharmaceutics*. 2010;2(2):209-223. doi:10.3390/pharmaceutics2020209
  91. van Oss CJ. Surface properties of fibrinogen and fibrin. *J Protein Chem*. 1990;9(4):487-491. doi:10.1007/BF01024625
  92. Abd E, Yousuf S, Pastore M, et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin Pharmacol Adv Appl*. 2016;Volume 8:163-176. doi:10.2147/CPAA.S64788
  93. Shen S su, Chen H, Wang R hua, Ji W, Zhang Y, Bai R. Preparation of antifouling cellulose



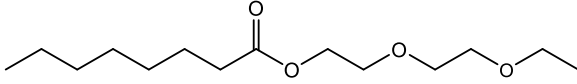
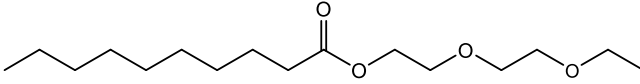
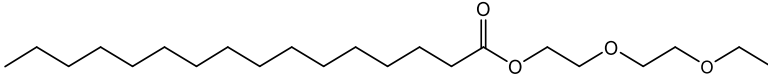
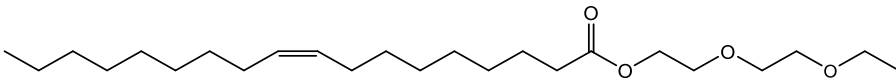
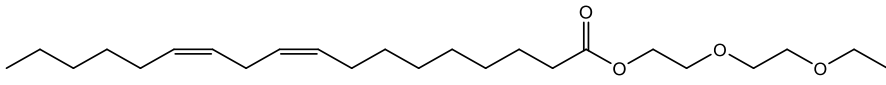
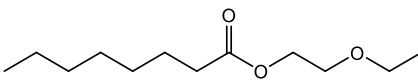
acetate membranes with good hydrophilic and oleophobic surface properties. *Mater Lett.* 2019;252:1-4. doi:10.1016/j.matlet.2019.03.089

---

## Anexos

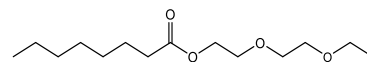
## Apêndice A

## Tabela de novos compostos sintetizados

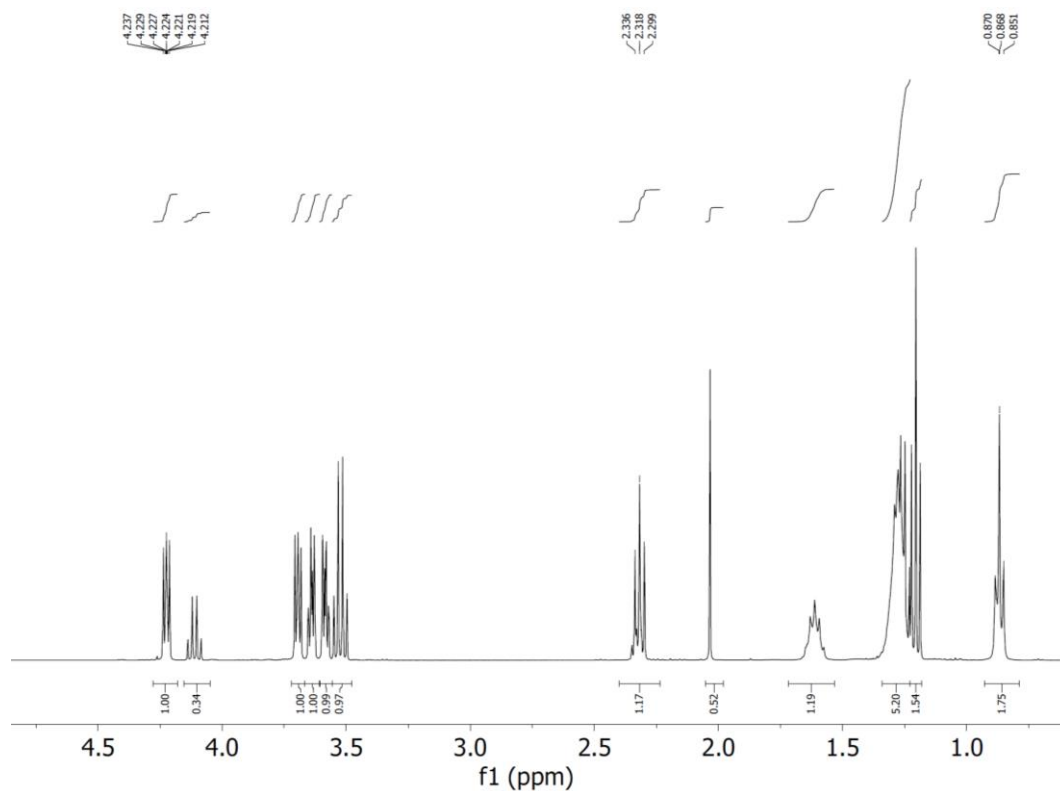
Número do composto	Estrutura (nome)
6a	 <p>2-(2-ethoxyethoxy)etiloctanoato</p>
6b	 <p>2-(2-ethoxyethoxy)etildecanoato</p>
6c	 <p>2-(2-ethoxyethoxy)etilpalmitato</p>
6d	 <p>2-(2-ethoxyethoxy)etiloleato</p>
6e	 <p>2-(2-ethoxyethoxy)etil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato</p>
7a	 <p>2-etoxietiloctanoato</p>

**Apêndice B**

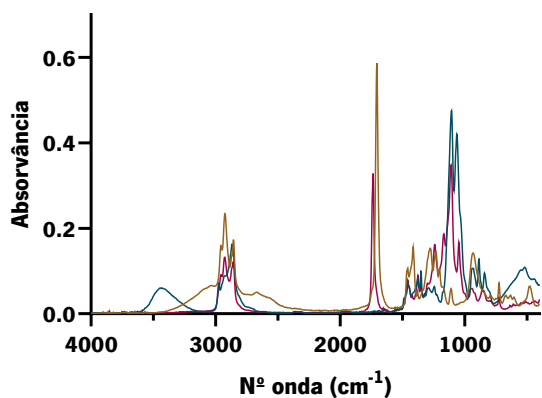
**Caracterização do composto 6a**



<sup>1</sup>H RMN

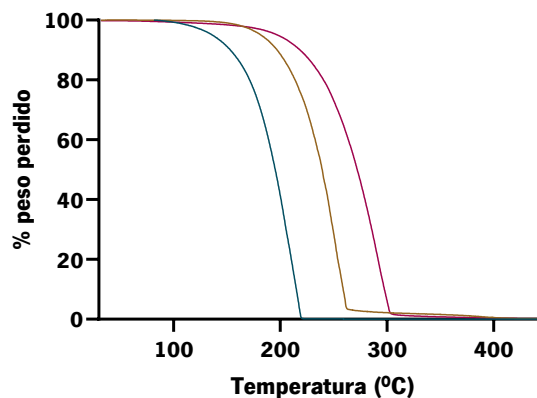


FTIR



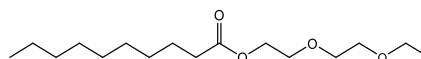
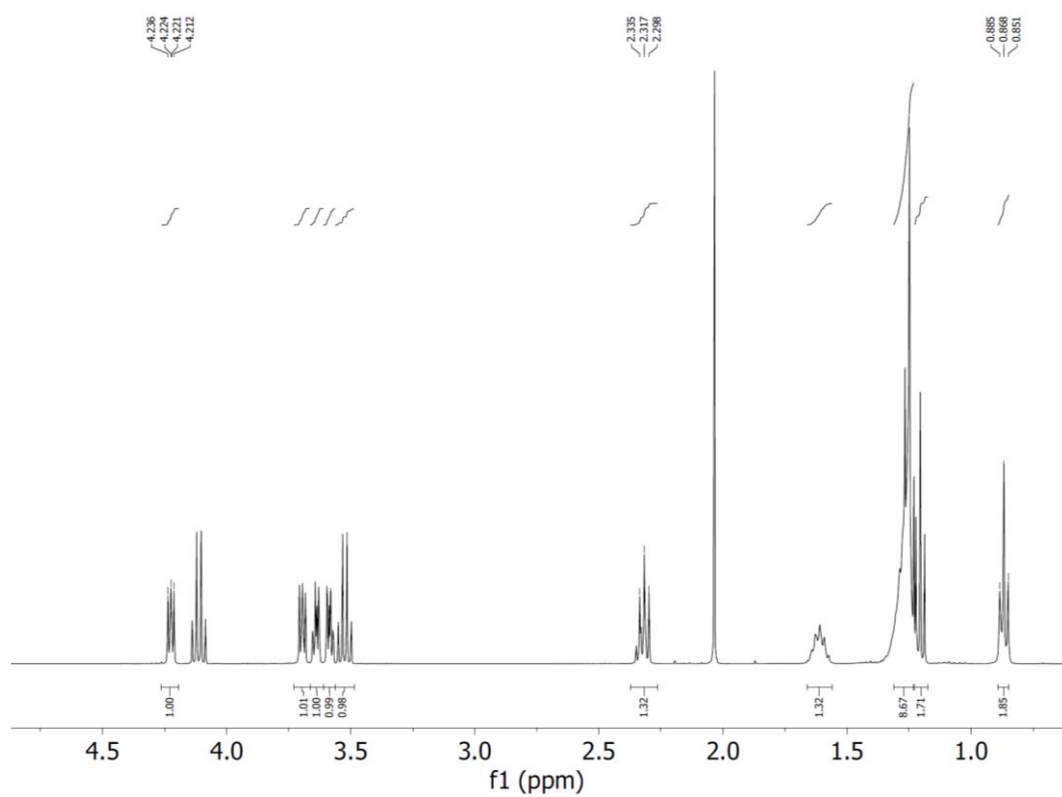
— Ácido octanóico — Transcutol  
— 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato

TGA

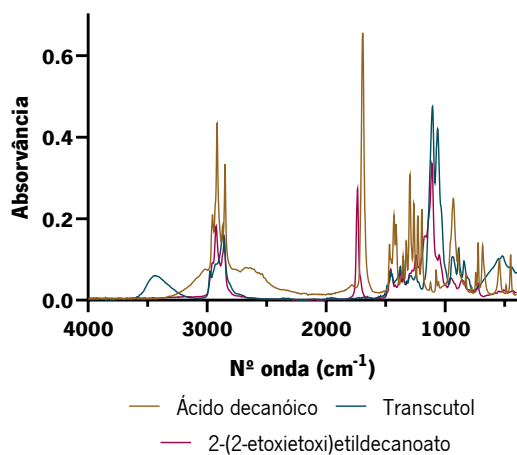


— Ácido octanóico — Transcutol  
— 2-(2-etoxietoxi)etiloctanoato

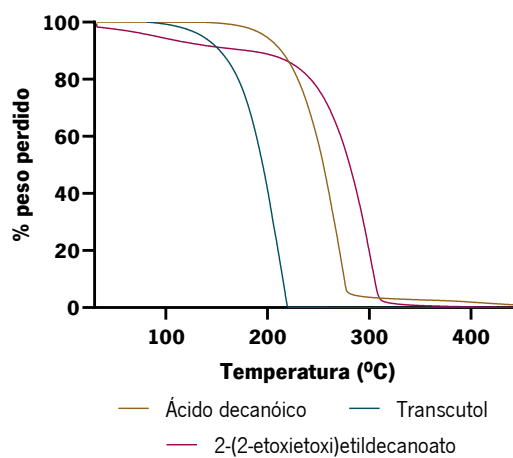
## Caracterização do composto 6b

 $^1\text{H}$  RMN

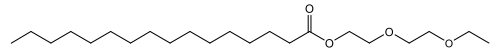
FTIR



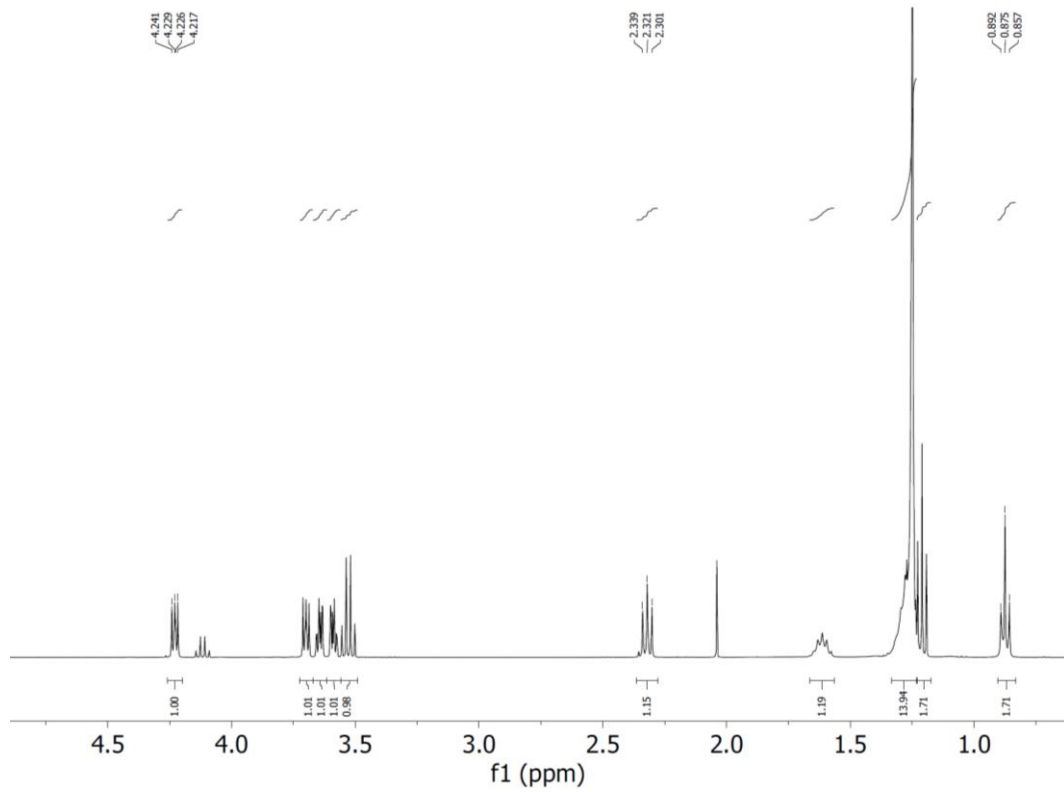
TGA



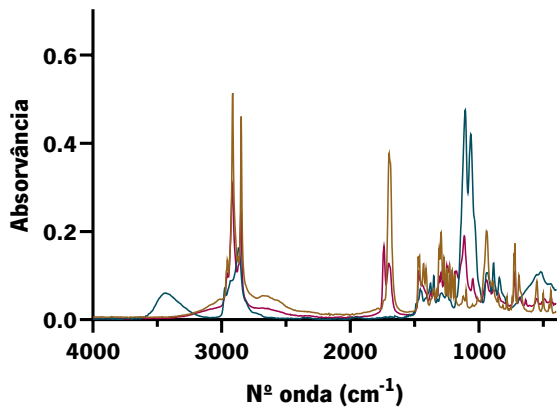
**Caracterização do composto 6c**



<sup>1</sup>H RMN

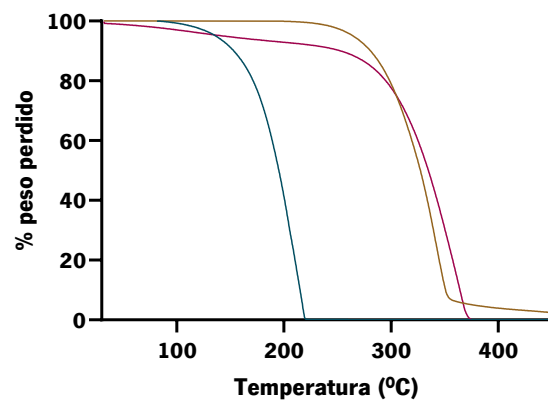


FTIR



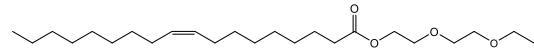
— Ácido palmítico — Transcutol  
— 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato

TGA

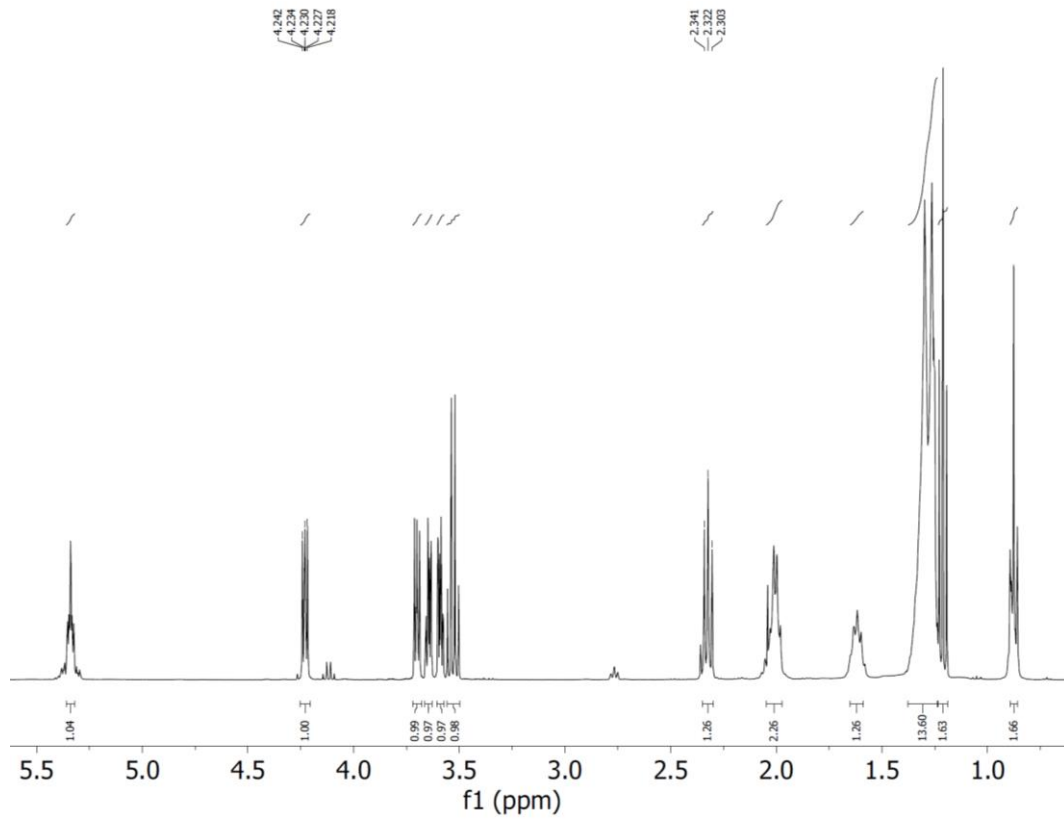


— Ácido palmítico — Transcutol  
— 2-(2-etoxietoxi)etilpalmitato

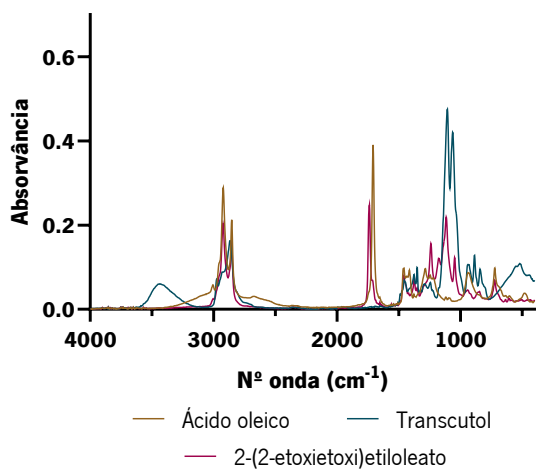
**Caracterização do composto 6d**



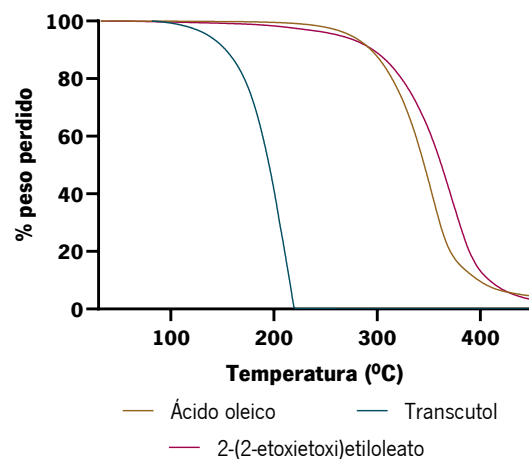
<sup>1</sup>H RMN



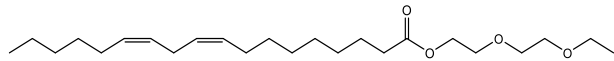
FTIR



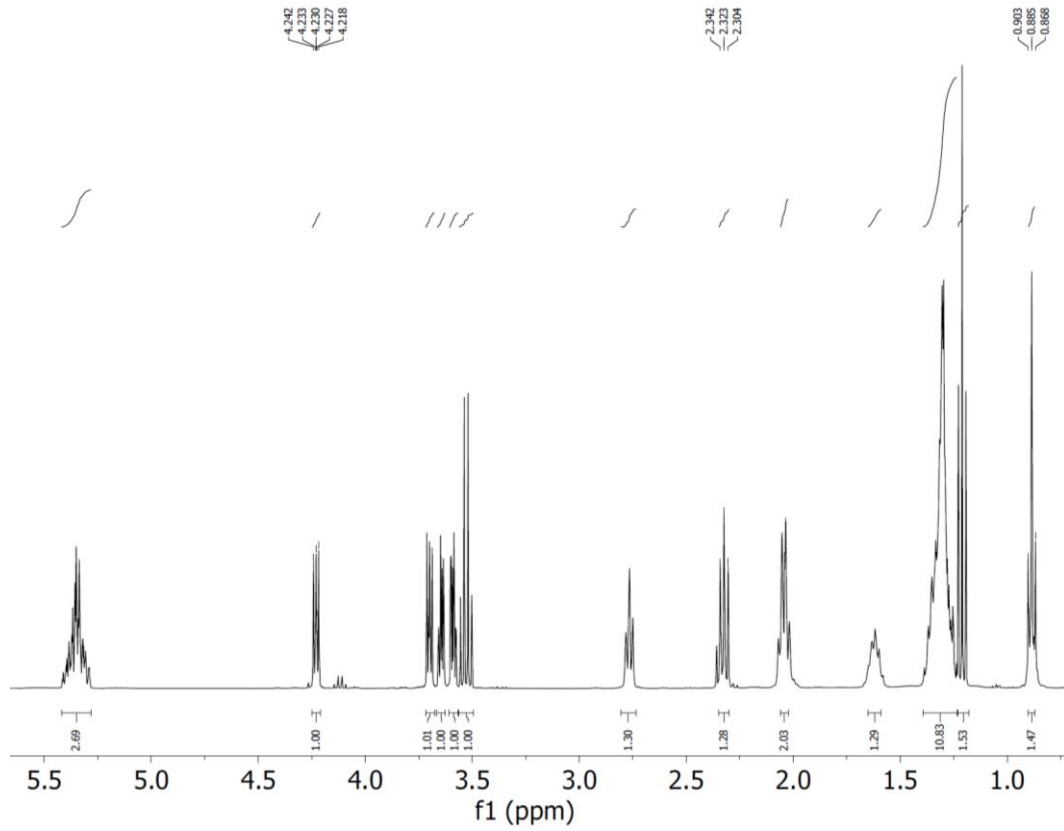
TGA



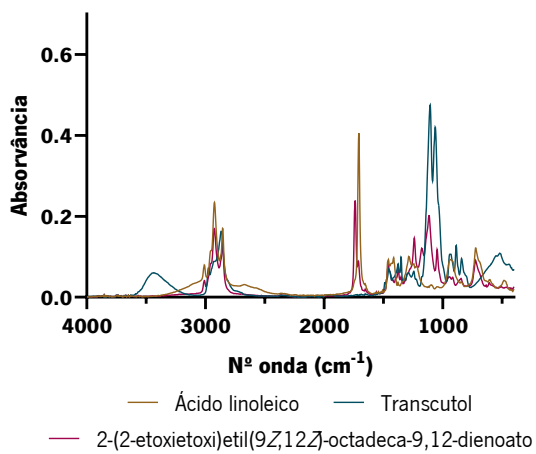
**Caracterização do composto 6e**



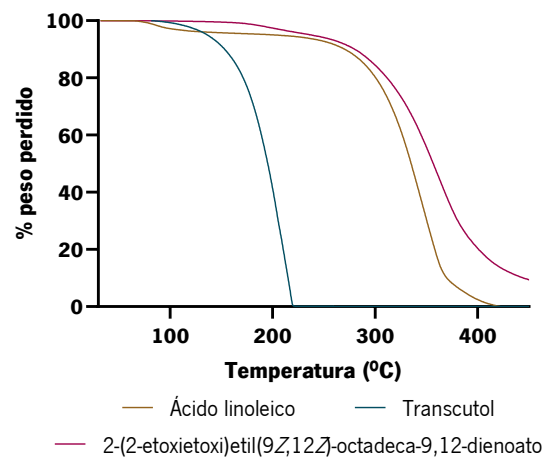
<sup>1</sup>H RMN



FTIR

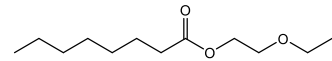
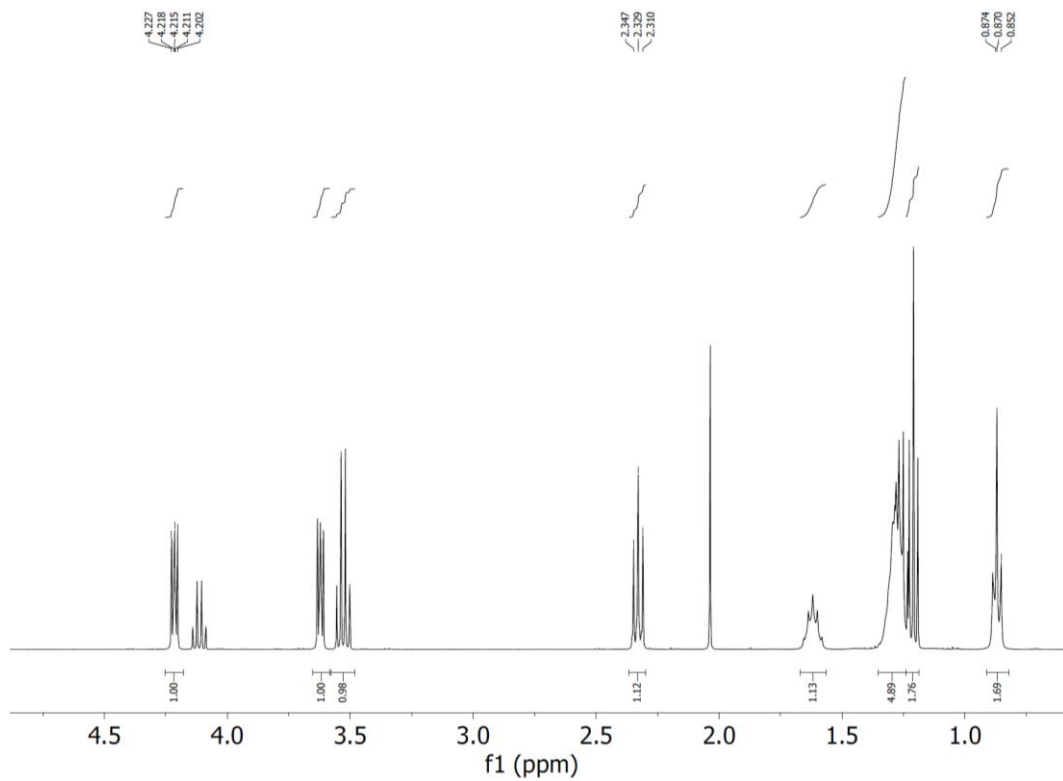


TGA

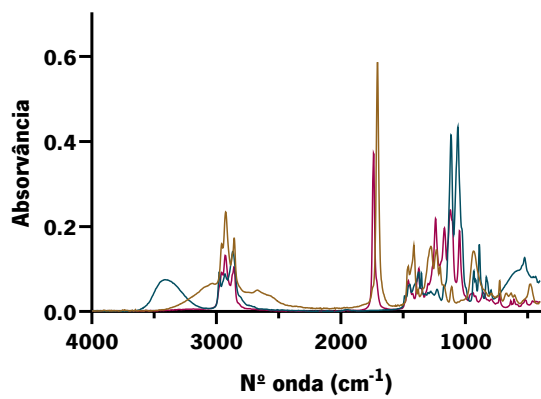




## Caracterização do composto 7a

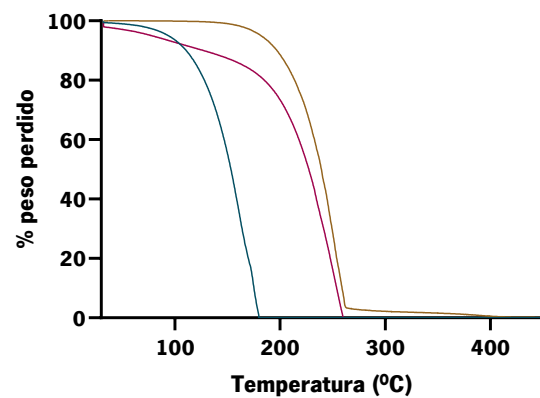
<sup>1</sup>H RMN

FTIR



— Ácido octanóico — 2-etoxietanol  
— 2-etoxietiloctanoato

TGA



— Ácido octanóico — 2-etoxietanol  
— 2-etoxietiloctanoato