

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química



Tese de Doutorado

**Síntese de Monoacilgliceróis Através da Glicerólise de Etil Ésteres e
Preparo de Fomulações Nanoestruturadas Lipídicas**

Cristiane Barsewisch Hobuss

Pelotas, 2020

Cristiane Barsewisch Hobuss

**Síntese de Monoacilgliceróis Através da Glicerólise de Etil Ésteres
e Preparo de Formulações Nanoestruturadas Lipídicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Bianchini

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Gracélie Serpa Schulz

Pelotas, 2020

Cristiane Barsewisch Hobuss

Síntese de monoacilgliceróis através da glicerólise de etil ésteres e preparo de formulações nanoestruturadas lipídicas

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 18 de maio de 2020

Banca Examinadora:

Daniela Bianchini

Prof.^a Dr.^a Daniela Bianchini (Orientadora)

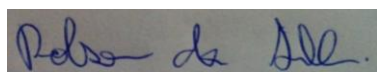
Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007


Prof.ª Dr.ª Carla R. B. Mendonça
Coordenadora do Curso



Prof.^a Dr.^a Carla Rosane Barboza Mendonça

Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005



Prof. Dr. Robson da Silva Oliboni

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina, 2015



Prof. Dr. Jose Mario Barichello

Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Hoshi University, 1999

Dedico este trabalho à minha família,
meu esposo Gerson e minha filha Maísa que
está chegando.

Agradecimentos

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A esta Universidade, ao Programa de Pós-Graduação em Química, seu corpo docente que oportunizaram a conclusão deste doutorado.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Daniela Bianchini e a minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Gracélie A. S. Schulz pelo aprendizado, pelo suporte, pelas correções e incentivos.

A minha família, minha mãe Wanderli e meu pai Wilson, pela minha existência e incentivo para meu crescimento acadêmico. A minha irmã Cristine. Ao meu marido Gerson, grande incentivador para que eu não desistisse dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Claudio M. P. Pereira, ao Técnico de laboratório Marco A. Z. Santos, ao Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica (LLIPBIO) - UFPEL, pelas análises e utilização do espaço para realização de algumas atividades.

A Prof.^a Dr.^a Gracélie A. S. Schulz, ao Prof. Dr. André R. Fajardo, ao Laboratório de Tecnologia e Desenvolvimento de Compósitos e Materiais Poliméricos (LaCoPol) – UFPEL, pela utilização do espaço para realização de algumas atividades.

A Prof.^a Dr.^a Daniela Bianchini, ao Laboratório de Sólidos Inorgânicos – LASIR – UFPEL, pela realização de algumas atividades.

Ao Prof. Dr. Tito R. S. Cadaval Junior, a doutoranda Bruna Farias, ao Laboratório de Tecnologia Industrial (LTI) - FURG, pela realização de análises.

A Prof.^a Dr.^a Patricia Nascente, ao mestrando Pedro Santos, ao Laboratório de Micologia e Bioprospecção - UFPEL, pela realização de análises.

Aos colegas de trabalho Maicon, Vânia e José pela amizade e incentivo.

A Djanira, secretária do PPGQ.

Aos amigos do LLIPBIO, LaCoPol e LASIR, Dalila, Lucas, Bruno, Andressa, Jaqueline, Rafael, Matheus, Taiana, Emanuel em especial a IC Lizia pela ajuda na finalização deste trabalho.

E a todos aqueles de uma forma ou de outra contribuíram para a finalização desse trabalho e também para a minha formação.

Obrigada.

*Os sonhos são como uma bússola, indicando os
caminhos que seguiremos e as metas que queremos
alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem
e nos permitem crescer.*
(Augusto Cury)

Resumo

Hobuss, Cristiane Barsewisch. **Síntese de Monoacilgliceróis Através da Glicerólise de Etil Ésteres e Preparo de Formulações Nanoestruturadas Lipídicas**. Orientadora: Daniela Bianchini. 2020. 128 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Neste trabalho, primeiramente foi realizada a síntese de ésteres etílicos (biodiesel) a partir da reação de transesterificação do óleo de linhaça com álcool etílico, de acordo com metodologia TDSP (*Transesterification Double Step Process*), ou seja, com o uso de catálise básica seguida de catálise ácida, a uma temperatura de 65 e 80°C, respectivamente, obtendo-se uma conversão em ésteres etílicos de 97%. Em seguida foi sintetizado monoacilglicerol através da glicerólise da mistura de ésteres etílicos. A condição ideal da reação apresentou uma conversão em acilgliceróis e rendimento em monoacilglicerol de 98% e 76%, respectivamente. Foi realizado também o preparo de formulações nanoestruturadas com método de baixa energia. A proporção ideal apresentou gotículas com um raio hidrodinâmico de 19 nm. Por último, foi realizado o encapsulamento de ácidos graxos saturados na formulação nanoestruturada, preparada na etapa anterior. Foi observado um resultado de tamanho de gotícula pequeno com os ativos comparável ao tamanho de gotículas sem composto ativo. As formulações nanoestruturadas com os ácidos graxos caprílico, cáprico e láurico foram avaliadas quanto a sua atividade antibacteriana e comparadas com os ácidos graxos em solução. Os ácidos graxos encapsulados cáprico e láurico apresentaram atividade antibacteriana e se mostraram promissores, porém não melhores do que os compostos em solução. Todos os ácidos graxos testados apresentaram atividade bacteriostática.

Palavras-Chave: Transesterificação. Nanoestruturas. Raio hidrodinâmico. Agente encapsulante. Atividade antibacteriana.

Abstract

Hobuss, Cristiane Barsewisch. **Synthesis of Monoacylglycerols Through Glycerolysis of Ethyl Esters and Preparation of Lipid Nanostructured Formulations.** Advisor: Daniela Bianchini. 2020. 127 f. Thesis (PhD in Chemistry) - Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

In this work, the synthesis of ethyl esters (biodiesel) was first carried out from the transesterification reaction of linseed oil with ethyl alcohol, according to the TDSP methodology (Transesterification Double Step Process), that is, with the use of basic catalysis followed of acid catalysis, at a temperature of 65 and 80°C, respectively, obtaining a conversion into ethyl esters of 97%. Then monoacylglycerol was synthesized through glycerolysis of the mixture of ethyl esters. The ideal condition of the reaction showed a conversion to acylglycerols and yield to monoacylglycerol of 98% and 76%, respectively. The preparation of nanostructured formulations using the low energy method was also carried out. The ideal proportion showed droplets with a hydrodynamic radius of 19 nm. Finally, the encapsulation of saturated fatty acids was performed in the nanostructured formulation, prepared in the previous step. A small droplet size was observed with the actives comparable to the droplet size without active compound. The nanostructured formulations with caprylic, capric and lauric fatty acids were evaluated for their antibacterial activity and compared to fatty acids in solution. The encapsulated fatty acids, capric and lauric, showed antibacterial activity and were promising, but no better than the compounds in solution. All the fatty acids tested showed bacteriostatic activity.

Keywords: Transesterification. Nanostructures. Hydrodynamic radius. Encapsulating agent. Antibacterial activity.

Lista de Figuras

Figura 1. Transesterificação de TAGs.....	7
Figura 2. Mecanismo de transesterificação de TAGs sob catálise básica.....	8
Figura 3. Mecanismo de transesterificação de TAGs sob catálise ácida.	10
Figura 4. Esquema sugerido para transesterificação TDSP.....	11
Figura 5. Estrutura química do α -monoacilglicerol.	13
Figura 6. Representação da possível localização de moléculas visitantes dentro da bicamada do monoacilglicerol. 1) molécula hidrofílica; 2) molécula anfifílica; 3) molécula lipofílica.....	15
Figura 7. Reação de glicerólise de etil ésteres.....	18
Figura 8. Sistemas baseados em lipídios explorados para entrega de medicamentos.....	19
Figura 9. Imagem do sistema de refluxo para a síntese do biodiesel.....	30
Figura 10. Imagem do biodiesel formado, na fase superior.	31
Figura 11. Imagem do resíduo das lavagens na purificação do monoacilglicerol.	32
Figura 12. Imagem do produto monoacilglicerol.....	32
Figura 13. Esquema da reação de transesterificação	35
Figura 14. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do óleo de linhaça.....	36
Figura 15. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do biodiesel.	37
Figura 16. Esquema da reação de glicerólise de etil ésteres.	38
Figura 17. Cromatogramas de: A - mistura de padrões externos e interno: monoleína (a), tricaprina (b), dioleína (c) e trioleína (d); B - biodiesel puro antes da reação de glicerólise; C - produtos da glicerólise.	41
Figura 18. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) do monoacilglicerol. .	44
Figura 19. Espectro de IR do biodiesel e do monoacilglicerol obtido com 76% de rendimento.	45
Figura 20. Curvas de TGA do biodiesel de óleo de linhaça e do monoacilglicerol.....	47
Figura 21. Representação do processo de preparo da formulação nanoestruturada	49
Figura 22. Analisador de partículas utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.	51

Figura 23. Equipamento utilizado na determinação do pH das formulações nanoestruturadas.	52
Figura 24. Viscosímetro utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.	52
Figura 25. Refratômetro utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.	53
Figura 26. Centrífuga utilizada para caracterizar as formulações nanoestruturadas.	53
Figura 27. Banho-maria utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.	54
Figura 28. Formulação nanoestruturada do teste 7 após a centrifugação.	67
Figura 29. Formulação nanoestruturada do teste 7 após o estresse térmico...	67
Figura 30. Representação do preparo da formulação nanoestruturada	71
Figura 31. Esquema de microplaca utilizada para teste antibacteriano dos ácidos graxos em bactérias.....	73
Figura 32. Imagem da placa com o resultado, por exemplo, do teste realizado para verificar se o composto ativo é bactericida ou bacteriostático.....	81
Figura 33. Cromatograma do teste M1 da reação de glicerólise	97
Figura 34. Cromatograma do teste M2 da reação de glicerólise	98
Figura 35. Cromatograma do teste M3 da reação de glicerólise	99
Figura 36. Cromatograma do teste M4 da reação de glicerólise	100
Figura 37. Cromatograma do teste M6 da reação de glicerólise	101
Figura 38. Cromatograma do teste M7 da reação de glicerólise	102

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição de ácidos graxos do óleo de linhaça.	6
Tabela 2. Rendimentos e condições reacionais relatados na literatura para síntese do monoacilglicerol	16
Tabela 3. Valores de conversão de biodiesel (C_{BD}) e rendimentos em acilgliceróis obtidos de acordo com os parâmetros utilizados na reação de glicerólise.	42
Tabela 4. Surfactantes testados no preparo das formulações nanoestruturadas de monoacilglicerol.....	50
Tabela 5. Escolha do surfactante usando proporção molar de MAG:SUR de 1:2 e H_2O qsp para 10 g da formulação	55
Tabela 6. Escolha do surfactante utilizando um teor em massa de 3,5% de MAG, 20% de surfactante e H_2O qsp para 10 g da formulação	58
Tabela 7. Efeito do álcool etílico em formulações com razão molar MAG:SUR de 1:2 com Tween 80 como surfactante.	61
Tabela 8. Efeito da variação do teor do surfactante Tween 20 e da presença de álcool etílico nos testes utilizando 1 mmol do monoacilglicerol	63
Tabela 9. Resultados da caracterização da formulação nanoestruturada do teste 7	65
Tabela 10. Ácidos graxos testados no preparo das formulações nanoestruturadas	71
Tabela 11. Resultados da caracterização das formulações nanoestruturadas com e sem os compostos ativos	75
Tabela 12. Resultados obtidos nos testes biológicos	77
Tabela 13. Concentração inibitória mínima dos ácidos graxos para as respectivas bactérias.....	79

Lista de abreviaturas e siglas

AGLs - Ácidos Graxos Livres

DAG - Diacilglicerol

DHA - Ácido Docosaheptaenoico

EL - Emulsões Líquidas

EPA - Ácido Eicosapentaenoico

FAEE - *Fatty acid ethyl ester* (Éster Etílico de Ácido Graxo)

FAME - *Fatty acid methyl ester* (Éster Metílico de Ácido Graxo)

FDA - *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FTIR-ATR - *Fourier Transformed Infrared - Attenuated Total Reflectance* (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada)

GC-FID – *Gas chromatograph Flame Ionization Detector* (Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama)

MAG - Monoacilglicerol

NSL - Nanopartículas Sólidas Lipídicas

P.A. - Padrão Analítico

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TAG - Triacilglicerol

TDSP - *Transesterification Double Step Process* (Processo de Transesterificação em Dupla Etapa)

TGA - *Thermogravimetric Analysis* (Análise Termogravimétrica)

TMS – Tetrametilsilano

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CXB - Celecoxibe

CBZ - Carbamazepina

RH – Raio Hidrodinâmico

IPD – Índice de Polidispersão

PZ – Potencial Zeta

CD - Condutividade

ME – Mobilidade Eletroforética

HBL - Balanço hidrofílico lipofílico

Sumário

1. Introdução.....	2
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Síntese do Biodiesel	7
2.2. Síntese de monoacilgliceróis	12
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo Geral:.....	27
3.1.1. Objetivos Específicos:	27
4. Parte 1: Otimização da síntese de MAG a partir da reação de glicerólise de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE).....	29
4.1. Reagentes e Métodos:.....	29
4.1.1. Reagentes	29
4.1.2. Métodos.....	29
4.1.2.1.Reação de Transesterificação: Síntese de biodiesel a partir do óleo de linhaça.....	29
4.1.2.2. Reação de Glicerólise: Síntese de acilgliceróis	31
4.2. Instrumentação para Caracterização.....	32
4.2.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	32
4.2.2. Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-FID).....	33
4.2.3. Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	34
4.2.4. Análise Termogravimétrica (TGA)	34
4.3. Resultados e discussões	34
4.3.1. Processo de transesterificação.....	35
4.3.2. Processo de glicerólise.....	38
5. Parte 2: Otimização de formulações nanoestruturadas a partir do monoacilglicerol.....	49
5.1. Reagentes e Métodos.....	49

5.1.1. Reagentes	49
5.1.2. Métodos.....	49
5.2. Instrumentação para Caracterização.....	51
5.2.1. Tamanho de gotícula e estabilidade	51
5.2.2. Determinação do valor de pH	52
5.2.3. Viscosidade	52
5.2.4. Índice de refração	53
5.2.5. Centrifugação	53
5.2.6. Estresse térmico	54
5.3. Resultados e discussões	54
5.3.1. Escolha do surfactante	54
5.3.2. Testes com uso de 20% de surfactantes.....	58
5.3.3. Testes com uso do co-surfactante álcool etílico	60
5.3.4. Caracterização da formulação nanoestruturada.....	64
6. Parte 3: Monoacilglicerol como agente encapsulante em formulações nanoestruturadas	70
6.1. Reagentes e Métodos.....	70
6.1.1. Reagentes	70
6.1.2. Métodos.....	70
6.1.2.1. Preparo da formulação nanoestruturada com ácido graxo	70
6.1.2.2. Preparo do meio de cultura Mueller Hinton Broth	71
6.1.2.3. Preparo da solução dos ácidos graxos em solução.....	72
6.1.2.4. Preparo do meio de cultura Mueller Hinton Ágar	72
6.1.2.5. Ativação das bactérias.....	72
6.1.2.6. Teste de ação antibacteriana dos ácidos graxos encapsulados e em solução.....	72
6.1.2.7. Teste quanto ao composto ser bactericida ou bacteriostático	73
6.2. Instrumentação para Caracterização.....	74

6.2.1. Tamanho de gotícula e estabilidade	74
6.2.2. Determinação do valor de pH	74
6.3. Resultados e discussões	74
6.3.1. Caracterização da formulações nanoestruturadas	75
6.3.2. Testes biológicos	77
6.3.3. Teste quanto ao composto ser bactericida ou bacteriostático	81
7. Conclusão.....	84
8. Sugestões para trabalhos futuros:	86
9. Referências	88
ANEXO I. Cromatogramas dos monoacilgliceróis obtidos pelas reações de glicerólise	97
ANEXO II. Artigo: <i>Synthesis and characterization of monoacylglycerols through glycerolysis of ethyl esters derived from linseed oil by green processes</i>	103
ANEXO III. Solicitação de Registro de Patente intitulada: Formulação nanoestruturada lipídica, contendo monoacilglicerol derivado do óleo de linhaça, seus usos e processos de produção.....	113

Introdução

1. Introdução

Há muito tempo, veículos lipídicos têm sido usados para aumentar a absorção de drogas no organismo (LIU *et al.*, 2014). Nanopartículas lipídicas têm sido especialmente consideradas para esta finalidade, em virtude destes compostos, sintéticos ou naturais, apresentarem boa biocompatibilidade e potencial para liberação controlada de drogas. Portanto, as nanopartículas lipídicas têm o potencial para aumentar a proporção do que é absorvido e transportado para o sistema (TIWARI; PATHAK, 2011).

Neste contexto, destacam-se os monoacilgliceróis, os quais são compostos formados por um ácido graxo de cadeia longa covalentemente ligada a uma molécula de glicerol através de uma ligação éster (RAROKAR *et al.*, 2017), sendo estes, os emulsificantes mais utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (LANGONE *et al.*, 2002), e podem também ser utilizados como veículos para fármacos (FREITAS *et al.*, 2008).

As reações para obtenção dos monoacilgliceróis, podem ocorrer através de vários processos, incluindo a reação enzimática, transesterificação, esterificação de óleos ou gorduras utilizando catalisador alcalino inorgânico, e também pode ser obtido a partir da reação de glicerólise do biodiesel (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015). Pode-se destacar que condições mais brandas são utilizadas na síntese de monoacilgliceróis quando os mesmos são produzidos através da reação de glicerólise do biodiesel.

Dentre os diferentes sistemas com bases lipídicas, as formulações nanoestruturadas com monoacilgliceróis, os quais apresentam características anfifílicas, podem ser preparadas usando métodos de baixa energia, nos quais não há necessidade de uma força externa, não são destrutivos e não causam danos às moléculas encapsuladas, dos quais se destaca o método de inversão de composição de fase.

Sendo assim, considerando-se a importância e o potencial desses compostos de caráter anfifílico, a proposta deste trabalho foi buscar a otimização das condições reacionais para a obtenção do monoacilglicerol com o propósito de utilizá-lo como material base para o preparo de nanoestruturas lipídicas. Buscar a otimização das condições para obtenção de formulações

nanoestruturadas e aplicá-las como veículo para encapsulamento de ácidos graxos saturados para testes em bactérias multirresistentes.

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

A administração via oral de fármacos proporciona uma opção valiosa para o tratamento de várias doenças devido as suas diversas vantagens como a adesão do paciente ao tratamento, a relação custo-eficácia e a facilidade de administração, além de ser considerada como a rota mais comumente aceita para administração de drogas. Também é o meio preferido para agentes antitumorais, antidiabéticos e anti-hipertensivos. Porém, mais de 40% das drogas descobertas e fármacos em desenvolvimento não são adequados para administração oral, devido à sua natureza hidrofóbica e à sua baixa biodisponibilidade oral, ou seja, a insuficiência da droga é apresentada ao local de ação com subsequente falta de ação farmacológica (POONIA *et al.*, 2016).

Para o aumento da biodisponibilidade, vários pesquisadores tem tentado superar os desafios associados à administração oral, tais como, formação de sais solúveis e encapsulação de fármacos em veículos, tais como micelas poliméricas, nanopartículas, lipossomas, emulsões, nano-dimensionamento da forma administrada de fármacos, entre outras (POONIA *et al.*, 2016).

A ciência e tecnologia desenvolvida em nanoescala tem atraído considerável atenção nos últimos anos, pela expectativa do impacto que os materiais nanoestruturados podem causar na melhoria da qualidade de vida (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). A nanotecnologia pode ser definida como o uso de nanomateriais para benefício humano (SINGH, 2017).

Nanoestruturas são definidas como estruturas tendo pelo menos uma dimensão, com estrutura interna ou de superfície, na escala entre 0 e 100 nm (NASIRPOURI, 2017) e têm recebido crescente interesse como resultado de suas propriedades (XIA *et al.*, 2003). A nanotecnologia abriu uma nova área de pesquisa em diferentes campos (SHUKLA, 2017).

Sendo assim, as nanoestruturas estão presentes em novos produtos em diversos setores, como nas indústrias alimentícia, de nanofertilizantes e de cosméticos (SINGH, 2017). Uma das áreas mais importantes da nanotecnologia é a "nanomedicina", que tem um potencial incrível para revolucionar o diagnóstico e a terapêutica sob a premissa de desenvolver nanossistemas de administração de medicamentos (PARK, 2007).

Dentre os nanossistemas existentes destacam-se os nanossistemas lipídicos, pois são transportadores seguros e biodegradáveis (NICULAE *et al.*, 2014). Para a formulação de nanossistemas lipídicos a fase lipídica pode ser um monoacilglicerol (MAG), por exemplo, que é o objeto de estudo deste trabalho, e pode ser obtido a partir da reação de glicerólise do biodiesel.

O biodiesel consiste em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) ou ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs). Pode ser obtido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais por meio de reações de transesterificação de triacilgliceróis (TAGs) de cadeias longas (DRAPCHO; NGHIM; WALKER, 2008) (PINZI *et al.*, 2009), ou por reações de esterificação de ácidos graxos livres (AGLs) (LOTERO *et al.*, 2005). As principais fontes de TAGs para a produção de biodiesel são os óleos vegetais, como os de girassol, sementes de tabaco, colza, milho, palma, linhaça, mamona, babaçu, soja, amendoim e pinhão manso, entre outros (ČERNOCH; HÁJEK; SKOPAL, 2010) (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011).

O teor de óleo nas sementes oleaginosas depende fortemente das características de cada cultura e das condições ambientais (BANCQUART *et al.*, 2001). No Brasil, por exemplo, as condições climáticas e do solo são convenientes para a produção de linhaça (*Linum usitatissimum*) (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010) (HO; HAO; GUO, 2014). A Tabela 1 mostra a composição de ácidos graxos do óleo de linhaça.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos do óleo de linhaça.

Nome do ácido graxo*	Símbolo* (Cx:n)	Fórmula	Massa (%)
Palmítico	C16:0	$C_{16}H_{32}O_2$	5
Estearico	C18:0	$C_{18}H_{36}O_2$	3
Oleico	C18:1	$C_{18}H_{34}O_2$	21
Linoleico	C18:2	$C_{18}H_{32}O_2$	15
Linolênico	C18:3	$C_{18}H_{30}O_2$	54

*Outros ácidos graxos somam aproximadamente 2%

* Cx = número de átomos de carbono da cadeia carbônica; n = número de ligações duplas na cadeia carbônica.

Fonte: ZAMBIAZI *et al.*, 2007, p. 116.

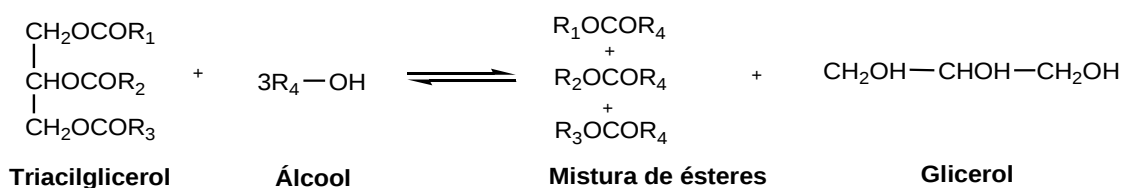
De acordo com a Tabela 1, o óleo de linhaça possui um alto teor de ácido α -linolênico (HUANG *et al.*, 2018) (CZLONKA *et al.*, 2020). Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), especialmente o ácido linoleico (C18: 2n-6) e o ácido linolênico (C18: 3n-3) têm papel

anticarcinogênico e cardioprotetor em humanos. A redução do consumo de ácidos graxos saturados e o aumento do consumo de ácidos graxos poli-insaturados (ácidos graxos com mais de uma ligação dupla) são incentivados por seus benefícios potenciais para a saúde: pode diminuir o risco de doenças cardiovasculares, promover o melhor funcionamento e o desenvolvimento do cérebro, eliminar os radicais livres, e também por serem agentes anti-inflamatórios (HUANG *et al.*, 2018). Embora apresentem apenas uma ligação dupla em sua cadeia carbônicas, os ácidos graxos monoinsaturados também são considerados benéficos para a saúde humana (JEBRANE *et al.*, 2017).

As sementes de linhaça contêm um alto teor de óleo, em torno de 40%, o qual pode ser convertido em biodiesel (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010) (HO; HAO; GUO, 2014) e este, em monoacilglicerol (SCHULZ *et al.*, 2011). As seções 2.1 e 2.2 descrevem as sínteses do biodiesel e do MAG, respectivamente.

2.1. Síntese do Biodiesel

O biodiesel utilizado na síntese do MAG pode ser previamente sintetizado a partir de reações de transesterificação de TAGs e álcoois de cadeia curta, conforme mostrado na Figura 1.



R₁, R₂, R₃: cadeias carbônicas dos ácidos graxos.

R₄: cadeia carbônica do álcool reagente.

Figura 1. Transesterificação de TAGs.

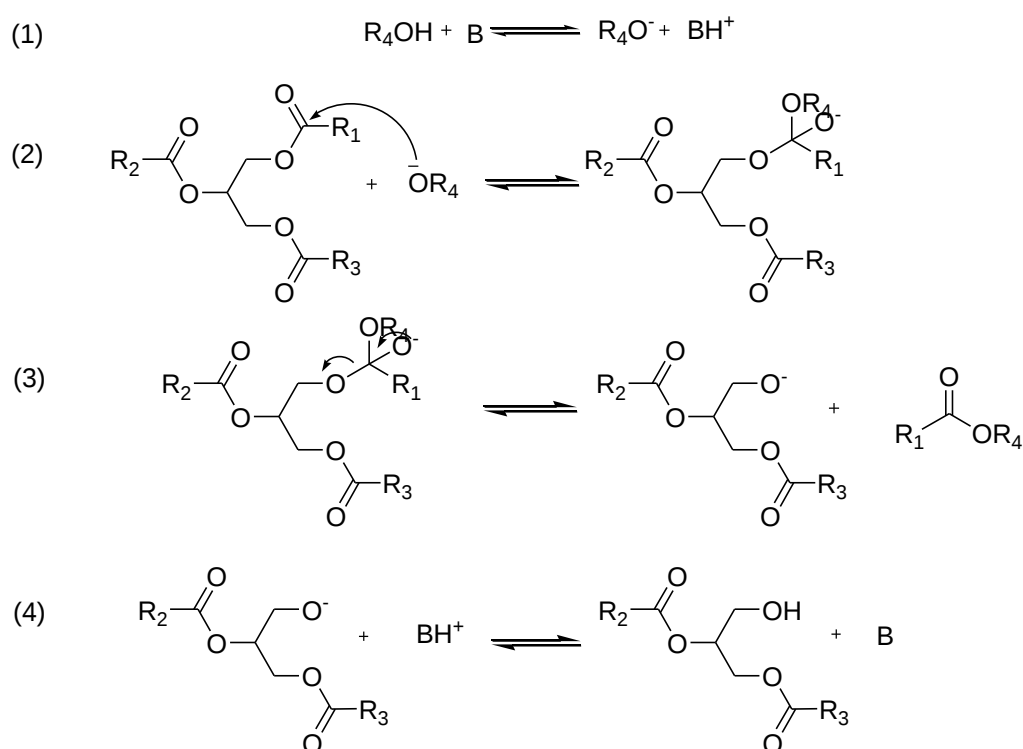
Fonte: YUSUF, 2007, p. 295.

Para se obter taxas de conversão viáveis, a reação de transesterificação requer o uso de um catalisador (LOTERO *et al.*, 2005). Dentre os catalisadores utilizados se destacam os básicos e os ácidos.

Os catalisadores básicos mais usados na produção de biodiesel são NaOH, KOH e os carbonatos (SCHUCHARDT; SERCHELI; MATHEUS, 1998),

mas os hidróxidos são industrialmente preferidos devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. O mecanismo da reação de transesterificação de TAGs catalisada por bases é mostrado na Figura 2.

O primeiro passo é a reação da base com o álcool, produzindo um íon alcóxido (1). O ataque nucleofílico do alcóxido à carbonila do TAG (2) gera um intermediário tetraédrico, a partir do qual o éster de alquila e os ânions correspondentes do diacilglicerol (DAG) são formados (3). Por último, o catalisador é regenerando, e é capaz de reagir com uma segunda molécula do álcool, iniciando um novo ciclo de reações (4).



B: Catalisador básico

R_1 R_2 e R_3 : Cadeia carbônica de ácidos graxos

R_4 : Grupo alquila do álcool

Figura 2. Mecanismo de transesterificação de TAGs sob catálise básica.

Fonte: LOTERO et al., 2005, p. 5357.

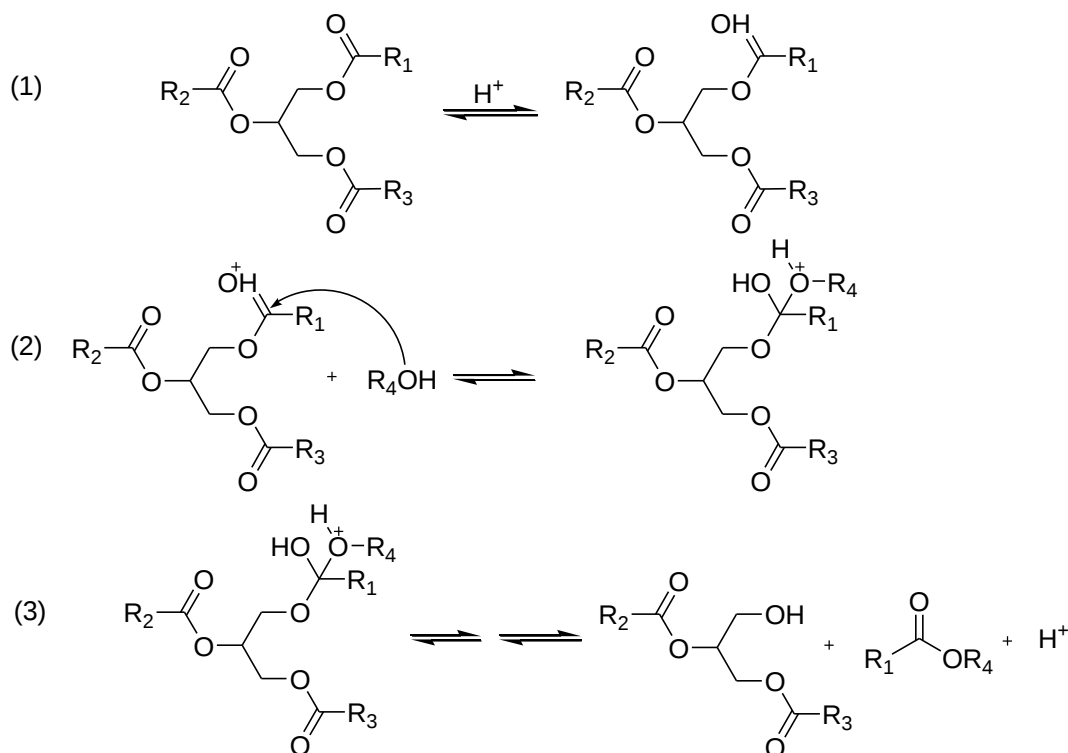
DAGs e MAGs são convertidos pelo mesmo mecanismo para uma mistura de ésteres alquílicos e glicerol. Alcóxidos de metais alcalinos (como CH_3ONa usado para metanólise, por exemplo) são os catalisadores mais ativos, pois apresentam rendimentos altos (> 98%) em um curto tempo de reação (30 min), mesmo que sejam aplicadas baixas concentrações molares.

Hidróxidos de metais alcalinos (KOH e NaOH) são mais baratos do que alcóxidos metálicos, mas menos ativos. Ainda assim, eles são uma boa alternativa, uma vez que se pode obter altas conversões de óleos vegetais apenas aumentando o teor de catalisador para 1 ou 2% em massa. Mesmo na presença de um álcool anidro, uma pequena quantidade de água é produzida no sistema pela reação do hidróxido com o álcool. A presença da água dá origem à hidrólise de alguns dos ésteres produzidos, com consequente formação de sabão. Esta reação de saponificação é indesejável, pois reduz o rendimento do éster devido à formação de emulsões (SCHUCHARDT; SERCHELI; MATHEUS, 1998), as quais aumentam a viscosidade, aumentam o custo da separação do produto (LOTERO *et al.*, 2005) e dificultam consideravelmente a recuperação do glicerol. Assim, o álcool e o catalisador devem também cumprir especificações rigorosas. O álcool, bem como o catalisador, deve ser essencialmente anidro e o total de água não deve ser maior do que 0,3% em massa, sendo preferencialmente menor do que 0,1% em massa. Para conformidade com tais especificações de matéria-prima, exige-se o uso de óleos vegetais altamente refinados, cujo preço pode representar de 60 a 75% do custo final do biodiesel. A restrição na matéria-prima é o problema principal nesse processo. Em particular, a quantidade de ácidos graxos livres totais no conteúdo lipídico não deve exceder 0,5% em massa da matéria-prima (LOTERO *et al.*, 2005).

No processo de transesterificação catalisada por ácidos utiliza-se de preferência ácido sulfônico ou ácido sulfúrico. As transesterificações ácido-catalisadas têm uma vantagem importante em relação às reações base-catalisadas, pois o desempenho do catalisador ácido não é afetado pela presença de ácidos graxos livres na matéria-prima. Na verdade, catalisadores ácidos podem catalisar simultaneamente reações de esterificação e de transesterificação. Assim, com uma grande vantagem, os catalisadores ácidos podem produzir biodiesel diretamente a partir de matérias-primas de lipídios de baixo custo, geralmente associados com altos teores de AGLs. Matérias-primas de baixo custo, como óleo de cozinha usado e graxas, geralmente têm níveis de AGLs $\geq 6\%$ (LOTERO *et al.*, 2005).

Um dos principais fatores que interfere nas reações de transesterificação é a razão molar álcool/óleo vegetal, sendo que um excesso de álcool favorece

a formação dos produtos. Por outro lado, uma quantidade excessiva do álcool aumenta a solubilidade do glicerol no meio, tornando mais difícil a sua separação. Assim, a razão molar ideal de álcool/óleo tem que ser estabelecida empiricamente, considerando cada processo individualmente. O mecanismo da reação de transesterificação catalisada por ácidos é mostrado na Figura 3. Primeiramente ocorre a protonação do TAG, formando um íon oxônio (1), que, depois de um ataque nucleofílico do álcool, produz um intermediário tetraédrico (2). Após mais algumas etapas ocorre a hidrólise completa do TAG em ésteres e glicerol, ocorrendo a regeneração do catalisador ácido (3) (SCHUCHARDT; SERCHELI; MATHEUS, 1998).



R_1 R_2 e R_3 : Cadeia carbônica de ácidos graxos

R_4 : Grupo alquila do álcool

Figura 3. Mecanismo de transesterificação de TAGs sob catálise ácida.

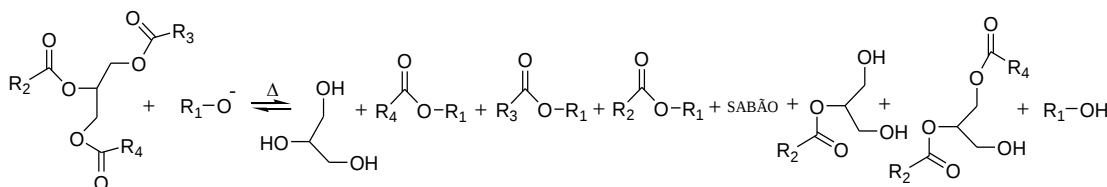
Fonte: LOTERO *et al.*, 2005, p. 5356.

O mecanismo de catálise ácida indica como a interação substrato-catalisador é importante, pois a protonação do oxigênio da carbonila aumenta a eletrofilicidade do átomo do carbono adjacente, tornando-o mais suscetível ao ataque nucleofílico pelo álcool. Em contraste, a catálise básica toma uma rota mais direta, criando primeiro um íon alcóxido, que atua diretamente como o

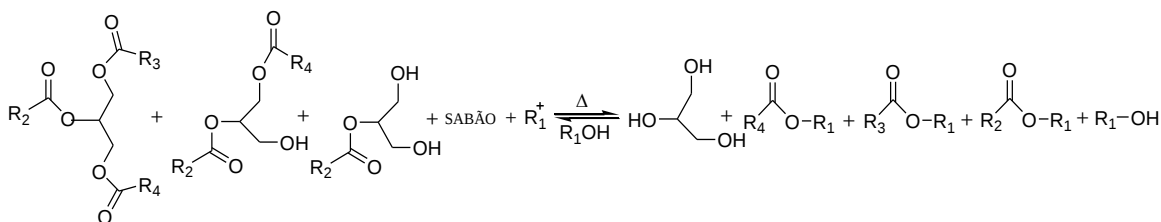
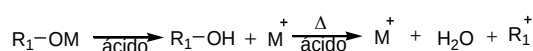
nucleófilo forte, dando origem a um caminho químico diferente para a reação. Esta diferença crucial, ou seja, a formação de uma espécie mais eletrofílica (catálise ácida) *versus* a formação de um nucleófilo (catálise básica), é responsável pelas diferenças observadas entre os dois mecanismos (LOTERO *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado por Samios e colaboradores (SAMIOS *et al.*, 2009), foi desenvolvida uma metodologia de transesterificação de óleos vegetais em duas etapas, TDSP (*Transesterification Double Step Process*), que pode ser descrita como reações de transesterificação consecutivas, e que incorporam as principais características e princípios das catálises básica e ácida. A primeira etapa ocorre da mesma forma como descrito anteriormente na catálise básica. A segunda etapa reacional ocorre com a adição de ácido sulfúrico e álcool quando a mistura reacional da etapa 1 apresenta pH entre 12 e 14, ou seja, quase na ausência total de íons H^+ . As etapas 1 e 2 estão mostradas na Figura 4 (SAMIOS *et al.*, 2009).

ETAPA 1:



ETAPA 2:



M: Na^+ , K^+

R_1 : Grupo alquila do álcool

R_2 , R_3 e R_4 : Cadeia carbônica de ácidos graxos

Figura 4. Esquema sugerido para transesterificação TDSP.

Fonte: SAMIOS *et al.*, 2009, p. 603.

Os álcoois utilizados nas reações de transesterificação incluem o metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol. O metanol e o etanol são

utilizados com mais frequência em pesquisas de laboratório e na indústria do biodiesel. O baixo custo do metanol torna este a primeira escolha para a reação de transesterificação (LOTERO *et al.*, 2005). Entretanto, o emprego de etanol em vez de metanol oferece vários benefícios, incluindo maior miscibilidade com óleos vegetais, o que permite maior contato na etapa de reação (BASSO; MEIRELLES; BATISTA, 2017). O uso do etanol reduz os impactos ambientais, evitando a emissão de gases do efeito estufa, já que esse pode ser obtido por processos biotecnológicos. Além disso, o etanol é um composto não tóxico e seguro para a saúde humana (NETO; BATISTA; MEIRELLES, 2018), e é produzido em grandes quantidades a partir da cana-de-açúcar no Brasil (DIAS *et al.*, 2015). De acordo com o *Food and Drug Administration-FDA / USA* (2012), o etanol é classificado como solvente Classe 3, que pode ser considerado menos tóxico e de menor risco para a saúde humana (NETO; BATISTA; MEIRELLES, 2018). Assim, o etanol é o candidato ideal para a síntese de um biodiesel totalmente biodegradável (LOTERO *et al.*, 2005).

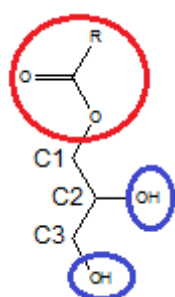
Para este trabalho foi escolhido o método TDSP com álcool etílico para a obtenção de ésteres etílicos, com posterior conversão ao monoacilglicerol por glicerólise. A produção de biodiesel é acompanhada por uma grande quantidade de glicerina como subproduto e, uma alternativa para este grande volume de glicerina é utilizá-la em reações de glicerólise, visando à produção de monoacilgliceróis (SCHULZ *et al.*, 2011).

2.2. Síntese de monoacilgliceróis

Os monoacilgliceróis e seus derivados são amplamente utilizados como emulsificantes na indústria de alimentos. Eles são considerados agentes seguros e não nocivos em baixa concentração, sem reações adversas ou toxicidade para as mucosas (SLOBODIAN *et al.*, 2013). De fato, os MAGs podem ser encontrados em baixa concentração em produtos naturais como o leite, por exemplo (ISAACS; LITOV; THORMARS, 1995). Além da indústria de alimentos, os MAGs são empregados em produtos cosméticos, como pomadas, loções e desodorizantes (SLOBODIAN *et al.*, 2013). Na indústria plástica, os MAGs funcionam como agentes lubrificantes e plastificantes

(BUNKA *et al.*, 2007). Na indústria têxtil, os MAGs podem melhorar a solidez da cor e o contraste dos tecidos (SLOBODIAN *et al.*, 2013).

Os MAGs são ésteres de glicerol, um álcool trihídrico no qual apenas um dos grupos hidroxila (grupos OH) é esterificado com um ácido graxo de cadeia longa (CHRISTIE; HAN, 2010). Monoacilglicerol é um típico éster de glicerol, ou seja, um composto que pertence à classe dos lipídios, contendo um grupo éster (-COOR) de ácido graxo de cadeia longa e dois grupos hidroxila (-OH) (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015). O MAG é constituído por um ácido graxo de cadeia longa covalentemente ligado a uma molécula de glicerol, um álcool trihídrico, através de uma ligação éster (RAROKAR *et al.*, 2017). Se o grupo éster estiver ligado ao átomo de carbono C1 e os dois grupos hidroxila estiverem ligados aos átomos de carbono C2 e C3 do glicerol, o composto é chamado 1-monoacilglicerol ou α -MAG. Por outro lado, se o grupo éster estiver ligado ao átomo de carbono C2, enquanto os dois grupos hidroxila estão ligados aos átomos de carbono C1 e C3, o composto é chamado 2-monoacilglicerol ou β -MAG. A Figura 5 mostra a estrutura química típica de α -monoacilglicerol:



- COOR = grupo éster de caráter hidrofóbico

R = $-(CH_2)_n-$, onde $n = 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23$

R = cadeia carbônica saturada ou insaturada

- OH = grupo hidroxila de caráter hidrofílico

Figura 5. Estrutura química do α -monoacilglicerol.

Fonte: NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015, p. 126.

MAGs podem ser preparados pela glicerólise de triacilgliceróis de gorduras ou óleos vegetais (NOUREDDINI; MEDIKONDURU, 1997) (LUO *et al.*, 2015), pela glicerólise de ésteres alquílicos (SONNTAG, 1982) (NOUREDDINI; MEDIKONDURU, 1997) (SCHULZ *et al.*, 2011), pela esterificação de ácidos graxos com glicerol e pela transesterificação de óleos com álcoois de cadeia curta (HE *et al.*, 2016). O processo industrial de glicerólise geralmente é promovido com gorduras ou óleos utilizando

catalisadores alcalinos homogêneos, como NaOH, KOH e Ca(OH)_2 a temperaturas elevadas (por exemplo, 255 °C), produzindo de 40% a 60% de MAGs. No entanto, altas temperaturas podem também afetar as propriedades físico-químicas do produto final e sua aplicação (SONNTAG, 1982) (NOUREDDINI; MEDIKONDURU, 1997) (LUO *et al.*, 2015).

Numerosas abordagens têm sido pesquisadas para melhorar esta reação através de vários processos, incluindo reações enzimáticas, reações de transesterificação e reações de esterificação de óleos ou gorduras utilizando catalisador alcalino inorgânico a 220-260 °C. Porém, temperaturas elevadas resultam em um alto consumo de energia, sabor carbonizado do produto e coloração escura (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015).

É de conhecimento geral que o caráter hidrofílico de um monoacilglicerol se deve à presença de dois grupos hidroxila, enquanto a sua hidrofobicidade é conferida pela cadeia carbônica do éster. A combinação de ambas as propriedades em um monoacilglicerol determinam sua vasta gama de aplicações, entre as quais como emulsionante. MAG é uma molécula anfifílica, ou seja, apresenta em sua estrutura regiões de caráter hidrofílico ou polares, que tem afinidade pela água, e regiões de caráter hidrofóbico ou apolar, que não apresentam afinidade pela água (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015).

Quando misturado à água e óleo, o monoacilglicerol forma estruturas auto-montadas, que podem ser usadas para proteger substâncias bioativas da degradação, para solubilizar drogas e controlar a liberação de compostos ativos. As propriedades dos monoacilgliceróis dependem dos ácidos graxos que o compõem, sendo que glicerídeos de ácidos graxos insaturados têm pontos de fusão mais baixos do que os ácidos graxos saturados com o mesmo número de átomos de carbono (RAROKAR *et al.*, 2017).

Quase todos os tipos de monoacilgliceróis podem ser aplicados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (ZHONG; CHEONG; XU, 2014) (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015) (PETRA *et al.*, 2015). Este composto também pode ser usado como surfactante não-iônico e como precursor na síntese de lipídios ativos, como triacilgliceróis, diacilgliceróis, fosfolipídios, glicolipídios e lipoproteínas (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015). Existem também várias outras aplicações dos monoacilgliceróis, incluindo agentes

lubrificantes, plastificantes e aditivos na fabricação de têxteis. Alguns monoacilgliceróis também foram identificados por apresentarem atividades específicas, como a monolaurina testada como agente antibacteriano, antifúngico e antiviral, e a mono-oleína usada como antioxidante (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015).

Os monoacilgliceróis de ácidos graxos poli-insaturados, tais como ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), foram identificados como tendo um alto valor nutricional, o que contribui para a saúde do ser humano (NITBANI; SISWANTA; SOLIKHAH, 2015).

Uma característica intrigante dos monoacilgliceróis é a sua capacidade de formar várias estruturas de agregação, como as fases líquidas cristalinas quando em contato com água (SAGALOWICZ *et al.*, 2006).

As estruturas de agregação formadas por monoacilgliceróis consistem em domínios hidrofílicos e hidrofóbicos em nanoescala. Consequentemente, tais estruturas contêm uma superfície extremamente grande. A compartimentação presente nas estruturas de agregação pode ser usada para introduzir moléculas de natureza hidrofílica, lipofílica ou anfifílica (Figura 6).

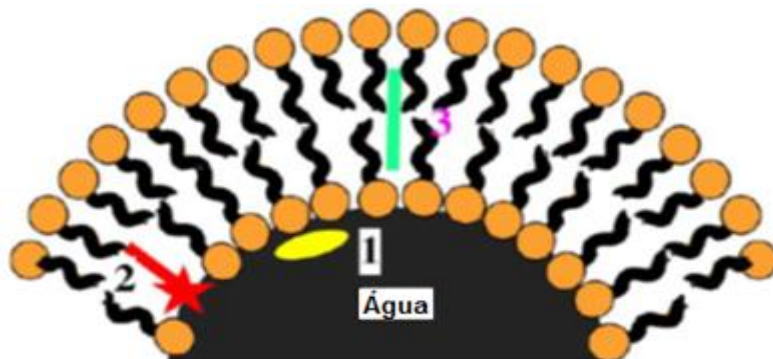


Figura 6. Representação da possível localização de moléculas visitantes dentro da bicamada do monoacilglicerol. 1) molécula hidrofílica; 2) molécula anfifílica; 3) molécula lipofílica.

Fonte: SAGALOWICZ *et al.*, 2006, p. 208.

As moléculas hidrofílicas estarão localizadas perto da cabeça polar do emulsificante, enquanto moléculas lipofílicas estarão localizadas dentro da camada lipofílica e moléculas anfifílicas, na interface. Dessa maneira, moléculas lipofílicas podem ser protegidas da água ou de moléculas hidrofílicas. Além disso, moléculas anfifílicas podem expor apenas certos grupos à água, o que pode acelerar certos caminhos de reação e desacelerar

outros. A introdução de moléculas visitantes geralmente influencia as propriedades da estrutura de agregação (SAGALOWICZ *et al.*, 2006).

Assim, considerando-se a possibilidade de utilizá-los como veículos para moléculas, diversos estudos vêm sendo realizados com foco na síntese de monoacilgliceróis. Na Tabela 2, encontra-se um comparativo das condições reacionais e os rendimentos obtidos com diferentes matérias-primas.

Tabela 2. Rendimentos e condições reacionais relatados na literatura para síntese do monoacilglicerol

Catalisador	Matéria-prima	Condições reacionais	Rendimento MAG (%)	Ref.
E	Ácido esteárico	40 °C 30 min	80	(JR <i>et al.</i> , 2013)
E	Ácido docosahexaenóico	37 °C 15min	98	(MORENO-PEREZ <i>et al.</i> , 2016)
E	Ácido oleico	35 °C 24 h	84	(HUANG <i>et al.</i> , 2013)
E	Etil-docahexaenóico	37 °C 15 min	98	(MORENO-PEREZ <i>et al.</i> , 2017)
E	Óleo de algas	30 °C 3 h	67	(ZHANG <i>et al.</i> , 2017)
E	Óleo de anchova	35 °C 12 h	88 - 92	(HE <i>et al.</i> , 2016)
LI	Óleo de soja	200 °C 3 h	69	(LUO <i>et al.</i> , 2015)
LI – E	Ácidos cáprico, láurico, mirístico palmítico e oleico	60 °C 4 h	48 - 100	(LOZANO <i>et al.</i> , 2017)
BI	Biodiesel metílico	130 °C 10 h	72	(SCHULZ <i>et al.</i> , 2011)

E- Enzimático, LI – Líquido iônico, BI – Básico inorgânico

Como observado na Tabela 2, He *et al.* relataram a síntese de MAGs com alto rendimento via etanólise enzimática, em uma etapa, do óleo de anchova comercial (HE *et al.*, 2016). Os autores relataram que os MAGs com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (n-3PUFAs) podem ser obtidos usando a enzima *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) (HE *et al.*, 2016). Embora os MAGs possam ser obtidos em temperaturas mais baixas com catalisadores enzimáticos, são necessários tempos de reação longos para obter MAGs com alto rendimento. Além disso, as enzimas são mais caras que os catalisadores químicos usuais. Assim, do ponto de vista industrial, a rota enzimática não é economicamente viável. Lozano *et al.*, sugeriram a síntese biocatalítica de MAGs a partir da esterificação direta de ácidos graxos (ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico e oleico) com glicerol, catalisada pela

enzima lipase Novozym 435 em diferentes líquidos iônicos (LIs), como um método alternativo ao processo de glicerólise industrial. Como resultado, foi observada uma alta seletividade de MAGs quando utilizada a combinação enzima/líquido iônico tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazólio (LOZANO *et al.*, 2017). O IL é considerado um solvente verde e um catalisador promissor, apresentando alta estabilidade térmica com possibilidade de recuperação e reuso. No entanto, o IL apresenta alto custo, preparação complexa e alguma toxicidade (LOZANO *et al.*, 2017)

Schulz e colaboradores, obtiveram 72% dos MAGs realizando uma glicerólise simples e direta a partir de ésteres metílicos e glicerol. Os autores realizaram a glicerólise com catalisadores alcalinos, com menores tempos de reação e condições moderadas de temperatura (<150 °C). Além disso, a glicerólise de ésteres alquílicos é geralmente mais rápida do que a glicerólise realizada com TAGs (SCHULZ *et al.*, 2011). Apesar das vantagens relatadas por Shultz *et al.* (2011), na obtenção do MAG pela glicerólise direta de FAMES com glicerol, o metanol é altamente tóxico e não renovável, pois é derivado principalmente de fontes não renováveis, como produtos de refino de petróleo (KAUR; ALI, 2015). Além disso, o uso de metanol na síntese restringe o uso de MAGs nas indústrias de alimentos, já que não são desejados vestígios de metanol em alimentos e outros produtos para consumo humano (GUZATTO *et al.*, 2012). Os benefícios do MAGs para a saúde humana seriam melhor explorados se os MAGs fossem sintetizados a partir de FAEEs e glicerol, conforme mostrado na Figura 7.

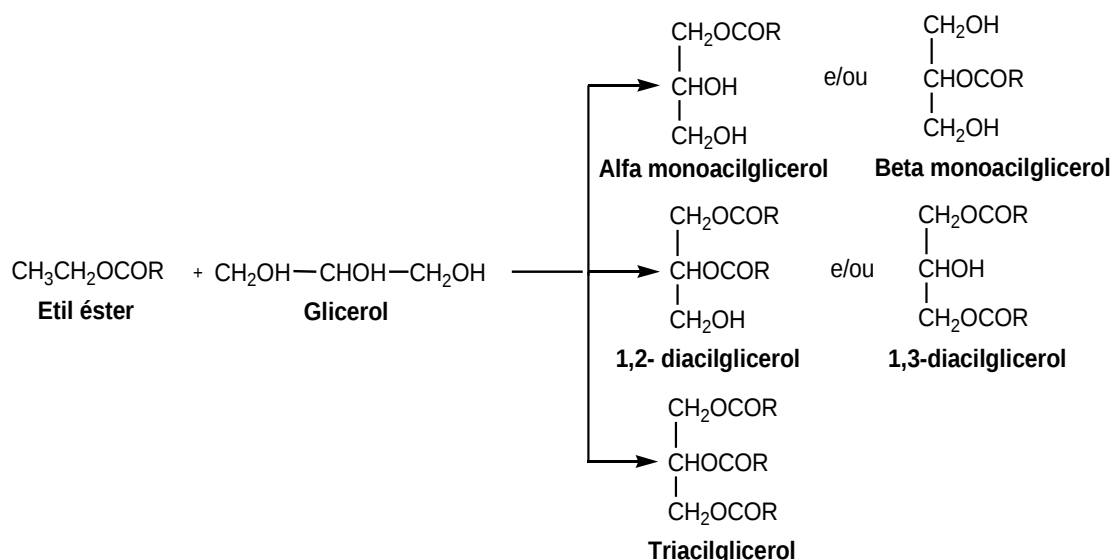


Figura 7. Reação de glicerólise de etil ésteres.

A reação do etil éster com o glicerol pode dar origem ao alfa ou beta – monoacilglicerol, ao 1,2 e 1,3 – diacilglicerol e, a um triacilglicerol.

Como exposto anteriormente, MAGs destacam-se por seu caráter anfifílico, o que possibilitaria a sua aplicação em formulações lipídicas. Segundo Khan et al., as formulações lipídicas podem ser amplamente categorizadas em dois grupos: ELs (emulsões líquidas) e NSLs (nanopartículas sólidas lipídicas). Os sistemas ELs poderiam ser soluções lipídicas, emulsões, microemulsões, sistemas auto-emulsificantes de administração de medicamentos, sistemas auto-micro emulsificantes de administração de drogas emulsificantes ou sistemas micelares. Os sistemas NSLs são novas formulações lipídicas que são constituídas exclusivamente de lipídios biodegradáveis, como triacilglicerols altamente purificados, monoacilglicerols, gorduras duras, misturas complexas de glicerídeos ou mesmo ceras, que são sólidas à temperatura fisiológica (KHAN et al., 2015).

Os carreadores lipídicos apresentam uma formulação promissora com potencial de corrigir problemas, melhorando e normalizando a absorção de drogas (KHAN et al., 2015). Estes sistemas de lipídios são transportadores seguros e biodegradáveis porque são produzidos com ingredientes não tóxicos e não irritantes. Devido à natureza sólida da matriz lipídica no corpo à temperatura ambiente, as nanocápsulas lipídicas apresentam inúmeras vantagens que se manifestam na eficácia melhorada, como permeabilidade

aprimorada, estabilidade química e a capacidade de reduzir a perda de drogas incorporadas. Portanto, a taxa de liberação da droga é controlada e a concentração no local/meio se mantém constante (NICULAE *et al.*, 2014). Assim, destaca-se a relevância da elaboração de nanoestruturas lipídicas carreadoras de fármacos, em especial as nanocápsulas lipídicas, que são nanocarreadores concebidos para encapsular fármacos lipofílicos sem solventes orgânicos (MEHANNA; MOTAWAA; SAMAHA, 2012).

A Figura 8 representa vários sistemas com bases lipídicas, que estão sendo explorados para entrega de medicamentos (POONIA *et al.*, 2016).

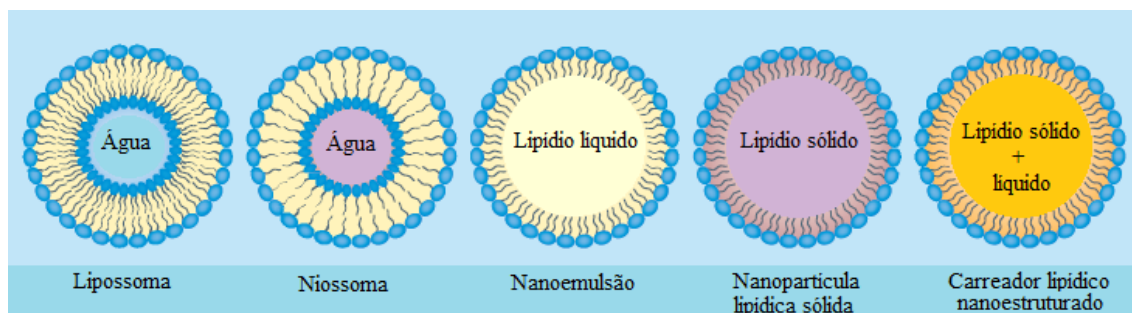


Figura 8. Sistemas baseados em lipídios explorados para entrega de medicamentos.
Fonte: POONIA *et al.*, 2016, p. 136.

Nanoemulsões são dispersões líquido-líquido cineticamente estáveis com tamanhos de gotículas da ordem de 100 nm. Devido a seu pequeno tamanho, possuem propriedades como alta área de superfície por unidade de volume, estabilidade estrutural, aparência opticamente transparente (DASGUPTA; RANJAN; GANDHI, 2018).

As nanoemulsões podem ser preparadas usando métodos de alta e baixa energia. Nos métodos de alta energia, os dispositivos mecânicos fornecem grandes forças disruptivas necessárias para a formação das nanoemulsões. Entre os métodos de alta energia, estão:

- (i) Homogeneização de alta pressão: homogeneizadores de alta pressão geram gotas extremamente pequenas durante o processo, através de forças que atuam em conjunto, tais como cisalhamento hidráulico, turbulência intensa e cavitação (ÇINAR, 2017);
- (ii) Agitação de alto cisalhamento: misturadores de alta energia e sistemas com rotores são usados para a preparação de nanoemulsões (KOROLEVA AND YURTOV, 2012);

- (iii) Emulsificação ultra-sônica: neste método, o campo acústico cria ondas interfaciais que fazem a fase oleosa se dispersar na fase contínua. O ultrassom provoca ainda a cavitação, um efeito que promove o colapso de microbolhas (ÇINAR, 2017);
- (iv) Microfluidização: nesse método, é utilizado um dispositivo chamado microfluidizador. Durante o processo, a alta pressão gerada pelo microfluidizador força a macroemulsão a passar por uma câmara de interação, onde são produzidas nanoemulsões (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

Por outro lado, não há necessidade de uma força externa nos métodos de baixa energia, como por exemplo:

- (i) Nanoemulsificação espontânea: neste método, que ocorre à temperatura ambiente, há a liberação de energia química baseada no processo de diluição com a fase contínua, sem transições de fase no sistema durante o processo de emulsificação (SOLANS; SOLÉ, 2012);
- (ii) Temperatura de inversão de fase: neste método, a temperatura é alterada e a composição é constante. A emulsificação é alcançada modificando as afinidades dos surfactantes por água e óleo em função da temperatura (LOVELYN; ATTAMA, 2011);
- (iii) Inversão de composição de fase: neste método, a composição é alterada à temperatura constante. As nanoemulsões são obtidas pela adição consistente de água ou óleo à mistura de óleo-surfactante ou água-surfactante (SOLANS; SOLÉ, 2012).

Atualmente, os métodos de baixa energia têm atraído considerável atenção, pois não são destrutivos e não causam danos às moléculas encapsuladas (ÇINAR, 2017).

Vários fatores físicos podem afetar ou perturbar a estabilidade das gotículas de emulsão e afetam suas características para uso como transportadoras de ingredientes funcionais (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012). Os problemas associados às nanoemulsões são: floculação, cremação, separação de fases, sedimentação, inversão de fases, amadurecimento de Ostwald (ALI *et al.*, 2017). Portanto, a estabilização de emulsões é muito importante, e a maneira mais comum de estabilizar emulsões é por adsorção de surfactantes (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012), junto

com co-surfactantes (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014). Estes componentes atuam na interface entre as gotículas e o meio de dispersão, reduzindo a tensão interfacial (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

Surfactantes são moléculas compostas por duas partes, uma região com característica polar e uma região com característica não polar (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014), ou seja, são moléculas anfifílicas que podem estabilizar as nanoemulsões, diminuindo a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis e torná-los miscíveis, impedindo assim a coalescência de gotículas. Essas moléculas tendem a adsorver-se rapidamente na interface água-óleo e promover uma estabilização estérica, eletrostática ou dupla eletro-estérica das emulsões (SINGH *et al.*, 2017). Os surfactantes são classificados de acordo com a natureza do grupo polar da molécula em: surfactantes aniônicos, que apresentam carga negativa na região polar; catiônicos, que apresentam carga positiva na região polar; não iônicos, que não apresentam cargas; zwitteriônicos, que contém dois grupos polares com cargas opostas ao mesmo tempo na molécula; e anfóteros, que se comportam como aniônicos ou catiônicos dependendo do pH do meio (DALTIM, 2011).

O equilíbrio entre as fases aquosa e oleosa, também conhecido como equilíbrio hidrófilo-lipófilo (HLB), e o parâmetro crítico de empacotamento (CPP) devem ser levados em consideração na seleção do surfactante para a formulação de nanoemulsões. Surfactantes com baixo HLB (3-6) podem ser usados para preparar nanoemulsões do tipo água em óleo. Alguns exemplos são: Capriol 90 (propileno glicol monocaprilato) (HLB = 6), span 60 (HLB = 4,7), 80 (HLB = 4,3) e 85 (HLB = 1,8), enquanto surfactantes com HLB alto (8-18) são usados para preparar nanoemulsões do tipo óleo em água. Alguns exemplos são: span 20 (HLB = 8,6), Tween 20 (HLB = 16,7) e 80 (HLB = 15), poloxamer 407 (HLB = 18) e 188 (HLB = 29) (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014).

Em muitas situações, apenas um surfactante pode não ser capaz de reduzir a tensão interfacial óleo/água suficientemente para preparar uma nanoemulsão, surge então, a necessidade de se utilizar os co-surfactantes. Estes também são de natureza anfifílica, com tendência a particionar em grande quantidade na monocamada interfacial do surfactante, reduzindo a tensão interfacial, aumentando a fluidez da interface e a entropia do sistema. O

HLB do sistema pode ser modificado pela seleção adequada de surfactantes e co-surfactantes. Alguns exemplos de co-surfactantes são: lecitina, etanol, propanol e butanol (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014).

O tamanho menor das gotículas corresponde a uma maior estabilidade contra a separação gravitacional, agregação e também determina a aparência da dispersão coloidal. Pequenos tamanhos de gotículas tendem a ser transparentes ou translúcidas, o que é vantajoso para a incorporação de produtos transparentes. Gotículas com tamanho menor que 50 nm são transparentes, de 50 a 100 nm são translúcidas, de 100 a 1000 nm são translúcidas azuladas e gotículas maiores que 1000 nm são opacas (JINTAPATTANAKIT, 2018).

Assim, considerando-se a importância das nanoestruturas, diversos estudos vêm sendo realizados com foco no preparo de nanoemulsões. Saberi e colaboradores estudaram as condições de preparo, por emulsificação espontânea, de vitamina E encapsulada em nanoemulsões de triacilglicerols de cadeia média. O melhor resultado de diâmetro médio de gotículas ($d < 50$ nm), foi atingido com composição de vitamina E e triacilglicerols de cadeia média de 8% e 2%, respectivamente, com o surfactante Tween 80 a 10% em peso. (SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013).

Diversos estudos também foram realizados inserindo um co-surfactante, um exemplo é o trabalho realizado por Kheawfu e colaboradores que desenvolveram uma nanoemulsão de óleo de cravo e um sistema de auto-microemulsificação de óleo de cravo com etanol para aumentar a miscibilidade aquosa de óleo de cravo para uso em anestesia de peixes. As gotículas das nanoemulsões contendo entre 10 e 20% de óleo de cravo e entre 5 e 15% de Tween 20 atingiram tamanhos entre 23 e 133 nm. Por outro lado, os sistemas de auto-microemulsificação compostos por 10% de óleo de cravo e 90% de Tween 20; ou 10% de óleo de cravo, 60% de Tween 20 e 30% de álcool (etanol ou isopropanol) tiveram tamanhos de partícula entre 11 e 44 nm. Estes sistemas se mantiveram estáveis por 90 dias, a 4 °C (KHEAWFU *et al.*, 2018).

Outro exemplo é o trabalho realizado por Zeng e colaboradores, que estudaram a formação e a estabilidade de nanoemulsões com uso de álcoois de cadeia curta ($C < 5$) como co-surfactantes, preparadas pelo método de emulsificação espontânea. Os autores observaram que o melhor resultado foi

obtido com uma proporção de Cremophor EL:1-butanol de 2:1. Nesta proporção, foram obtidas nanoemulsões com gotículas de raio menor que 100 nm e índice de polidispersão menor que 0,2. Foi observado ainda um aumento no tamanho das gotículas quando a concentração de álcoois foi aumentada, o que é atribuído à floculação das gotículas (ZENG; ZHANG, 2016).

Diversos autores têm estudado o encapsulamento de substâncias ativas ou fármacos, um exemplo é o trabalho realizado por Kelmann e colaboradores, que desenvolveram uma nanoemulsão para entrega intravenosa da carbamazepina (CBZ), um medicamento anticonvulsivante amplamente utilizado e pouco solúvel, sem tratamento parenteral disponível. O método de emulsificação espontânea foi utilizado para preparar diferentes formulações contendo 2 mg/mL de CBZ. Da mesma forma, um delineamento experimental fatorial completo foi aplicado para estudar a influência de duas variáveis (tipo de óleo e tipo de emulsificante lipofílico) nas características físico-químicas da emulsão. A formulação que apresentou as melhores características necessárias para administração intravenosa foi selecionada e caracterizada, apresentando tamanho da gota em torno de 150 nm, conteúdo de droga em torno de 95% e potencial zeta em torno de -40mV. Essa formulação manteve suas propriedades em uma faixa satisfatória durante o período avaliado (3 meses) (KELMANN *et al.*, 2007).

Shakeel e colaboradores otimizaram o preparo de nanoemulsões do fármaco celecoxibe (CXB) pelo método de baixa energia. Estudos de estabilidade foram realizados durante o período de 3 meses, sendo que parâmetros como o tamanho da gota, a viscosidade e o índice de refração (IR) foram determinados durante o armazenamento. Foi observado também que a degradação do CXB após 3 meses de armazenamento foi muito baixa. Os resultados indicaram que a estabilidade do CXB pode ser melhorada usando Tween 80 como surfactante (SHAKEEL *et al.*, 2008).

Ghosh e colaboradores testaram a formulação óleo-em-água usando óleo de gergelim, surfactante não iônico (Tween 20/Tween 80) e água pelo método de cavitação por ultrassom. O desenvolvimento da nanoemulsão foi otimizado para parâmetros do processo, como o tipo de surfactante, a concentração de surfactante e o tempo de emulsificação, para se obter um menor diâmetro de gota e uma maior estabilidade. O aumento da concentração

de surfactante e o tempo de emulsificação resultaram em uma nanoemulsão com diâmetro minimizado de gotículas. O Tween 80 foi mais eficaz na redução do tamanho da gota quando comparado ao Tween 20. O melhor resultado obtido foi com o uso do Tween 80 para uma proporção de óleo:surfactante de 1:3, ao qual foi encapsulado o eugenol. Nesta formulação, foram obtidas gotas com um diâmetro de 13 nm e estabilidade maior que 1 mês. A nanoemulsão carregada com eugenol, misturada com óleo de gergelim, demonstrou menor tamanho de gota e maior estabilidade do que a nanoemulsão contendo apenas eugenol (sem óleo de gergelim). A nanoemulsão carregada com Eugenol exibiu atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e também demonstrou uma redução significativa na população de bactérias heterotróficas no suco de laranja (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014).

Taghavi e colaboradores investigaram os efeitos de diferentes condições de microfluidização na atividade antibacteriana e propriedades físico-químicas da nanoemulsão contendo a mistura de citral, trans-2-hexen-1-ol e linalol (1:1:1, 1% p/p). Foi observada uma maior atividade inibitória nas nanoemulsões com as nano-gotículas do que com a mistura não emulsificada. Presumivelmente, pode ser devido ao fato de que as pequenas gotículas lipídicas, com grande superfície-volume induzida pelo microfluidizador, facilitaria o movimento e a penetração do composto alvo nas bactérias, enquanto a mistura não emulsionada não poderia acessar facilmente as bactérias devido a sua natureza hidrofóbica (TAGHAVI *et al.*, 2018).

A otimização múltipla mostrou que a microfluidização a uma pressão de 1350 bar por 3 ciclos resultou no melhor efeito antibacteriano. Este estudo revelou que a emulsificação de um composto antibacteriano hidrofóbico, natural, via microfluidização pode ser um sistema eficaz para melhorar sua atividade inibitória e algumas outras propriedades físico-químicas e funcionais do composto (TAGHAVI *et al.*, 2018).

Souza e colaboradores investigaram a atividade antifúngica *in vitro*, a produção de exoenzimas e a citotoxicidade dos ácidos graxos alifáticos caprílico, cáprico, láurico, mirístico e de seus ésteres etílicos e metílicos contra a espécie de *Candida*. Foi observado que em relação a CIM (concentração inibitória mínima) contra *Candida*, o ácido graxo com melhor resultado foi o ácido láurico, embora seu éster derivado não ter apresentado atividade

antifúngica. Os ácidos graxos apresentaram potenciais efeitos enzimáticos inibitórios em *C. albicans*, bem como baixa citotoxicidade quando usado em concentrações sub-antifúngicas (SOUZA *et al.*, 2014).

Baseado no que foi exposto, este trabalho será apresentado em três etapas. Primeiramente, na etapa 1, será apresentada a otimização da síntese de MAG a partir da reação de glicerólise de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE), obtidos por sua vez, pelas reações de transesterificação de óleo de linhaça e etanol. Posteriormente, na etapa 2, será apresentada a otimização de formulações nanoestruturadas a partir do monoacilglicerol obtido na etapa anterior, pelo método de baixa energia de inversão da composição. Por último, na etapa 3, baseado no estudo de Souza e colaboradores, que sugere que os ácidos graxos possam ser estudados para atividades antibacterianas, embora não terem sido testados em nanoemulsões, buscou-se a aplicação do monoacilglicerol como agente encapsulante em nanoemulsão, no encapsulamento dos ácidos graxos com atividade biológica em testes com bactérias multirresistentes.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

Sintetizar monoacilgliceróis através da glicerólise de ésteres etílicos e preparar formulações nanoestruturadas lipídicas, provenientes do monoacilglicerol para aplicação na área biotecnológica.

3.1.1. Objetivos Específicos:

- Produzir ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) a partir da transesterificação do óleo de linhaça com álcool etílico;
- Otimizar a síntese do monoacilglicerol através da glicerólise de ésteres etílicos com glicerol, utilizando como catalisador NaOH;
- Caracterizar o biodiesel e o monoacilglicerol obtidos, através de técnicas espectroscópicas, cromatográficas e térmicas.
- Preparar formulações nanoestruturadas lipídicas a partir do monoacilglicerol;
- Encapsular ácidos graxos nas formulações nanoestruturadas;
- Caracterizar as formulações nanoestruturadas e os ácidos graxos encapsulados nestas formulações quanto ao tamanho de gotícula e estabilidade;
- Avaliar a formulação nanoestruturada com composto ativo como agente antibacteriano.

Parte 1

4. Parte 1: Otimização da síntese de MAG a partir da reação de glicerólise de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE)

4.1. Reagentes e Métodos:

4.1.1. Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados para a síntese dos ésteres etílicos (biodiesel), dos monoacilgliceróis e no preparo das amostras foram: óleo de linhaça (Mundo dos óleos), glicerina P.A. (Synth), hidróxido de potássio P.A. (Synth), cloreto de sódio P.A. (Synth), sulfato de sódio anidro P.A. (Synth), hidróxido de sódio 97 % (Vetec), *n*-heptano P.A. (Vetec), álcool etílico anidro P.A. (Dinâmica), ácido sulfúrico P.A. (Dinâmica), acetona deuterada (Scielab), clorofórmio deuterado 99,8 %D (Scielab). Os padrões utilizados para análises cromatográficas foram: 1,2,3-tridecanoilglicerol (padrão interno-tricaprina) 8000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em piridina (Supelco), 1-mono[cis-9-octadecenoil]glicerol (padrão-monoleína) 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em piridina (Supelco), 1,3-di[cis-octadecenoil]glicerol (padrão-dioleína) 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em piridina (Supelco), 1,2,3-tri[cis-octadecenoil]glicerol (padrão-trioleína) 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em piridina (Supelco) e o derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoracetamida - (MSTFA) (Sigma-Aldrich).

4.1.2. Métodos

4.1.2.1. Reação de Transesterificação: Síntese de biodiesel a partir do óleo de linhaça

A obtenção dos ésteres etílicos do óleo de linhaça foi realizada em duas etapas, pelo método TDSP. A metodologia foi adaptada de Guzzatto e colaboradores (GUZZATTO *et al.*, 2012). A primeira etapa foi realizada em meio básico usando o catalisador KOH, seguida por catálise ácida com H_2SO_4 .

Inicialmente, em um balão de 500 mL acoplado a um sistema com dispositivo de refluxo, foram adicionados 120 mL de álcool etílico, aquecido a uma temperatura de 65°C, e 2,0 g de hidróxido de potássio, sob agitação magnética. A mistura foi agitada até o hidróxido de potássio estar completamente dissolvido, permitindo a formação da espécie ativa do

catalisador básico. A agitação foi mantida e 100 mL de óleo de linhaça foram adicionados ao balão. O sistema permaneceu nessas condições por 30 min. A razão molar álcool/óleo/catalisador foi de 20:1:0,35. Na segunda etapa da síntese, 4 mL de ácido sulfúrico (P.A. 18,77 mol.L⁻¹) foram adicionados gota a gota à mistura reacional, seguido por aquecimento suave até 80°C, quando foi adicionado um excesso de 60 mL de álcool etílico. Após a estabilização da temperatura, o sistema permaneceu nessas condições por 2 h e 30 min. A Figura 9 mostra a imagem do sistema da reação.

O produto foi filtrado para remover o resíduo sólido (K₂SO₄). A fase líquida foi concentrada usando um evaporador rotativo para remover o excesso de álcool etílico e esse procedimento específico promoveu uma separação rápida e eficiente em duas fases líquidas. Os ésteres etílicos (biodiesel) estavam na fase superior, assim como alguns traços de óleo de linhaça que não reagiu, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e uma pequena quantidade de etanol. O glicerol formado durante a reação de transesterificação permaneceu na fase inferior (Figura 10). Após a separação de fases, o biodiesel foi lavado com solução de NaCl (5%), separado da fração aquosa, seco com Na₂SO₄ anidro e submetido ao procedimento de filtragem. Obteve-se aproximadamente 87 mL do produto.



Figura 9. Imagem do sistema de refluxo para a síntese do biodiesel.



Figura 10. Imagem do biodiesel formado, na fase superior.

4.1.2.2. Reação de Glicerólise: Síntese de acilgliceróis

As reações de glicerólise foram realizadas variando o tempo de reação de 6 à 12 h e a temperatura de 100 à 150°C. A razão molar de biodiesel/glicerol/catalisador foi de 1:5:0,38. O excesso de glicerol foi adicionado para deslocar o equilíbrio para uma maior produção de MAGs.

Inicialmente, 30 g de biodiesel, 46 g de glicerol e 1,5 g de NaOH foram introduzidos em um reator simples sob agitação magnética e a mistura foi agitada constantemente. A glicerólise foi realizada sob refluxo ou em sistema aberto com tempo e temperatura variáveis. O produto obtido, um líquido viscoso de coloração marron clara, que foi lavado com solução de NaCl (5%) e aquecido a 70°C. O aquecimento favoreceu a solubilização do glicerol na solução aquosa. O produto foi subsequentemente resfriado em um banho de gelo para facilitar a remoção da fase aquosa contendo glicerol. Este processo de lavagem com aquecimento e arrefecimento foi realizado várias vezes, conforme a Figura 11. Após, o produto foi seco por aquecimento a 100°C e obteve-se aproximadamente 20 g do produto. A Figura 12 mostra a aparência do MAG obtido.



Figura 11. Imagem do resíduo das lavagens na purificação do monoacilglicerol.



Figura 12. Imagem do produto monoacilglicerol.

4.2. Instrumentação para Caracterização

Para a caracterização do biodiesel e do monoacilglicerol foram utilizadas técnicas como: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-FID), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR) e análise termogravimétrica (TGA).

4.2.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetro Bruker que opera na frequência de 400 MHz. As amostras de óleo de linhaça e biodiesel foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o produto da glicerólise foi dissolvido em acetona deuterada (CD_3COCD_3). Os deslocamentos químicos estão mostrados em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS).

4.2.2. Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-FID)

Os produtos da reação de transesterificação foram analisados em um cromatógrafo Shimadzu GC-2010 equipado com um detector de ionização de chama (FID). A análise das amostras foi realizada utilizando a técnica padrão ASTM 6584, utilizada para determinar teor de monoacilglicerol, diacilglicerol e triacilglicerol em ésteres metílicos de ácidos graxos, porém, adaptada para quantificar a conversão de ésteres etílicos em produtos de reação, o rendimento. Uma coluna SGE-HT5 de 15 m x 0,32 mm x 0,1 μ m foi usada para a determinação dos FAEs. As condições cromatográficas foram: temperatura do detector: 380°C; temperatura do injetor: 50°C; transportador de gás: nitrogênio; velocidade linear do gás: 12 cm.s⁻¹; tempo total de corrida: 40 min; programa de temperatura do forno: 50°C por 1 min, 15°C.min⁻¹ até 180°C, 7°C.min⁻¹ até 230°C e 10°C.min⁻¹ até 370°C, permanecendo isotérmico por 10 min.

A análise quantitativa dos produtos de glicerólise foi realizada utilizando-se 3 soluções: uma solução padrão, a solução 3 da técnica ASTM 6584, contendo tricaprina, monoleína, dioleína e trioleína, usada para determinar o tempo de retenção e calcular o fator de resposta em relação ao padrão interno, uma solução contendo o biodiesel usado na reação e uma solução contendo os produtos da reação de glicerólise. De acordo com a técnica padrão ASTM 6584, em todas as soluções foi utilizado heptano como solvente. Alíquotas de 1 μ L dessas soluções foram injetadas no equipamento. Os componentes foram separados em coluna capilar Forte SGE-HT5 (25 m x 0,32 mm x 0,1 μ m). As condições cromatográficas foram: programação de temperatura da coluna, isotérmico 50°C por 1 min a 15°C.min⁻¹ aumentando até a temperatura de 180°C a 7°C.min⁻¹, até 230°C a 10°C.min⁻¹ até 370°C permanecendo por 10 min. O tempo total de corrida foi de 40 minutos, a temperatura do injetor (PTV) foi de 50°C e a temperatura do detector foi de 380°C, o gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com velocidade linear de gás de 12 cm.s⁻¹.

4.2.3. Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu (IRAffnity-1, Kyoto, Japão) acoplado a um acessório de refletância total atenuada (ATR) (Pike Tech, Madison, WI). As amostras foram colocadas sobre o cristal de seleneto de zinco (ZnSe) e as análises foram realizadas na faixa de 4000 a 700 cm^{-1} , co-adicionando 32 varreduras e com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

4.2.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das amostras foi obtida usando um analisador termogravimétrico Shimadzu (modelo DTG-60, Kyoto, Japão). As amostras (4-6 mg) foram aquecidas entre 25 e 650°C a uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e um fluxo de gás nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.

4.3. Resultados e discussões

A seguir serão apresentados e discutidos de forma sistemática os resultados obtidos. Será discutida a metodologia empregada na obtenção dos ésteres etílicos (biodiesel) e do monoacilglicerol, os resultados obtidos na otimização reacional durante a síntese e a caracterização dos mesmos.

Diferentes análises foram realizadas para caracterizar o biodiesel sintetizado a partir de óleo de linhaça e o monoacilglicerol. A conversão do óleo em biodiesel foi avaliada usando RMN ¹H e a conversão do biodiesel em MAG foi avaliada usando RMN ¹H e CG-FID. A estrutura química do MAG foi identificada por RMN ¹H e por FTIR. A estabilidade térmica do biodiesel e do MAG foi avaliada por TGA.

4.3.1. Processo de transesterificação

As reações de transesterificação do óleo de linhaça foram realizadas pela metodologia TDSP e na presença do reagente verde etanol.

O esquema da reação de transesterificação é mostrado na Figura 13.



Figura 13. Esquema da reação de transesterificação.

A razão molar álcool/óleo é um dos fatores mais significativos, afetando a eficiência de conversão e o rendimento do biodiesel. De acordo com a estequiometria da reação, a razão molar álcool/óleo é de 3:1. Considerando-se que a reação é reversível, são necessárias razões molares mais altas para aumentar a miscibilidade e conseqüentemente, aumentar o contato entre as moléculas de álcool e do triacilglicerol. Portanto, um excesso de etanol deve ser adicionado para deslocar o equilíbrio termodinâmico em direção à formação de biodiesel.

A Figura 14 mostra o espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça utilizado junto ao etanol na reação de transesterificação para obtenção do biodiesel etílico.

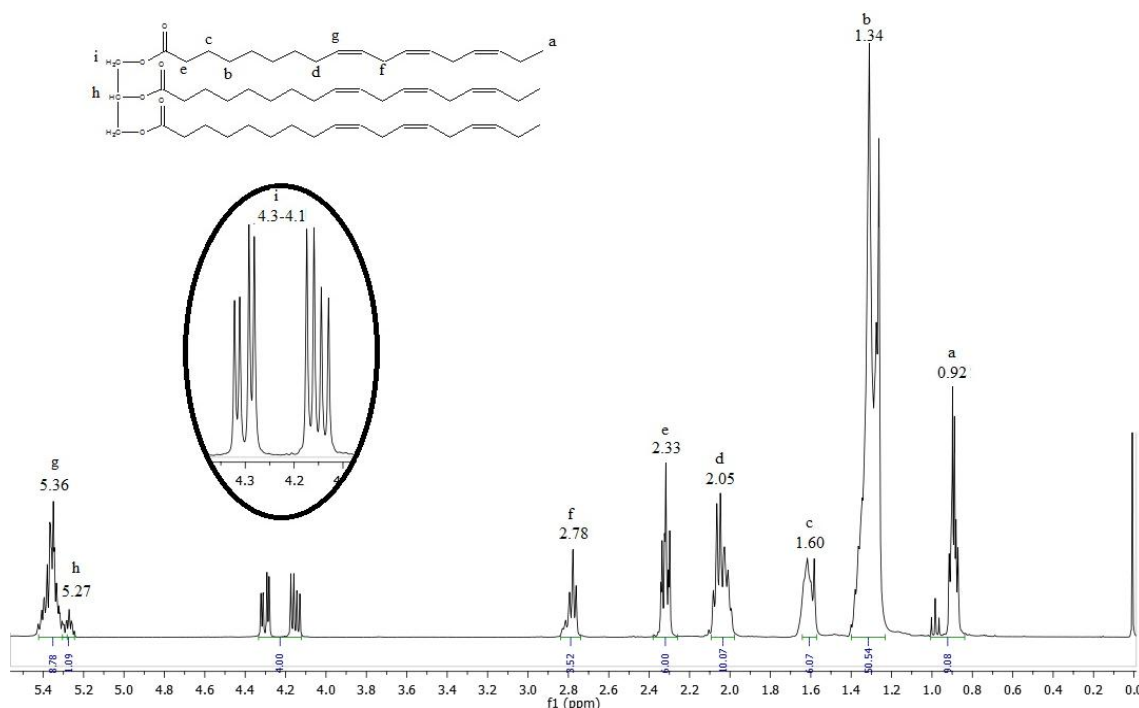


Figura 14. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do óleo de linhaça.

O espectro do óleo de linhaça é apresentado na Figura 14 para enfatizar as regiões de deslocamento químico de interesse. O pico mais blindado observado em 0,92 ppm (pico *a*) é característico dos átomos de hidrogênio dos grupos metil terminais nas cadeias de ácidos graxos, conforme indicado na estrutura química do óleo de linhaça inserida na Figura 14. Os sinais observados entre 2,78 e 1,34 ppm (pico *f* a *b*) são atribuídos aos átomos de hidrogênio de grupos metileno internos nas cadeias de ácidos graxos. Os átomos de hidrogênio olefínicos presentes nas cadeias insaturadas dos ácidos graxos podem ser observados em uma região de campo baixo, em 5,36 ppm (pico *g*). Os sinais destacados, localizados entre 4,1 e 4,3 ppm (pico *i*), são característicos dos átomos de hidrogênio externos do fragmento de glicerol. O átomo de hidrogênio interno do fragmento de glicerol é observado em 5,27 ppm (pico *h*). Os deslocamentos estão de acordo com a literatura (GUZZATTO *et al.*, 2012).

A Figura 15 mostra o espectro de RMN ^1H referente ao biodiesel etílico obtido na reação de transesterificação.

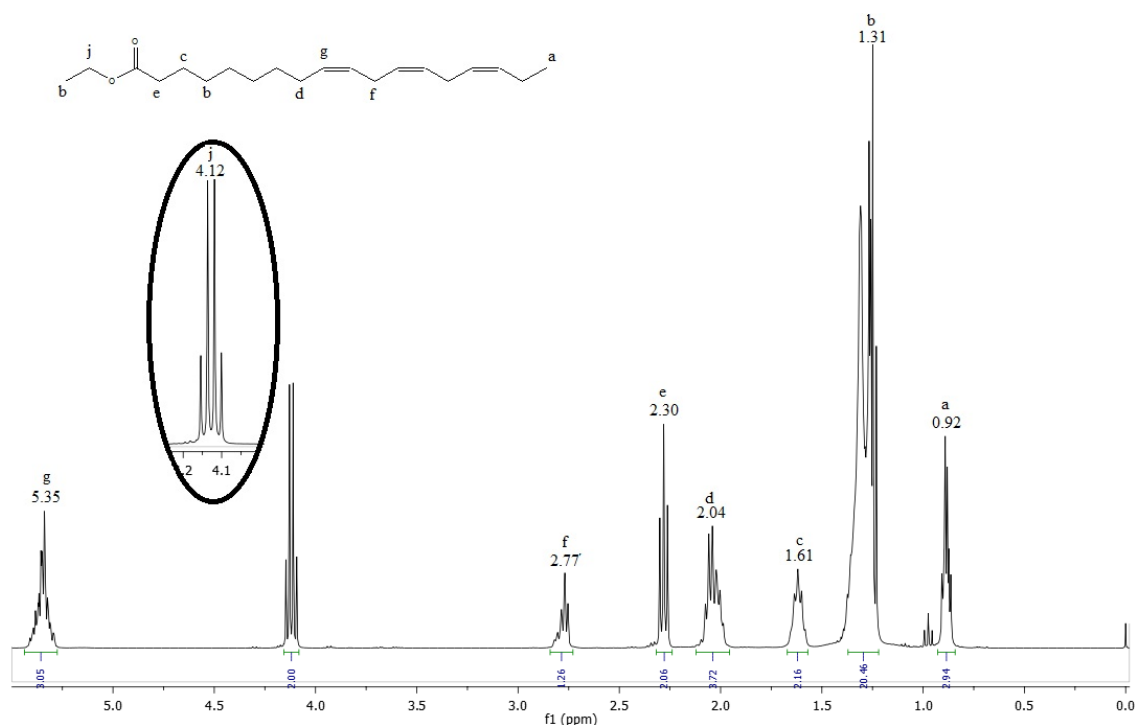


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do biodiesel.

Muitos sinais no espectro do biodiesel são semelhantes aos observados no espectro do óleo de linhaça. No entanto, o fragmento glicerídico foi removido durante a reação de transesterificação e substituído por um fragmento de éster etílico. Então, a ausência dos picos *h* e *i* no espectro da Figura 15 indica que o óleo de linhaça foi completamente convertido em biodiesel. Os átomos de hidrogênio do grupo metileno do éster etílico, destacados na Figura 15, podem ser observados como um quarteto em 4,12 ppm (pico *j*). De acordo com Guzatto e colaboradores os átomos de hidrogênio do grupo metil do éster etílico são observados em 1,2 ppm e estão sobrepostos por outros sinais (pico *b*) (GUZATTO *et al.*, 2012).

Para obter a conversão em ésteres etílicos (C_{EE}) foi utilizada uma metodologia confiável que é baseada na integração de alguns picos do espectro de RMN ^1H do biodiesel. Na Figura 15, o pico em 4,12 ppm foi usado para calcular o teor de éster etílico. O pico em 2,30 ppm foi escolhido para representar todos os possíveis derivados de óleo de linhaça e todas as outras espécies que foram formadas durante as reações de transesterificação. Os cálculos foram realizados de acordo com a equação (1) (GELBARD *et al.*, 1995) (KENAR, 2004) (KNOTHE; KENAR, 2004) (MORGENSTERN *et al.*, 2006) (TARIQ *et al.*, 2011):

$$C_{EE} = \frac{I_{EE-CH_2/2}}{I_{\alpha-CH_2/2}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$C_{EE} = \frac{2,00/2}{2,06/2} \cdot 100$$

$$C_{EE} = 96,6\%$$

Em que,

I_{EE-CH_2} = valor de integração do pico j , que corresponde aos átomos de hidrogênio do metileno do éster etílico.

$I_{\alpha-CH_2}$ = o valor de integração do pico atribuído aos átomos de hidrogênio do metileno adjacente ao grupo carbonila.

Na equação (1), o fator 2 que divide os dois valores de integração é o fator de normalização, porque cada integral corresponde a dois átomos de hidrogênio. Assim, a reação de transesterificação realizada neste trabalho produziu aproximadamente 97% de biodiesel a partir do óleo de linhaça. A presente conversão foi semelhante aos 98% obtidos por Guzzato e colaboradores (GUZZATTO *et al.*, 2012), e superior aos 85% obtidos por Schulz e colaboradores (SCHULZ *et al.*, 2011), o que é considerado uma alta eficiência de conversão utilizando um reagente não tóxico.

4.3.2. Processo de glicerólise

No presente trabalho, as reações de glicerólise dos ésteres etílicos foram realizadas em meio básico a diferentes temperaturas e tempos de reação.

O esquema da reação de glicerólise é mostrado na Figura 16.

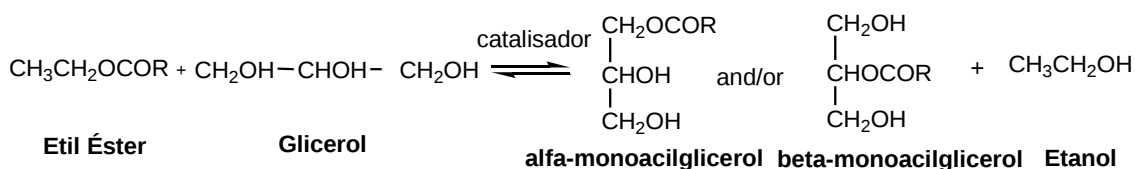


Figura 16. Esquema da reação de glicerólise de etil ésteres.

A glicerólise é uma reação reversível e um excesso de glicerol deve ser adicionado para alterar o equilíbrio termodinâmico em direção à formação do MAG. Neste trabalho, foram realizadas reações com razão molar biodiesel/glicerol de 1:5, uma vez que Schulz e colaboradores relataram que é a razão molar mais eficiente.

A Figura 16 mostra que o subproduto da reação da glicerólise é o etanol, outra vantagem sobre o trabalho de Schulz et al. (2011), no qual o subproduto da reação é o metanol, reduzindo assim o impacto ambiental com um resíduo menos tóxico gerado durante a síntese.

As análises por CG-FID foram usadas para quantificar os produtos de glicerólise, de acordo com o método ASTM D6584. Os cromatogramas do biodiesel antes da conversão, o produto da glicerólise e a mistura de padrões internos e externos foram utilizados para avaliar a conversão do biodiesel e o respectivo rendimento de acilgliceróis.

Para quantificar os produtos da reação de glicerólise, o fator de resposta (rF) de cada espécie envolvida deve ser considerado. A conversão de massa do biodiesel (C_{BD}) pode ser obtida a partir das áreas dos picos dos ésteres etílicos no cromatograma do biodiesel antes da conversão e das áreas dos picos dos ésteres etílicos presentes nos produtos da reação de glicerólise, de acordo com a equação (2)

$$C_{BD} = 1 - \frac{\sum AEE_{Product}}{\sum AEE_{Biodiesel}} \cdot 100 \quad (2)$$

Em que,

C_{BD} = conversão dos ésteres etílicos (biodiesel), expresso em percentual.

$\sum AEE_{produto}$ = somatório das áreas dos picos dos ésteres etílicos presentes no produto da reação.

$\sum AEE_{biodiesel}$ = somatório das áreas dos picos dos ésteres etílicos presentes no biodiesel.

O rendimento de acilgliceróis (%) foi expresso em relação ao C_{BD} . O rendimento de mono-, di- e triacilglicerol (%) (Y_{MG} , Y_{DG} , and Y_{TG} , respectivamente) foi calculado de acordo com as equações (3-5):

$$Y_{MG}(\%) = \frac{C_{BD} \times \sum A_{MG} / r_{F_{MG}}}{[(\sum A_{MG} / r_{F_{MG}}) + (\sum A_{DG} / r_{F_{DG}}) + (\sum A_{TG} / r_{F_{TG}})]} \quad (3)$$

$$Y_{DG}(\%) = \frac{C_{BD} \times \sum A_{DG} / r_{F_{DG}}}{[(\sum A_{MG} / r_{F_{MG}}) + (\sum A_{DG} / r_{F_{DG}}) + (\sum A_{TG} / r_{F_{TG}})]} \quad (4)$$

$$Y_{TG}(\%) = \frac{C_{BD} \times \sum A_{TG} / r_{F_{TG}}}{[(\sum A_{MG} / r_{F_{MG}}) + (\sum A_{DG} / r_{F_{DG}}) + (\sum A_{TG} / r_{F_{TG}})]} \quad (5)$$

Em que,

A_{MG} , A_{DG} , A_{TG} = áreas dos picos do mono-, di- e triacilglicerol, respectivamente

$r_{F_{MG}}$, $r_{F_{DG}}$, $r_{F_{TG}}$ = fatores de resposta do mono-, di- e triacilglicerol, respectivamente

A Figura 17 mostra os três cromatogramas usados para quantificar a conversão do biodiesel e o rendimento do produto da glicerólise.

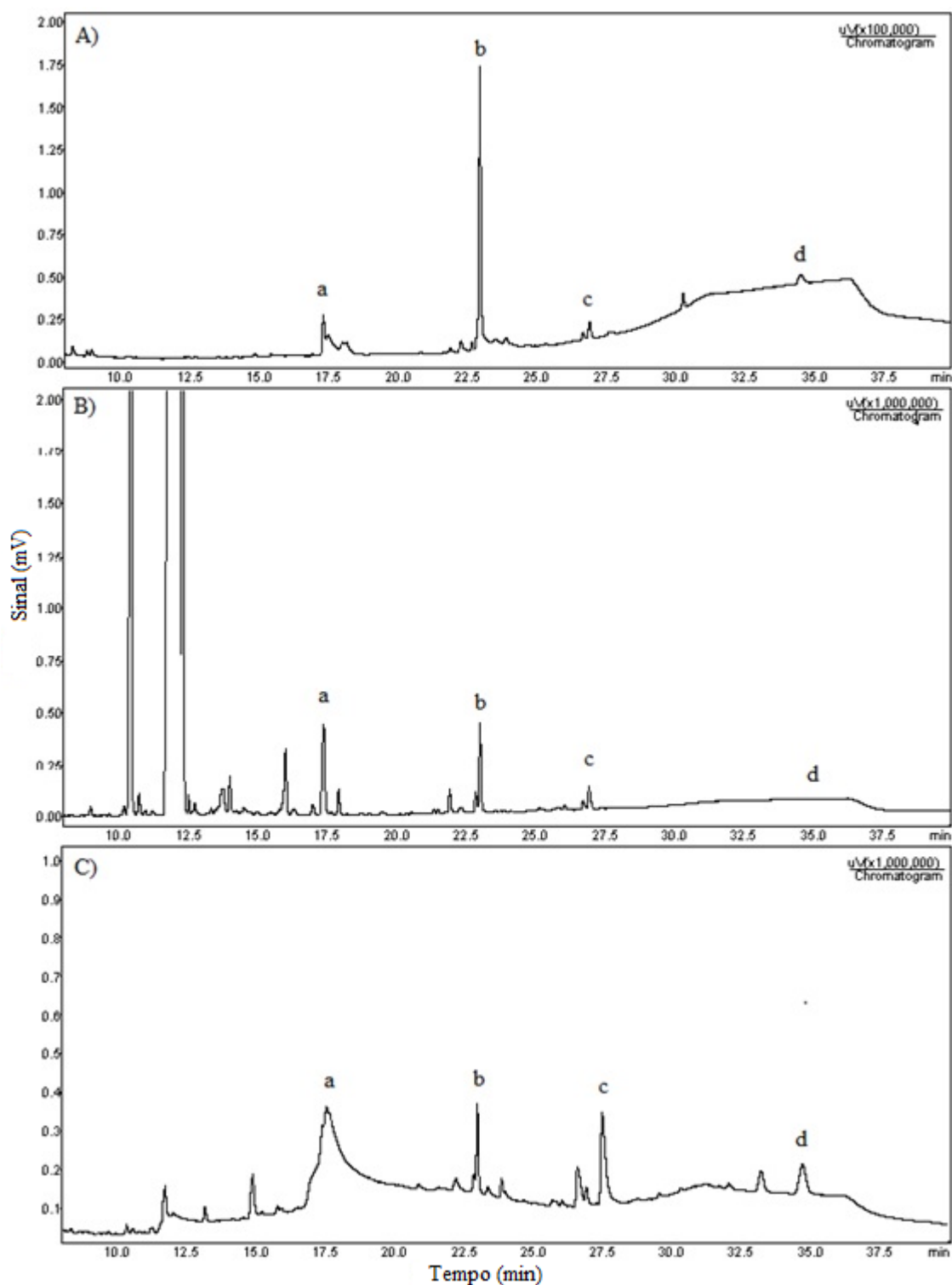


Figura 17. Cromatogramas de: A - mistura de padrões externos e interno: monoleína (a), tricaprina (b), dioleína (c) e trioleína (d); B - biodiesel puro antes da reação de glicerólise; C - produtos da glicerólise.

No cromatograma A da Figura 17, referente a mistura dos padrões interno e externos, onde (a) é o padrão monoleína, usado para quantificar os monoacilgliceróis, (b) é o padrão tricaprina, usado como padrão interno, (c) é o

padrão dioleína, usado para quantificar os diacilgliceróis e (d) é o padrão trioleína, usado para quantificar os triacilgliceróis.

No cromatograma B, referente ao biodiesel antes da reação, pode ser observado que os ésteres etílicos eluíram entre 10 e 16 min de tempo de retenção.

O cromatograma C, referente ao produto da glicerólise obtido no teste utilizando NaOH a 5%, biodiesel/glicerol 1:5, temperatura de 130°C e 12 horas, onde o monoacilgliceróis podem ser observados no mesmo tempo de retenção da monoleína, em torno de 17 min, a dioleína (c) aparece após 27 min e a trioleína (d) é detectada no cromatograma após 35 min. Todos os três cromatogramas incluem tricaprina padrão interno (b) na mesma concentração.

Para melhorar o desempenho na conversão de biodiesel em MAG, os efeitos da temperatura e do tempo de reação foram estudados nas reações de glicerólise.

Tabela 3. Valores de conversão de biodiesel (C_{BD}) e rendimentos em acilgliceróis obtidos de acordo com os parâmetros utilizados na reação de glicerólise.

Teste	Tempo (h)	Temp (°C)	C_{BD} (%) ^a	MAG (%) ^b	DAG (%) ^b	TAG (%) ^b
M1**	10	130	50	44	1	5
M2*	10	130	88	52	7	28
M3*	8	130	89	39	11	39
M4*	6	130	76	49	5	23
M5*	12	130	98	76	7	15
M6*	12	150	98	22	27	48
M7*	12	100	84	26	8	49

**Refluxo; *Aberto; ^a C_{BD} : Conversão do biodiesel; ^b Rendimento em monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG)

De acordo com a Tabela 3, uma comparação simples desses dados indica que o valor mais alto de conversão de biodiesel, 98%, foi obtido para o experimento realizado com tempo de reação de 12 horas, temperatura de 130°C e em reator aberto (teste M5). Para testes em reatores abertos, os melhores resultados de C_{BD} podem ser observados quando a temperatura e o tempo de reação são aumentados simultaneamente. Na temperatura mais baixa (teste M7, longo tempo de reação) e no menor tempo de reação (teste M4, temperatura mais alta), os resultados foram piores. O aumento simultâneo de ambos os fatores parece melhorar a conversão do biodiesel. No entanto, um aumento de temperatura acima de 130°C (vide teste M6) não parece melhorar

a conversão de biodiesel e o custo de energia da reação é maior, o que não é interessante do ponto de vista industrial. Todos os testes realizados com sistema aberto foram mais eficazes que o sistema de refluxo devido à evaporação do etanol, um subproduto volátil da reação da glicerólise. A remoção do etanol altera o equilíbrio termodinâmico em direção à formação do produto. Em uma planta industrial de glicerólise, o etanol poderia ser recuperado ao final do processo, o que evitaria a geração de resíduos, um dos princípios básicos da química verde (LENARDÃO; DABDOUB; BATISTA, 2003).

Deve-se considerar que o objetivo deste estudo é otimizar as condições para a síntese de MAGs. Em outras palavras, significa obter o rendimento máximo em monoacilglicerol, é procurado um processo com as temperaturas mais amenas possíveis. A tabela 3 mostra que um rendimento mais alto de MAG pode ser obtido com um tempo de reação de 12 horas a 130°C (teste M5). A temperatura da reação da glicerólise parece ser um parâmetro importante para atingir um maior teor de MAG. As experiências realizadas a 100 e 150°C apresentaram um teor menor de MAG e um alto teor de DAG e, principalmente, TAG nos produtos de glicerólise.

O produto da reação de glicerólise alcança ainda os requisitos básicos para uso como emulsificantes em alimentos, de acordo com a Organização Mundial de saúde, o produto deve conter pelo menos 70% de monoacilgliceróis e dialcilgliceróis somados, ter no mínimo 30% de monoacilgliceróis, só apresenta um triacilglicerol pouco superior, 15%, sendo o ideal abaixo de 10% (LANGONE *et al.*, 2002).

Cabe ressaltar que a remoção do excesso de glicerol do produto formado é dificultada pela alta viscosidade do produto. A dificuldade na transferência de massa demanda, portanto, um leve aquecimento a 70°C, conforme explicado na seção 4.1.2.2, seguido de resfriamento com banho de gelo para facilitar a separação de fases.

Assim, esses resultados demonstram a viabilidade de produzir MAGs com temperaturas relativamente baixas nas reações de glicerólise do biodiesel. Esses bons resultados podem ser explicados pelo fato de os ésteres etílicos serem mais miscíveis em glicerol quando comparados aos óleos vegetais, utilizados no método tradicional de glicerólise pela indústria, com temperaturas

acima de 200°C. Esses resultados são semelhantes àqueles observados por Schulz et. al. (2011), que também obtiveram bons resultados com temperaturas de 130°C. Entretanto, no presente trabalho, a síntese foi realizada utilizando-se um reagente verde, o etanol.

Os cromatogramas dos monoacilgliceróis obtidos pelas reações de glicerólise dos testes M1, M2, M3, M4, M6 e M7 são apresentados no anexo 1.

A Figura 18 mostra o espectro de RMN ^1H referente ao produto de glicerólise obtido com um rendimento de 76% de monoacilglicerol (teste M5) em solvente verde.

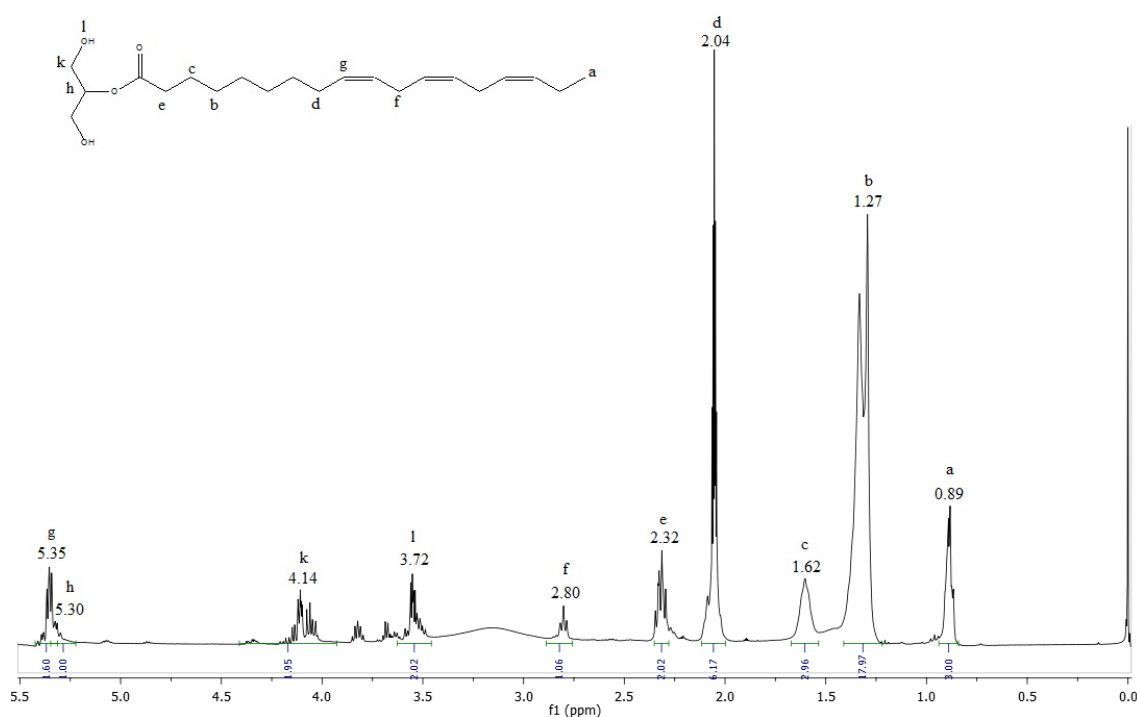


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) do monoacilglicerol.

O pico mais protegido observado em 0,89 ppm (pico a) é característico dos átomos de hidrogênio dos grupos metil terminais nas cadeias de ácidos graxos. Os sinais observados entre 2,80 e 1,27 ppm (picos f a b) são atribuídos aos átomos de hidrogênio dos grupos metileno internos nas cadeias de ácidos graxos. Os átomos de hidrogênios olefínicos das ligações duplas carbono-carbono de ácidos graxos estão em uma região de campo baixo, em 5,35 ppm (pico g). O pequeno sinal observado em 5,30 ppm (pico h) incluído nesta área é originário do átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono central do glicerol. O sinal em 4,14 ppm (pico k) é característico dos átomos de hidrogênio

ligados aos átomos de carbono externos do fragmento de glicerol e o sinal em 3,72 ppm (pico *l*) é atribuído ao hidrogênio dos grupos hidroxila. Os picos *k* e *l* são observados apenas nos monoacilgliceróis. Comparando-se os espectros apresentados nas Figuras 14, 15 e 18, observa-se que o sinal referente às ligações duplas (pico *g*) não foi suprimido, o que significa que as ligações duplas foram mantidas mesmo após todos os procedimentos realizados durante a síntese do MAG, desde o óleo de linhaça. Esses ácidos graxos insaturados são importantes e benéficos para a saúde humana. Assim, o MAG sintetizado pode ser de grande interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica.

A Figura 19 mostra os espectros obtidos na região do infravermelho para o biodiesel de óleo de linhaça e o monoacilglicerol obtido com 76% de rendimento.

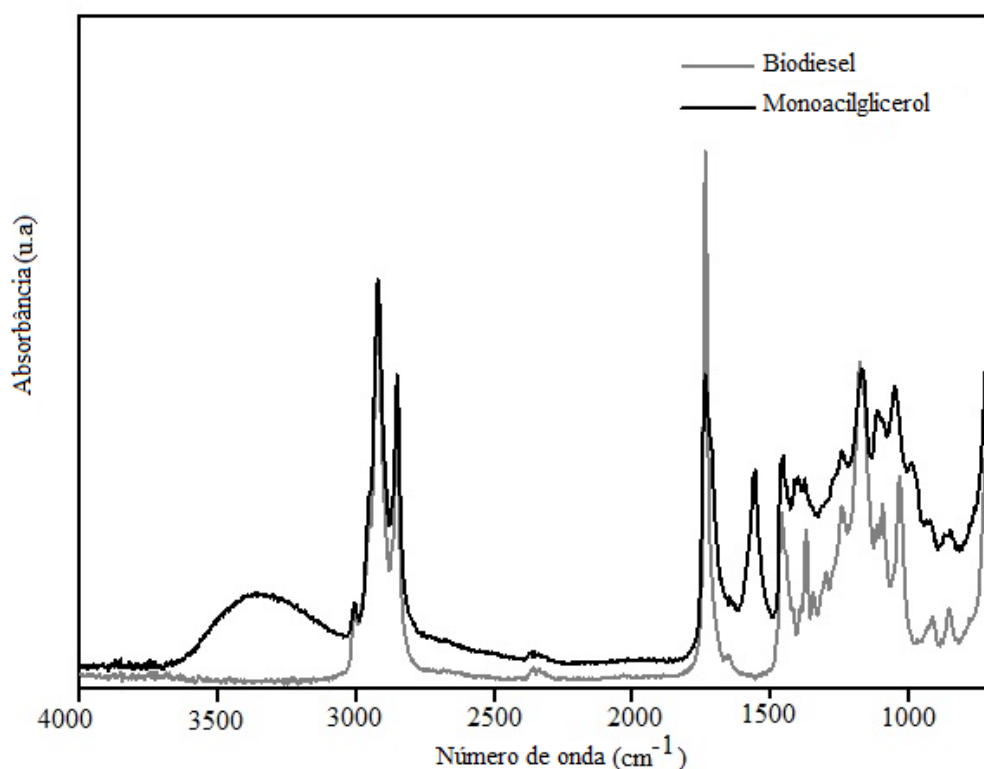


Figura 19. Espectro de IR do biodiesel e do monoacilglicerol obtido com 76% de rendimento.

Na Figura 19, a principal diferença observada entre os espectros do biodiesel (material de partida) e do monoacilglicerol é a banda forte e larga

centrada em 3360 cm^{-1} , atribuída aos modos de estiramento O-H, $\nu(\text{O-H})$, típicos de grupos hidroxila remanescentes na estrutura do monoacilglicerol após a reação de glicerólise do biodiesel. O alargamento da banda sugere uma grande extensão de grupos OH associados por ligações de hidrogênio. A banda fraca em 3008 cm^{-1} pode ser atribuída aos modos de estiramento C-H, $\nu(\text{C-H})$, olefínicos de ligações duplas cis-dissubstituídas, como aquelas encontradas nas cadeias insaturadas dos ácidos graxos do óleo de linhaça (GUZZATTO *et al.*, 2012). Modos de estiramento C-H, antissimétricos e simétricos, dos grupos metileno das cadeias de ácidos graxos podem ser observados em 2922 e 2853 cm^{-1} , respectivamente. Não foram observadas bandas características dos modos vibracionais C-H dos grupos metil (CH_3) terminais entre 3000 e 2800 cm^{-1} , o que indica uma alta razão de grupos CH_2/CH_3 . Esta informação está de acordo com a presença de ácidos graxos de cadeia longa do óleo de linhaça.

A banda forte em 1739 cm^{-1} é atribuída aos modos de estiramento C=O, $\nu(\text{C=O})$, dos grupos carbonila característicos dos ésteres. Os ésteres também apresentam modos de estiramento C-O, $\nu(\text{C-O})$, entre 1300 e 1100 cm^{-1} . O espectro na Figura 20 mostra várias bandas sobrepostas neste intervalo de número de onda e os modos vibracionais C-O dos ésteres podem ser observados em 1165 cm^{-1} (GUZZATTO *et al.*, 2012).

As bandas características dos LC-PUFAs, mostradas em 3008 cm^{-1} no espectro da Figura 20, indicam que os grupos funcionais do óleo de linhaça foram preservados ao longo do processo, sendo observado também nas Figuras 15 e 18 nos espectros de RMN ^1H . Além disso, a alta proporção de grupos hidroxila e metileno indica que o MAG foi sintetizado com sucesso a partir do óleo de linhaça.

A Figura 20 mostra as curvas de TGA do biodiesel de óleo de linhaça e do monoacilglicerol obtido 76% de rendimento. O termograma de biodiesel mostra uma perda de massa de aproximadamente 96% em apenas uma etapa. Este evento térmico ocorreu entre 160 e 260°C com perda máxima de massa em 244°C , o que pode ser atribuído à degradação da matéria orgânica.

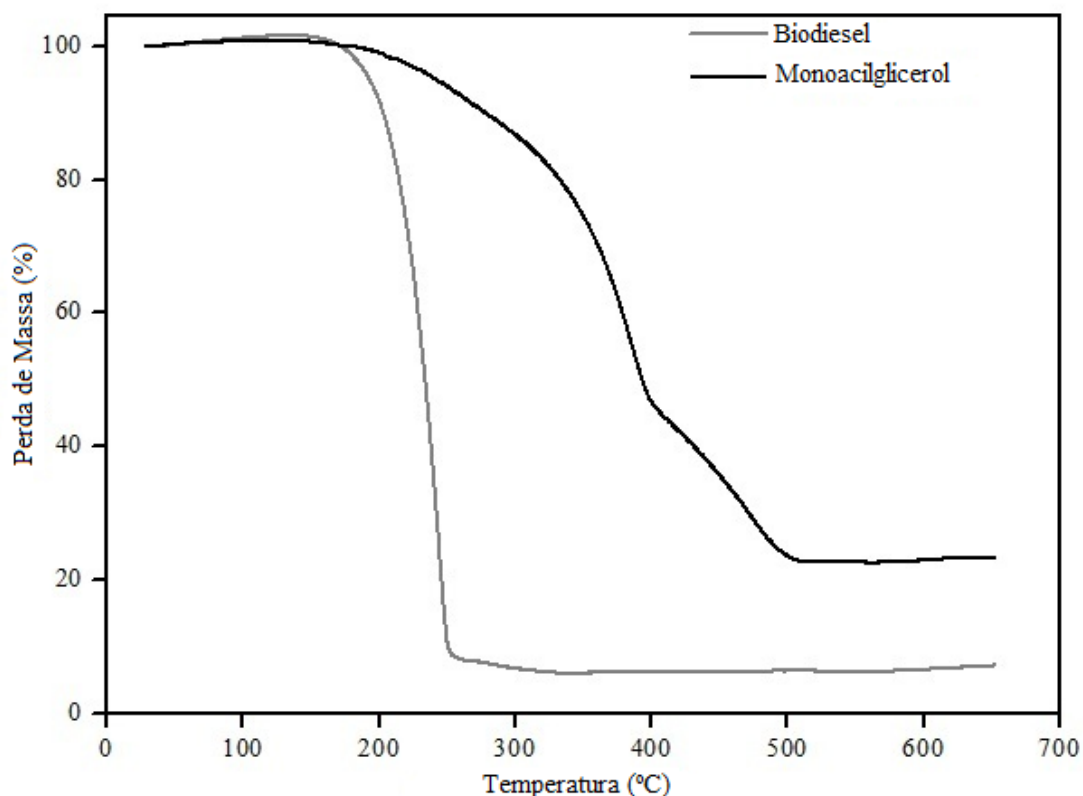


Figura 20. Curvas de TGA do biodiesel de óleo de linhaça e do monoacilglicerol.

Por outro lado, o MAG apresenta um perfil de decomposição térmica diferente do biodiesel. O termograma do MAG mostra uma perda de massa de aproximadamente 78% e, pelo menos, três eventos térmicos entre 160 e 220°C, 220 e 410°C e entre 410 a 510°C. Esses eventos térmicos podem ser observados pelas diferentes inclinações da curva. Além disso, a decomposição térmica do MAG parece ser mais lenta que a do biodiesel. Deve-se considerar que a estrutura do MAG possui grupos hidroxila, grupos que possuem interações de hidrogênio, os quais podem interferir significativamente em seu mecanismo de decomposição térmica.

Parte 2

5. Parte 2: Otimização de formulações nanoestruturadas a partir do monoacilglicerol

5.1. Reagentes e Métodos

5.1.1. Reagentes

Água destilada, monoacilglicerol, Monolaurato Polioxietilenosorbitano (Tween 20) (Synth), Monooleato Polioxietilenosorbitano (Tween 80) (Synth), Brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB) (Vetec), Brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) (Vetec), Dodecil sulfato de sódio (SDS), Polietilenoglicol (P123) (Sigma-Aldrich), álcool etílico (Synth).

5.1.2. Métodos

Para preparação da formulação nanoestruturada de monoacilglicerol, primeiramente o monoacilglicerol, sintetizado neste trabalho, foi pesado em balança analítica e misturado ao surfactante sob agitação magnética à temperatura ambiente até a total homogeneização dos mesmos. Posteriormente, foi adicionada água até completar 10 g de solução, que foi submetida a agitação magnética até total dissolução e a mistura tornar-se translúcida. A Figura 21 ilustra a representação do processo de preparo da formulação nanoestruturada.

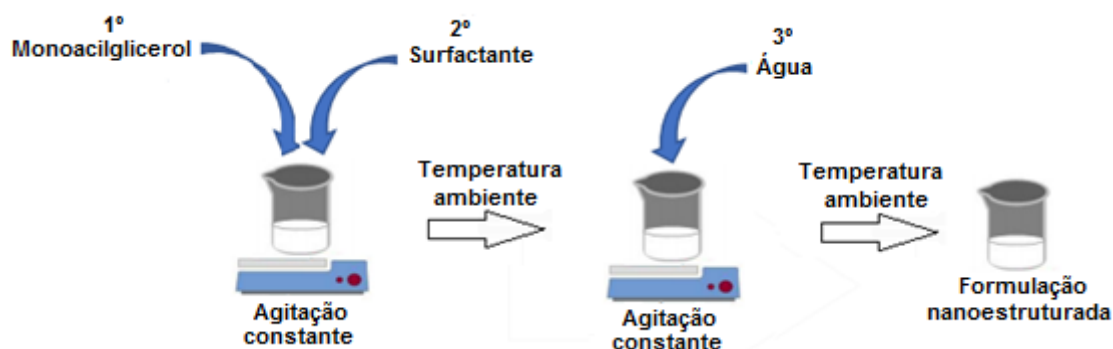
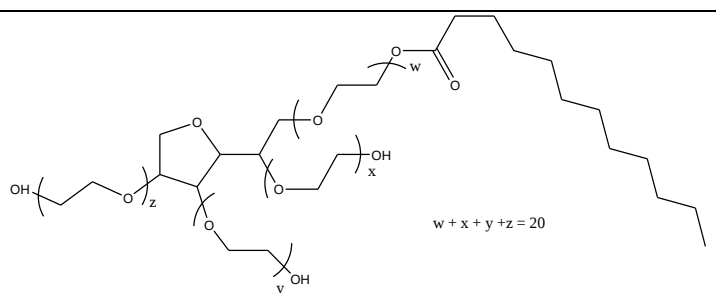
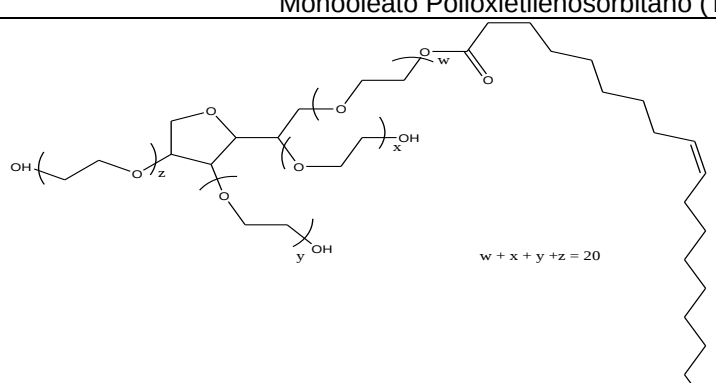
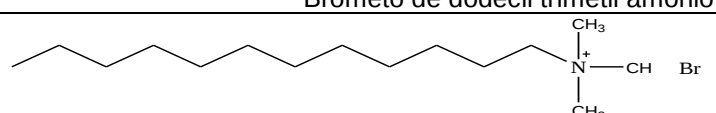
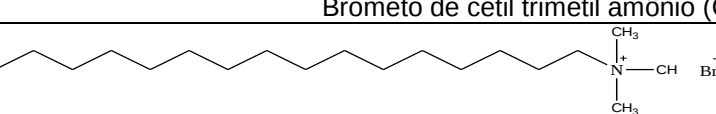
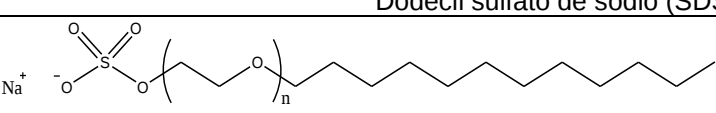
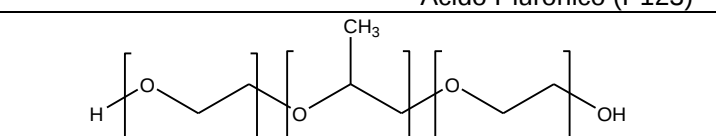


Figura 21. Representação do processo de preparo da formulação nanoestruturada

Para o preparo da formulação nanoestruturada foram realizados vários testes com variações das quantidades de monoacilglicerol e de surfactantes.

A Tabela 4 mostra a estrutura dos surfactantes selecionados, com sua respectiva massa molar e valor de HBL.

Tabela 4. Surfactantes testados no preparo das formulações nanoestruturadas de monoacilglicerol

Estrutura Química	Massa molar (g.mol ⁻¹)	HBL*
Monolaurato Polioxietilenosorbitano (Tween 20)		
 $w + x + y + z = 20$	1227,52	17,01
Monooleato Polioxietilenosorbitano (Tween 80)		
 $w + x + y + z = 20$	1309,67	15,95
Brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB)		
	308,35	**
Brometo de cetil trimetil amônio (CTAB)		
	364,45	10
Dodecil sulfato de sódio (SDS)		
	288,37	40
Ácido Plurônico (P123)		
	5800	7-9

* HBL=Balanço hidrofílico lipofílico; ** não encontrado

Para isso, foram selecionados alguns surfactantes a fim de buscar algum que apresentasse um melhor resultado quanto a formação e estabilidade de

nanoemulsões. Dentre os surfactantes disponíveis, foram selecionados três não-iônicos (Tween 20, Tween 80 e P123), dois catiônicos (DTAB e CTAB) e um aniônico (SDS).

5.2. Instrumentação para Caracterização

Para a caracterização da formulação nanoestruturada obtida, foram analisados alguns parâmetros indicadores de estabilidade, tais como: raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade e mobilidade eletroforética, pH, viscosidade, índice de refração, efeito da centrifugação e estresse térmico.

5.2.1. Tamanho de gotícula e estabilidade

O raio hidrodinâmico, o índice de polidispersão, o potencial zeta, a condutividade e a mobilidade eletroforética das nanoestruturas preparadas, foram obtidos utilizando-se um equipamento Litesizer 500 Particle Analyzer da marca AntonPaar. O equipamento tem como princípio, para medições destes parâmetros, a dispersão de luz dinâmica (DLS), espalhamento de luz eletroforética (ELS) e espalhamento de luz estática (SLS). As medidas foram realizadas a 25°C, sem diluição das amostras. A Figura 22 mostra a imagem do analisador de partículas utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.



Figura 22. Analisador de partículas utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.

5.2.2. Determinação do valor de pH

Para a determinação do pH das formulações foi utilizado o pHmetro marca MS – Tecnopon Instrumentação, modelo mPA – 210. O sistema foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. A Figura 23 mostra a imagem do equipamento utilizado na determinação do pH das formulações nanoestruturadas.



Figura 23. Equipamento utilizado na determinação do pH das formulações nanoestruturadas.

5.2.3. Viscosidade

A análise de viscosidade das formulações foi realizada em equipamento Brookfield RS-CPS+Rheometer, com controlador de temperatura modelo P_TS, software: Rheo 3000 v1.2, taxa de cisalhamento de 0 a 100/s, temperatura de 25°C, tempo de 120s e *spindle* (sistema de medição, haste que foi encaixada no equipamento) - C25-1. A Figura 24 mostra a imagem do viscosímetro utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.



Figura 24. Viscosímetro utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.

5.2.4. Índice de refração

Para a determinação do índice de refração das formulações foi utilizado um refratômetro da marca Analytik Jena, previamente calibrado com água destilada. A Figura 25 mostra a imagem do refratômetro utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.



Figura 25. Refratômetro utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.

5.2.5. Centrifugação

A análise de estabilidade por centrifugação foi realizada adicionando-se aproximadamente 3 mL das formulações em tubo falcon, submetendo-as a centrifugação na velocidade de 3500 rpm por 30 min a 25°C (Bhatt and Madhav, 2011), em centrífuga de marca Centrifuge 5804R. A Figura 26 mostra a imagem da centrífuga utilizada para caracterizar as formulações nanoestruturadas.



Figura 26. Centrífuga utilizada para caracterizar as formulações nanoestruturadas.

5.2.6. Estresse térmico

A análise de estabilidade por estresse térmico foi realizada adicionando-se aproximadamente 3 mL das formulações em tubo falcon. As amostras foram submetidas a aquecimento na faixa de 25 a 100°C, sendo observado a ocorrência ou não de separação de fases ou modificações na cor a partir de 40°C. Os ensaios foram realizados em banho-maria da marca Centauro. A Figura 27 mostra a imagem do banho-maria utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.



Figura 27. Banho-maria utilizado para caracterizar as formulações nanoestruturadas.

5.3. Resultados e discussões

A seguir serão apresentados e discutidos a metodologia empregada e os resultados obtidos, na obtenção das formulações nanoestruturadas.

5.3.1. Escolha do surfactante

Vários testes foram realizados a fim de obter uma formulação capaz de ser aplicada como veículo para substâncias hidrofóbicas, sejam fármacos, cosméticos, vitaminas ou compostos alimentares.

Para isto, sabe-se que sendo o tamanho das gotículas que determina a aparência da dispersão coloidal, pequenos tamanhos de gotículas tendem a ser transparentes ou translúcidas (JINTAPATTANAKIT, 2018). É desejável o tamanho de gotículas muito pequeno, menores que 100 nm, uma vez que apresentam vários benefícios, incluindo biodisponibilidade aumentada, aumento da estabilidade a longo prazo e alta clareza óptica

(JINTAPATTANAKIT, 2018). Para a estabilização das formulações é necessária a utilização de surfactantes (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012) ou ainda, de co-surfactantes (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014).

Como exposto anteriormente, os surfactantes têm papel importante, pois diminuem a tensão interfacial entre as duas fases, a fim de se obter pequenas gotículas. O tipo de surfactante influencia na estabilidade das gotículas com relação a fatores como variação de temperatura, pH, força iônica e tempo de armazenamento (ÇINAR, 2017). Dessa forma, foi utilizada a proporção molar de monoacilglicerol:surfactante (MAG:SUR) de 1:2 e testou-se vários surfactantes. Os resultados são mostrados na Tabela 5, analisadas no primeiro dia após o preparo.

Tabela 5. Escolha do surfactante usando proporção molar de MAG:SUR de 1:2 e H₂O qsp para 10 g da formulação

Teste	Foto	SUR	RH (nm)	IPD (%)	PZ (mV)	CD (mS.cm ⁻¹)	ME (μm.cm.Vs ⁻¹)
7		Tween 20	19	21,4	-3,9	1,6	-0,3
5		Tween 80	262	25,8	-4,2	1,6	-0,3
14		DTAB	8148	29,6	30,9	7,8	2,4
13		CTAB	49560	330,9	21,7	7,4	1,6
12		SDS	27713	41,1	-48,0	7,6	-3,7
15		Tween 20*	12143	25,1	-1,2	0,2	-0,1

SUR (Surfactante); RH (Raio hidrodinâmico); IPD (Índice de polidispersão); PZ (Potencial zeta); CD (Condutividade); ME (Mobilidade eletroforética); *teste realizado com óleo de linhaça

Os produtos foram analisados quanto ao seu raio hidrodinâmico (RH), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ), condutividade (CD) e mobilidade eletroforética (ME). Algumas formulações, conforme observado nas fotos apresentadas na Tabela 5, apresentaram transparência e homogeneidade.

Em caráter experimental, foi testada a mesma quantidade, em massa, do óleo de linhaça em vez do monoacilglicerol. O resultado é apresentado na imagem da formulação 15, onde observa-se a formação de uma emulsão opaca, uma macroemulsão heterogênea. Os óleos são compostos, na sua maior proporção, por triacilgliceróis, que são mais apolares que os monoacilgliceróis, o que pode justificar a diferença observada.

Com relação ao raio hidrodinâmico, o qual busca-se tamanhos pequenos, pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos com os surfactantes Tween 20 e 80, o que pode ser atribuído a estrutura dos surfactantes que são semelhantes (Tabela 4). Os surfactantes não-iônicos com cadeias carbônicas volumosas estabilizam as gotículas da nanoemulsão por impedimento estérico, evitando a coalescência destas. A dissociação em surfactantes não iônicos é muito pequena para gerar cargas elétricas que estabilizam as gotículas por repulsão eletrostática. Estes surfactantes criam uma barreira estérica com grupos moleculares volumosos (ÇINAR, 2017), o que pode explicar o resultado obtido.

Comparando a formulação do testes 5 (Tween 80) com RH de 262 nm com o teste 7 (Tween 20) com RH de 19 nm, observa-se uma diferença muito grande entre os resultados, o que se deve a diferença na estrutura dos surfactantes. O fato da estrutura molecular do surfactante Tween 80 possuir uma cadeia carbônica maior e apresentar uma insaturação impede a acomodação das cadeias de ácidos graxos do monoacilglicerol, que trata-se de uma cadeia carbônica com três insaturações, acomodada mais facilmente pela estrutura saturada do Tween 20. O impedimento estérico entre as cadeias insaturadas do Tween 80 e do monoacilglicerol resulta em um aumento do raio hidrodinâmico das gotículas na formulação.

O uso dos surfactantes catiônicos (DTAB e CTAB) e aniônico (SDS) não se mostrou viável para o preparo de formulações nanoestruturadas com o monoacilglicerol nas condições estudadas. As imagens da Tabela 5 mostram

uma turbidez nestas formulações, o que sugere que as forças eletrostáticas atrativas superam as forças eletrostáticas repulsivas que ocorrem no meio onde há surfactantes iônicos, levando a uma coalescência das gotículas.

Os resultados obtidos podem ser justificados pelos valores de HBL, visto que os surfactantes que apresentaram melhores resultados Tween 20 e 80 apresentam valores altos de HBL 17,01 e 15,95 (Tabela 4), respectivamente, dentro da faixa de valores que são considerados ideais para nanoemulsões do tipo óleo em água, HLB (8-18) (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014). Já o surfactante CTAB, apresenta HBL 10 (Tabela 4), dentro da faixa de valores que são considerados ideais, porém bem menor que o Tween 20 e 80, e o surfactante SDS, apresenta HBL 40 (Tabela 4) muito acima do considerado ideal para nanoemulsões óleo em água.

Quanto ao índice de polidispersão, que indica a faixa de distribuição do raio das gotículas, observa-se que na maior parte dos testes a variação ficou entre 20 e 30% do valor do RH, tendo também respostas melhores quando utilizado os surfactantes Tween 20 e 80. Os valores do índice de polidispersão próximos de 20% indicam uma distribuição monomodal e estreita de tamanho das gotículas (IZQUIERDO *et al.*, 2005).

Quanto ao potencial zeta, o valor considerado ideal é maior que 30 ou menor que -30 mV e indica que a emulsão é fisicamente estável (FREITAS; MULLER, 1998). Altos valores de potencial zeta, positivos ou negativos, estão indiretamente associados a estabilidade da formulação, pois a repulsão entre partículas identicamente carregadas evita processos como a floculação das emulsões. Na Tabela 5 observa-se que o melhor resultado de potencial zeta foi obtido para a formulação do teste 12 (com surfactante aniônico) seguida pelas formulações dos testes 13 e 14 (com surfactantes catiônicos). Porém, estas formulações não apresentaram resultados bons quando comparados ao parâmetro raio hidrodinâmico. Por outro lado, os resultados baixos de potencial zeta obtidos para as formulações dos testes 7 e 5 utilizando os surfactantes Tween 20 e 80, respectivamente, são esperados devido a estes surfactantes, sendo não-iônicos, não possuírem cargas.

Nas formulações com surfactantes iônicos, a condutividade e mobilidade eletroforética, em módulo, apresentam valores maiores, o que é esperado para formulações que apresentam cargas elétricas quando submetidas a uma

diferença de potencial. Por outro lado, no caso das formulações contendo monoacilglicerol e Tween, que são não iônicos, os valores são menores. Estes valores são menores ainda quando o monoacilglicerol é substituído pelo óleo de linhaça, que é mais apolar que o monoacilglicerol.

5.3.2. Testes com uso de 20% de surfactantes

Foi realizado ainda, um experimento utilizando proporções mássicas, a fim de verificar se 20% de surfactante levaria a um melhor resultado. Testou-se o surfactante P123, que também é não-iônico e não poderia ser usado na relação molar anterior, visto que possui massa molar de 5800 g.mol^{-1} , não é possível a utilização da proporção molar para 10 g de solução, e testou-se ainda o efeito de um aumento do percentual do surfactante catiônico CTAB na formulação.

Com os dados do teste anterior (Tabela 5), no qual a proporção molar do monoacilglicerol utilizado (1 mmol) equivale ao teor mássico de 3,5%, e os surfactantes que apresentaram melhores resultados: Tween 20, no qual 2 mmol equivale ao teor em massa de 24%, e o Tween 80 equivale ao teor em massa de 26%, optou-se então por testar 3,5% de monoacilglicerol (equivalente a 1 mmol) com 20% de alguns surfactantes disponíveis e água destilada qsp para 10 g da formulação, conforme mostrado da Tabela 6, analisadas no primeiro dia após o preparo.

Tabela 6. Escolha do surfactante utilizando um teor em massa de 3,5% de MAG, 20% de surfactante e H_2O qsp para 10 g da formulação

Teste	Foto	SUR	RH (nm)	IPD (%)	PZ (mV)	CD (mS.cm^{-1})	ME ($\mu\text{m.cm.Vs}^{-1}$)
8		Tween 20	13	30,5	-6,5	1,7	-0,5
11		Tween 80	72139	11,6	-7,0	1,6	-0,5

21		CTAB	31846	49,7	-	-	-
20		P123	5449	26,1	-3,9	1,6	-0,3

SUR (Surfactante); RH (Raio hidrodinâmico); IPD (Índice de polidispersão); PZ (Potencial zeta); CD (Condutividade); ME (Mobilidade eletroforética)

Pode-se observar, através das fotos, que a formulação do teste 8 ficou transparente, dos testes 20 e 21 ficaram translúcidas, e do teste 11 ficou opaca. Porém, quando são analisados os raios hidrodinâmicos, observa-se que a formulação do teste 8 foi a que apresentou melhor resultado. Comparando-se o resultado desta formulação com àquela do teste 7 (Tabela 5), pode-se observar que a formulação do teste 8 apresenta um raio hidrodinâmico menor, porém seu índice de polidispersão é maior, o que sugere que a distribuição do raio das gotículas se encontra em uma faixa maior. A polidispersividade dá origem ao amadurecimento de Ostwald, processo em que o tamanho médio das gotículas em uma emulsão aumenta ao longo do tempo devido à difusão de moléculas do óleo das micelas menores para as micelas maiores. Este processo de coalescência das gotas leva a uma redução da área superficial da gota e consequentemente, a uma redução da tensão superficial (MCCLEMENTS, 2011). O amadurecimento de Ostwald é o principal mecanismo de desestabilização para as nanoemulsões, devido ao tamanho extremamente pequeno das gotículas, o que causa grande limitação para sua utilização no desenvolvimento de novas aplicações (ÇINAR, 2017).

Para a formulação do teste 11, a diminuição do teor do surfactante Tween 80 de 26% (teste 5, Tabela 5) para 20% (teste 11, Tabela 6) mostrou um aumento significativo no RH, indicando uma perda de estabilidade da emulsão. Pode-se constatar que 20% do surfactante Tween 80 não é suficiente para o preparo da formulação nanoestruturada.

A formulação do teste 21 não apresentou resultado satisfatório com relação ao RH, mesmo com aumento da quantidade de surfactante (em relação ao teste 13 da Tabela 5). Observa-se ainda que a formulação do teste 20, com

o surfactante P123, sendo este um surfactante não-iônico, poderia ser comparado com o Tween 20. Porém, embora não-iônico, o resultado não foi bom. Os resultados podem ser justificados pelos valores de HBL, visto que o surfactante que apresentou melhor resultado, Tween 20, apresenta valor alto de HBL 17,01 (Tabela 4), já o surfactante CTAB - HBL 10 (Tabela 4) e o P123 – HBL 7 a 9 (Tabela 4). Os valores, apesar de estarem dentro da faixa de valores que são considerados ideais para nanoemulsões do tipo óleo em água, HLB (8-18) (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014), são baixos, o que sugere que valores altos de HBL, são necessários para preparo desta formulação.

A Tabela 6 mostra também um aumento do PZ das formulações dos testes 8 e 11, quando comparados àqueles dos testes da Tabela 5, porém com uma mesma ordem de grandeza. A condutividade e a mobilidade eletroforética não parecem ter sido afetadas significativamente pela diminuição do teor de surfactante.

5.3.3. Testes com uso do co-surfactante álcool etílico

Como exposto anteriormente, em muitas situações apenas um surfactante pode não ser capaz de reduzir a tensão interfacial óleo/água para estabilizar a nanoemulsão, surge então, a necessidade de se utilizar um co-surfactante.

Baseado nisso e nos resultados dos testes anteriores, nos quais os melhores resultados com respeito ao raio hidrodinâmico foram obtidos com os surfactantes Tween 20 e Tween 80, foram realizados ainda experimentos utilizando o co-surfactante álcool etílico.

Inicialmente, foram realizados testes com variações da quantidade do surfactante Tween 80 para alcançar um produto transparente. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos utilizando-se 1 mmol do monoacilglicerol, 2 mmol do surfactante Tween 80, razão molar de MAG:SUR de 1:2, com variações de 0; 0,5; 1 e 2% em massa de álcool etílico como co-surfactante. As formulações foram caracterizadas nos dias 1, 14 e 28 após o preparo.

Tabela 7. Efeito do álcool etílico em formulações com razão molar MAG:SUR de 1:2 com Tween 80 como surfactante.

Teste	Foto	Álcool etílico (%)	Tempo (Dias)	RH (nm)	IPD (%)	PZ (mV)	CD (mS.cm ⁻¹)	ME (μm.cm.Vs ⁻¹)
5		-	1	262	25,8	-4,3	1,6	-0,3
			14	135	20,8	-3,0	1,5	-0,2
			28	230	22,1	-2,6	1,5	-0,2
6		0,5	1	160	21,7	-3,4	1,5	-0,3
			14	178	21,4	-2,9	1,5	-0,2
			28	14	28,6	-2,6	1,5	-0,2
4		1	1	121	22,0	-4,9	1,5	-0,4
			14	102	21,6	-1,8	1,5	-0,1
			28	198	22,8	-3,2	1,4	-0,2
3		2	1	86	21,8	-2,6	1,5	-0,2
			14	71	22,9	-0,7	1,4	-0,1
			28	103	21,9	-1,1	1,4	-0,1

RH (Raio hidrodinâmico); IPD (Índice de polidispersão); PZ (Potencial zeta); CD (Condutividade); ME (Mobilidade eletroforética)

Com relação ao raio hidrodinâmico para formulações analisadas após 1 dia de preparo, nota-se que a adição de teores crescentes do co-surfactante álcool etílico resulta em uma diminuição do RH das gotículas. Além disso, observa-se uma pequena variação do RH em todas as formulações ao longo do tempo, o que pode estar associado a acomodação das cadeias do monoacilglicerol e do surfactante. Entretanto, em todas as formulações e em todos os tempos analisados, o RH foi menor do que aquele medido para a formulação sem o co-surfactante (teste 5) analisada após um dia do preparo. O álcool etílico adicionado como co-surfactante nas formulações com Tween 80 parece exercer o papel de acomodar melhor as cadeias carbônicas dos componentes da formulação, permitindo uma diminuição do RH das gotículas. Apesar deste resultado, as formulações preparadas com Tween 20 (Tabelas 5 e 6) ainda apresentam os menores valores de RH.

Quanto ao índice de polidispersão, que mostra a distribuição de tamanho das gotículas, pode ser observado na Tabela 7 que este varia entre 20 e 29% do valor do RH para as formulações, o que mostra uma certa uniformidade no tamanho das gotículas para cada formulação (IZQUIERDO *et al.*, 2005).

Quanto ao potencial zeta, valores baixos são esperados devido ao Tween 80 ser um surfactante não-iônico e não possuir carga. A estabilidade ao longo do tempo avaliado se justifica pelo raio hidrodinâmico se manter com valores sem variações expressivas, possivelmente isso se deve ao efeito estérico da estrutura volumosa da molécula do Tween 80 que interage com a estrutura do monoacilglicerol.

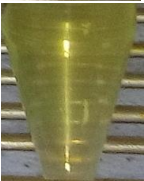
Quanto a condutividade, que pode ser considerada um parâmetro indicativo de instabilidade das emulsões, observa-se que os valores se mantiveram em torno de 1,5 mS/cm, não havendo uma variação expressiva durante o período avaliado.

Com relação a mobilidade eletroforética, os resultados ficaram entre -0,1 e -0,3 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$, o que pode ser justificado pelo fato do surfactante utilizado ser o Tween 80. A mobilidade eletroforética é a razão da velocidade dos íons em relação à força de um campo elétrico. Tendo em vista que o Tween 80 é um surfactante não-iônico, o baixo valor de mobilidade eletroforética é esperado para esta formulação.

O melhor resultado para esta série de formulações foi o teste 3, que apresentou os menores valores de RH. Porém, embora esteja na escala nano, com a adição do co-surfactante álcool etílico, os resultados obtidos com o Tween 80 não foram melhores que os resultados obtidos anteriormente, para a formulação do teste 7 (Tabela 5), onde Tween 20 foi utilizado como surfactante. Portanto, foram realizados experimentos variando as quantidades de Tween 20 (15, 17, 20, 24 e 28 %) e 2% de álcool etílico.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos utilizando 1 mmol do monoacilglicerol com variações do teor de surfactante Tween 20 sem e com a adição de 2% de álcool etílico como co-surfactante, analisadas no primeiro dia após o preparo.

Tabela 8. Efeito da variação do teor do surfactante Tween 20 e da presença de álcool etílico nos testes utilizando 1 mmol do monoacilglicerol

Teste	Foto	SUR (%)	Álcool etílico (%)	RH (nm)	IPD (%)	PZ (mV)	CD (mS.cm ⁻¹)	ME (μm.cm.Vs ⁻¹)
9		15	-	41044	154,0	-10,0	1,8	-0,8
10		17	-	6993	41,7	-8,8	1,7	-0,7
8		20	-	13	30,5	-6,6	1,7	-0,5
16		20	2	1154	27,5	-5,8	1,6	-0,4
7		24	-	19	21,4	-3,9	1,6	-0,3
17		24	2	871	26,6	-3,9	1,4	-0,3
19		28	-	7285	27,5	-4,0	1,4	-0,3
18		28	2	1586	23,7	-4,1	1,3	-0,3

SUR (Surfactante); MAG (Monoacilglicerol); RH (Raio hidrodinâmico); IPD (Índice de polidispersão); PZ (Potencial zeta); CD (Condutividade); ME (Mobilidade eletroforética)

Observa-se que as formulações dos testes 9 e 10, com 15 e 17% de surfactante, respectivamente, apresentaram-se opacas, o que mostra que a quantidade de surfactante foi insuficiente para estabilizar as formulações. As formulações dos testes 7 e 8, na ausência do álcool etílico, apresentaram um resultado satisfatório tanto no aspecto visual quanto no RH, comparadas com as formulações dos testes 16 e 17, na presença de 2% de álcool etílico. Nota-se que o uso do co-surfactante não foi eficiente, ou seja, não melhorou ou manteve o raio hidrodinâmico das gotículas pequeno para as formulações contendo Tween 20. Com relação às formulações dos testes 18 e 19, observou-se que o aumento da quantidade de surfactante na formulação também não mostrou melhora nos resultados. Os resultados mostram que teores de 20 e 24% do surfactante Tween 20, na ausência do co-surfactante, são adequados para garantir a formação das nanoemulsões. Teores abaixo ou acima destes parecem não estabilizar as nanoemulsões.

Assim, comparando-se as formulações analisadas após 1 dia do preparo com 20% de Tween 20 (Tabela 8) sem co-surfactante (teste 8, RH = 13 nm) e com 2% de co-surfactante (teste 16, RH = 1154 nm), e as formulações com 20% de Tween 80 (Tabela 7) sem co-surfactante (teste 5, RH = 262 nm) e com 2% de co-surfactante (teste 3, RH = 86 nm), pode-se observar que a presença de 2% do co-surfactante álcool etílico melhora os resultados do RH nas formulações com Tween 80. Entretanto, o mesmo comportamento não pode ser observado para as formulações contendo Tween 20.

Diante disso, considera-se que o melhor resultado para a formulação nanoestruturada é a proporção utilizada na formulação do teste 7.

5.3.4. Caracterização da formulação nanoestruturada

A formulação do teste 7 foi analisada quanto a sua estabilidade em um período de 1, 14 e 28 dias. Esta amostra foi caracterizada quanto ao raio hidrodinâmico, o índice de polidispersão, o potencial zeta, a condutividade, a mobilidade eletroforética e ainda, foi caracterizada quanto ao seu pH, viscosidade, índice de refração e testes de estabilidade por centrifugação e estresse térmico. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da caracterização da formulação nanoestruturada do teste 7			
Tempo (dias)	1	14	28
RH (nm)	19	19	56
IPD (%)	21,4	22,3	18,0
PZ (mV)	-3,9	-4,3	-3,7
CD (mS.cm ⁻¹)	1,6	1,6	1,5
ME (μm.cm.Vs ⁻¹)	-0,3	-0,3	-0,3
Foto			
Cor			
pH*		7,10	
Índice de refração*		1,369	
Viscosidade (Pa.s)*		42,94	

* Analisado no dia do preparo. RH (Raio hidrodinâmico); IPD (Índice de polidispersão); PZ (Potencial zeta); CD (Condutividade); ME (Mobilidade eletroforética)

Como já foi citado anteriormente, é desejável um tamanho de gotículas muito pequeno, menores que 100 nm, para uso da nanoemulsão como veículo para fármacos, uma vez que este tamanho apresenta vários benefícios, incluindo biodisponibilidade aumentada, aumento da estabilidade a longo prazo e alta clareza óptica.(Jintapattanakit, 2018)

Observa-se que o resultado do raio hidrodinâmico se mantém estável ao longo do período analisado, tendo um pequeno aumento em 28 dias após o preparo, o qual poderia ser atribuído a maturação de Ostwald.

O índice de polidispersão, sugere que a maioria das gotículas desta formulação apresenta um tamanho muito próximo, ou seja, apresenta uma estreita distribuição no tamanho destas gotículas. Pode ser observada uma discreta diminuição no IPD para a formulação analisada aos 28 dias. Provavelmente, gotículas menores coalesceram e deslocaram o raio hidrodinâmico para um valor maior em 28 dias, porém, com uma discreta diminuição no intervalo de tamanho, o que sugere uma distribuição discretamente mais estreita de tamanhos das gotículas no 28º dia após o preparo. Os valores do índice de polidispersão próximos de 20% indicam uma distribuição estreita de tamanho das gotículas. (IZQUIERDO *et al.*, 2005)

O potencial zeta indica, indiretamente, que uma emulsão é fisicamente estável devido a repulsão eletrostática induzida pelas gotículas identicamente carregadas. As cargas negativas ou positivas na superfície das gotículas

causam repulsão, o que evita agregação ou coalescência.(TAGHAVI *et al.*, 2018) Entretanto, sendo o Tween 20 um surfactante não-iônico, os valores de PZ observados na Tabela 9 são menores do que aqueles esperados para gotículas carregadas. Portanto, a estabilidade observada através da constância do resultado do RH por pelo menos 14 dias se deve a estabilidade atribuída por fatores estéricos, pelo fato da molécula do Tween 20 possuir em sua estrutura uma cadeia saturada que pode acomodar a molécula do monoacilglicerol, que por sua vez, possui em sua estrutura uma cadeia de ácidos graxos com três insaturações.

Quanto a condutividade, que pode ser considerada um parâmetro indicativo de instabilidade das emulsões, o aumento pode estar relacionado com a coalescência e a diminuição, com a agregação das gotículas. Portanto, observa-se, que os valores de condutividade se mantiveram em torno de 1,5 mS/cm, não havendo uma variação expressiva durante o período avaliado.

O valor observado para a mobilidade eletroforética, em torno de -0,3 $\mu\text{m.cm/Vs}$, pode ser justificado pelo fato do surfactante utilizado ser o Tween 20. A mobilidade eletroforética é a razão da velocidade dos íons em relação à força de um campo elétrico. Tendo em vista que o Tween 20 é um surfactante não-iônico, o baixo valor de mobilidade eletroforética é esperado para esta formulação.

Quanto a cor, como foi citado anteriormente, gotículas com tamanho até 50 nm são transparentes, o que pode ser confirmado analisando a formulação obtida, que tem um leve tom amarelo que pode ser atribuído ao monoacilglicerol, que é marron claro, ou até mesmo ao Tween 20, de cor amarelo claro.

A formulação do teste 7 apresentou um pH neutro. Este resultado é muito satisfatório para as aplicações planejadas para o material, entre elas, como veículos para drogas, tendo em vista que o pH da formulação é compatível com o pH sanguíneo.

Quanto ao índice de refração, definido como a razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz no meio, pode-se observar que o resultado obtido, 1,369, é próximo ao índice de refração da água, que é 1,332 (ZAMBIAZI, 2010), o que só corrobora com a transparência relatada na análise de cor da formulação.

A viscosidade é uma característica importante porque caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento. Em nanoemulsões, quanto maior a viscosidade, maior é a estabilidade e o tempo de vida útil da formulação para testes ou uso final. A água, por exemplo, apresenta uma viscosidade de 1 mPa.s (PILEGGI , 2000), um valor muito menor do que aquele determinado para a formulação do teste 7. A alta viscosidade observada para esta formulação corrobora com os resultados de estabilidade discutidos anteriormente.

A formulação nanoestruturada do teste 7 foi analisada também quanto a estabilidade sob centrifugação e estresse térmico. Para a estabilidade por centrifugação foi realizada a análise visual após esta ser submetida a uma velocidade de 3500 rpm por 30 min a 25°C. Observou-se que não houve alterações na aparência e também não houve separação de fases. Isso comprova que a amostra manteve sua estabilidade mesmo em uma alta velocidade de rotação. O resultado é mostrado na Figura 28.

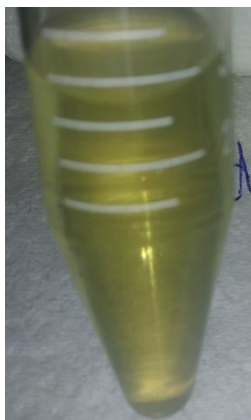


Figura 28. Formulação nanoestruturada do teste 7 após a centrifugação.

O resultado visual do teste de estabilidade por estresse térmico da formulação nanoestruturada do teste 7 está mostrado na Figura 29. A amostra foi submetida a um aquecimento na faixa de 25 a 100°C e o resultado foi registrado a cada 10°C entre 40 e 100°C.

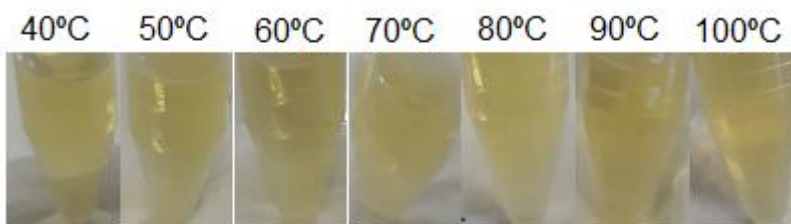


Figura 29. Formulação nanoestruturada do teste 7 após o estresse térmico.

Observou-se que ao ser submetida a um aquecimento na faixa de 25 a 100°C, não houve alteração na aparência e também não houve separação de fases. Este resultado comprova que a amostra manteve a estabilidade, o que é um resultado satisfatório, visto que abrange a aplicação da nanoestrutura em áreas que exijam estabilidade térmica.

Os resultados de estabilidade mostrados pela formulação do teste 7 indicam uma complexidade das interações entre os componentes da formulação. Moléculas anfifílicas, que contêm um grupo hidrofílico e um domínio de cadeia carbônica hidrofóbica, mediante adição de água formam estruturas auto-organizadas que são denominadas fases cristalinas líquidas (WANG *et al.*, 2018). Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos e contém, no mínimo, dois componentes: o componente orgânico, por exemplo, tensoativo e seu solvente (FORMARIZ *et al.*, 2005). Estas estruturas liotrópicas são termodinamicamente estáveis, independentemente da temperatura e pressão, isso justifica os resultados dos testes de estabilidade (estresse térmico e por centrifugação) obtidos com a formulação nanoestruturada.

As características quanto a estabilidade da formulação nanoestruturada preparada neste trabalho e sua composição como, por exemplo, a presença do Tween 20 e do monoacilglicerol contendo três insaturações, ambos anfifílicos, indicam que a formulação possui complexidade para formar uma estrutura cristalina líquida. Além disso, a alta viscosidade observada para a formulação também sugere que houve a formação de mesofases.

Conforme exposto anteriormente, os carreadores lipídicos são transportadores seguros porque são produzidos com ingredientes não tóxicos e não irritantes, e apresentam capacidade de incorporar drogas (NICULAE *et al.*, 2014). Dessa forma, a sequência do trabalho foi a aplicação do monoacilglicerol como agente encapsulante de ácidos graxos em nanoemulsões com atividade biológica em testes com bactérias multirresistentes.

Parte 3

6. Parte 3: Monoacilglicerol como agente encapsulante em formulações nanoestruturadas

6.1. Reagentes e Métodos

6.1.1. Reagentes

Água destilada, monoacilglicerol, Monolaurato Polioxietilenosorbitano (Tween 20) (Synth), Ácidos graxos: octanóico (caprílico), decanóico (cáprico), dodecanóico (láurico) e tetradecanóico (mirístico) (Sigma-Aldrich), Álcool etílico P.A. (Synth), meios de cultura Mueller Hinton Broth (Kasvi) e Mueller Hinton Ágar (Kasvi), Cloreto de 2,3,5-Trifenil tetrazólio P.A. (Dinâmica) e as bactérias das espécies *Staphylococcus aureus* (ATCC12600), que é uma cepa padrão, *Klebsiella pneumoniae* (KIP 17), *Klebsiella pneumoniae* (KIP 34) e *Pseudomonas aeruginosa* (PSA13), são bactérias multirresistentes que foram coletadas de pacientes da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas.

6.1.2. Métodos

6.1.2.1. Preparo da formulação nanoestruturada com ácido graxo

Para preparação da formulação nanoestruturada de monoacilglicerol com ácido graxo, primeiramente 0,35 g do monoacilglicerol foi pesado em balança analítica e misturado a 0,1 g de ácido graxo sob agitação magnética à temperatura ambiente até a completa dissolução do ácido ao monoacilglicerol. Posteriormente foi adicionado 2,4 g de Tween 20 sob agitação magnética à temperatura ambiente até a total homogeneização dos mesmos, adicionando-se água até completar 10 mL de solução. A mistura foi submetida a agitação magnética até a homogeneização da mesma. A Figura 30 mostra a representação do preparo da formulação nanoestruturada.



Figura 30. Representação do preparo da formulação nanoestruturada.

Para o preparo da formulação nanoestruturada com o ácido graxo foram incorporadas à formulação os seguintes ácidos graxos apresentados na Tabela 10, com suas respectivas estruturas e massa molar.

Nome IUPAC (Nome Comum)	Símbolo *(Cx:n)	Estrutura Química	Massa Molar (g.mol ⁻¹)
Ácido octanóico (Ácido caprílico)	C8:0		144
Ácido decanóico (Ácido cáprico)	C10:0		172
Ácido dodecanóico (Ácido láurico)	C12:0		200
Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico)	C14:0		228

* Cx = número de átomos de carbono da cadeia carbônica; n = número de ligações duplas na cadeia carbônica.

6.1.2.2. Preparo do meio de cultura Mueller Hinton Broth

Para o preparo do meio de cultura, 21 g de Mueller Hinton Broth foi pesado em balança analítica e dissolvido em 1 L de água destilada, a solução foi aquecida até completa dissolução. Após, a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min.

6.1.2.3. Preparo da solução dos ácidos graxos em solução

Para preparação da solução de ácido graxo, primeiramente 0,1 g de ácido graxo foi pesado em balança analítica e dissolvido em 1 mL de álcool etílico P.A.. Após a homogeneização, 9 mL do meio de cultura (Mueller Hinton Broth) foram adicionados, completando 10 mL de solução a fim de que a concentração de ácidos graxos se iguale a formulação nanoestruturada citada acima.

6.1.2.4. Preparo do meio de cultura Mueller Hinton Ágar

Para o preparo do meio de cultura, 2 g de Mueller Hinton Ágar foi pesado em balança analítica e dissolvido em 100 mL de água destilada, sendo a solução foi aquecida até completa dissolução. Após, a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min.

6.1.2.5. Ativação das bactérias

As bactérias foram ativadas pela deposição do inóculo em placa com o meio de cultura Mueller Hinton Broth e incubado em estufa a 37°C por 24 h.

6.1.2.6. Teste de ação antibacteriana dos ácidos graxos encapsulados e em solução

A ação antibacteriana dos ácidos graxos foi testada com microdiluição em caldo para a determinação da CIM (concentração inibitória mínima), que é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microorganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo. Os testes foram realizados em concentrações que partiram de 5 mg.mL⁻¹ das formulações nanoestruturadas com ácidos graxos e das soluções de ácidos graxos. Para isso, foram realizadas dez diferentes concentrações com diluições seriadas a 1:2 no meio de cultura (Mueller Hinton Broth) líquido com o inóculo, conforme ilustrado na Figura 31. As placas foram incubadas a 37°C em estufa por 24 h.(CLSI, 2012)

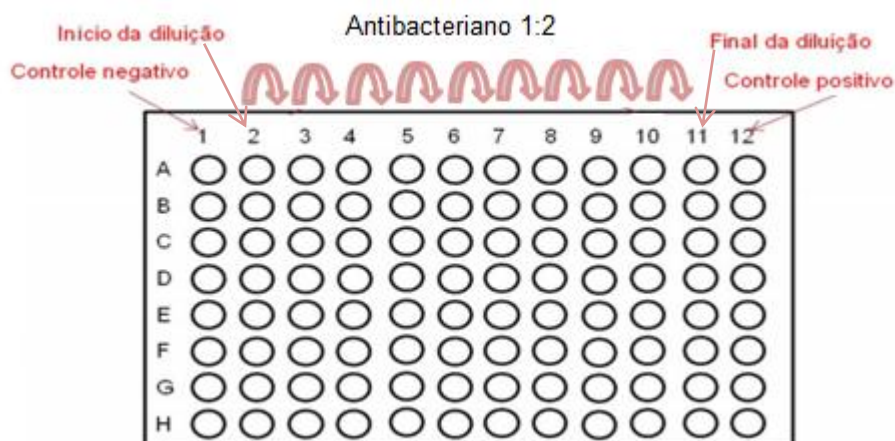


Figura 31. Esquema de microplaca utilizada para teste antibacteriano dos ácidos graxos em bactérias.

A CIM foi determinada por comparação visual do crescimento da bactéria ocorrida nos poços referentes às concentrações utilizadas com o seu crescimento no poço controle positivo, sendo considerado como a menor concentração capaz de inibir o crescimento da bactéria em relação ao poço controle positivo. A CIM foi determinada a partir da adição de 60 μL de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$, que apresenta coloração quando ocorre respiração celular. As placas então foram incubadas a 37°C em estufa por 3 h (CLSI, 2012).

6.1.2.7. Teste quanto ao composto ser bactericida ou bacteriostático

Após a determinação da CIM, foi realizado o teste quanto ao composto ser bactericida ou bacteriostático. O composto ser bactericida significa que ele possui a capacidade de eliminar de fato as bactérias e o composto ser bacteriostático significa inibir momentaneamente o crescimento da bactéria quando exposta ao composto. Para isso, foram retiradas alíquotas dos poços que apresentaram resultados positivos e colocadas em placas de petri com meio sólido (Mueller Hinton Ágar). As placas foram incubadas a 37°C em estufa por 24 h (CLSI, 2012).

6.2. Instrumentação para Caracterização

Para a caracterização das formulações nanoestruturadas obtidas, foram realizadas análises do raio hidrodinâmico, do índice de polidispersão, do potencial zeta, da condutividade, da mobilidade eletroforética e do pH.

6.2.1. Tamanho de gotícula e estabilidade

Para obter o raio hidrodinâmico, o índice de polidispersão, o potencial zeta, a condutividade e a mobilidade eletroforética foi utilizado o aparelho Particle Analyzer – Litesizer 500 da marca AntonPaar, a uma temperatura de 25°C. O equipamento tem como princípio, para medições destes parâmetros, a dispersão de luz dinâmica (DLS), espalhamento de luz eletroforética (ELS) e espalhamento de luz estática (SLS). As amostras foram analisadas sem diluição nos tempos de 1, 30 e 45 dias após o preparo das formulações. A Figura 20 na parte 2 mostra a imagem do equipamento utilizado nas análises das formulações.

6.2.2. Determinação do valor de pH

Para a determinação do pH foi utilizado o pHmetro marca: MS – Tecnopon Instrumentação, modelo: mPA – 210. O sistema foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. A Figura 21 na parte 2 mostra a imagem do equipamento utilizado nas análises das formulações.

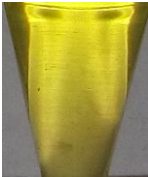
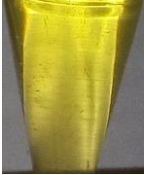
6.3. Resultados e discussões

A seguir serão apresentados e discutidos de forma sistemática a metodologia empregada no preparo das formulações nanoestruturadas com ácidos graxos e os resultados obtidos nos testes de ação antibacteriana.

6.3.1. Caracterização da formulações nanoestruturadas

Os resultados obtidos na caracterização quanto ao raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade, mobilidade eletroforética e pH das formulações nanoestruturadas com os ácidos graxos saturados octanóico (caprílico), decanóico (cáprico), dodecanóico (láurico) e sem estes compostos ativos são apresentados na Tabela 11. Cabe ressaltar que o ácido graxo tetradecanóico (mirístico) não foi solúvel no monoacilglicerol e, portanto, não foi testado.

Tabela 11. Resultados da caracterização das formulações nanoestruturadas com e sem os compostos ativos

Amostra	Foto	pH	Tempo (Dias)	RH (nm)	IPD (%)	PZ (mV)	CD (mS.cm ⁻¹)	ME (μm.cm.Vs ⁻¹)
Sem Ativo		7,0	1	20	20,5	-5,1	1,7	-0,4
			30	34	21,6	-1,4	1,7	-0,1
			45	24	26,1	-0,2	1,8	-0,02
Ácido Caprílico		6,0	1	51	23,9	-3,6	1,7	-0,3
			30	30	23,8	-1,6	1,7	-0,1
			45	19	24,2	-0,2	1,7	-0,01
Ácido Cáprico		6,3	1	779	25,3	-4,8	1,6	-0,4
			30	51	37,8	-0,6	1,6	-0,05
			45	51	27,6	-0,6	1,7	-0,05
Ácido Láurico		6,5	1	30	23,2	-3,2	1,6	-0,2
			30	31	21,3	-1,1	1,6	-0,1
			45	22	22,9	-2,1	1,6	-0,2

RH (Raio hidrodinâmico); IPD (Índice de polidispersão); PZ (Potencial zeta); CD (Condutividade); ME (Mobilidade eletroforética);

Observa-se na Tabela 11 que os resultados foram satisfatórios, uma vez que, em quase todos os casos, os raios hidrodinâmicos apresentaram resultados inferiores a 100 nm. Com relação ao ácido cáprico, o valor 779 nm

pode ser considerado um ponto fora da curva, visto que os valores em tempos posteriores foram menores.

O RH medido para a formulação contendo ácidos graxos é maior que os valores obtidos para as formulações sem ativo, o que indica que o encapsulamento destes ativos afeta o tamanho das gotículas nas formulações nanoestruturadas. Nota-se que houve uma redução nos valores ao longo do tempo. Esta observação sugere que tenha ocorrido uma modificação na estrutura das gotículas ao longo do tempo, que os ácidos graxos estejam adsorvidos na superfície das gotículas e que as interações entre o ácido e os outros componentes da formulação possibilitam a sua incorporação na gotícula e o acomodamento das cadeias ao longo do tempo. Os resultados de PZ e ME corroboram com esta hipótese, tendo em vista a diminuição, em módulo, dos valores ao longo do tempo.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias carbônicas de médio e longo comprimento. O tamanho destas cadeias é um dos fatores que afeta a sua solubilidade, bem como o grau de dissociação em meio aquoso. Os ácidos graxos são considerados fracos, o que indica um baixo grau de dissociação.

O índice de polidispersão é relativamente estreito, também apresentou uniformidade nos resultados. A polidispersão mostra que o tamanho das nanoestruturas varia, de modo geral, entre 20 e 30% do valor do RH determinado.

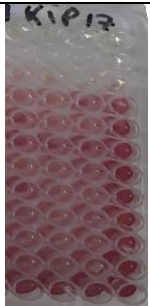
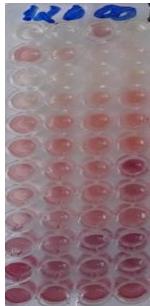
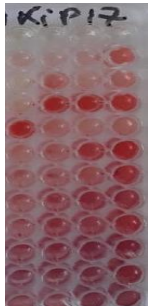
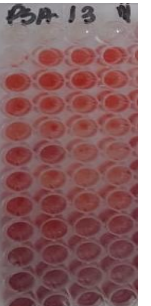
Com relação a condutividade elétrica, observa-se que não houve uma alteração expressiva nos resultados, que ficaram em torno de 1,6 e 1,8 mS/cm, em quase todos os casos sem variação ao longo do tempo. Considerando-se que os ácidos graxos apresentam um grau de dissociação muito pequeno, a quantidade de íons em solução também é pequena, o que não afeta expressivamente a condutividade na solução.

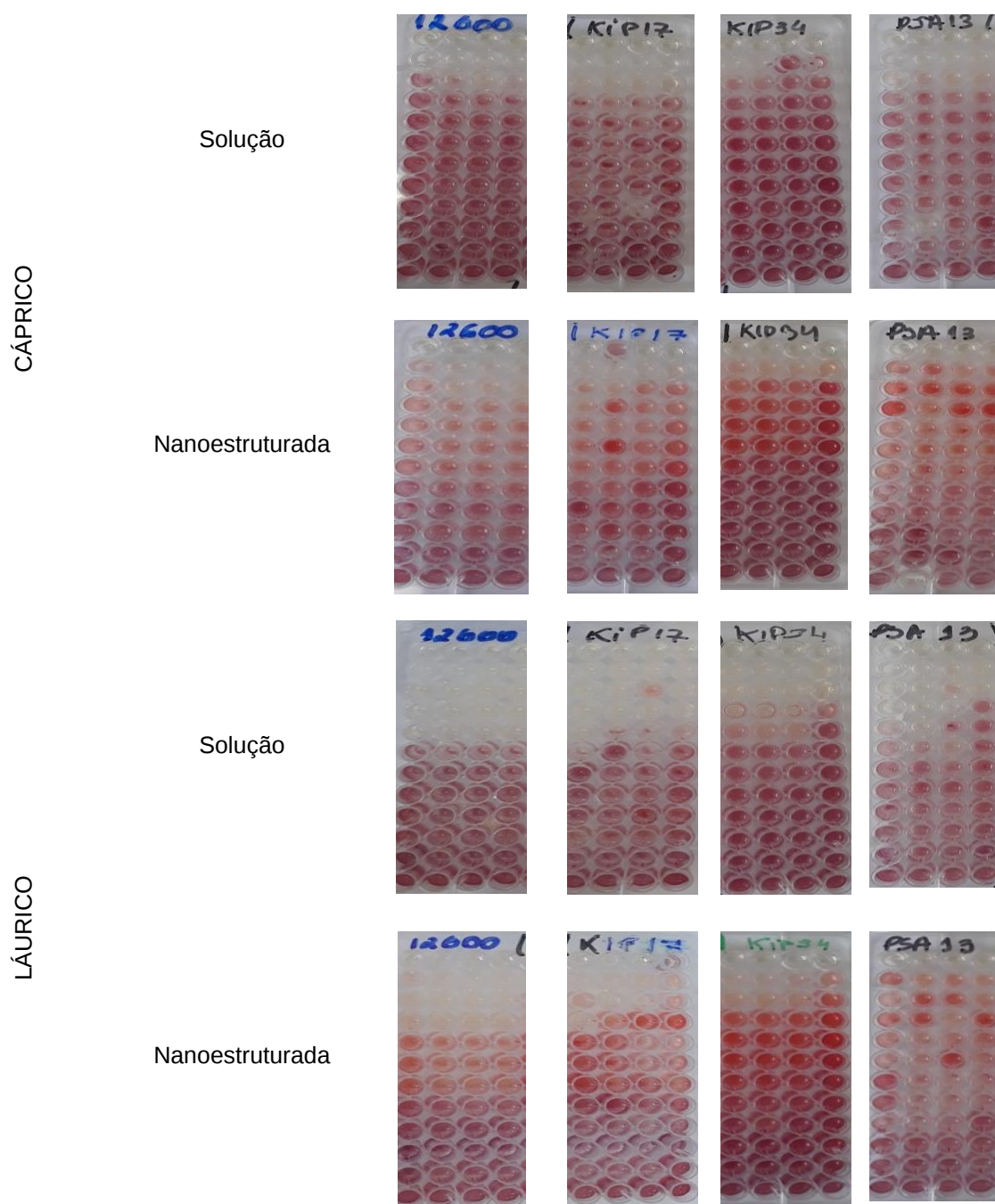
Com relação ao valor do pH, o resultado obtido, no geral, foi satisfatório, pois as formulações com ácidos graxos apresentaram um pH entre 6 e 7, provavelmente por se tratar de um ácido encapsulado na formulação. Conforme esperado, a formulação sem o ativo apresentou um pH neutro. Por esse motivo, o produto encapsulado pode ser aplicado em diversas áreas, incluindo aplicações em meio biológico. Comparando-se os resultados entre os

ácidos graxos (Caprílico, pH=6, mm=144 g.mol⁻¹; Cáprico, pH=6,3, mm=172 g.mol⁻¹; Láurico, pH=6,5, mm=200 g.mol⁻¹), observa-se que os valores de pH são diretamente proporcionais ao aumento da massa molar, o que se deve provavelmente ao fato do uso dos ácidos graxos terem sido calculados em proporção mássica, ou seja, a concentração molar para o composto de cadeia carbônica maior (ácido láurico) é menor do que a concentração molar para o composto de cadeia carbônica menor (ácido caprílico).

6.3.2. Testes biológicos

Os resultados obtidos com o uso das soluções dos ácidos graxos octanóico (caprílico), decanóico (cáprico), dodecanóico (láurico) e das suas formulações nanoestruturadas para as bactérias das espécies *Staphylococcus aureus* (ATCC12600) que é uma cepa padrão, *Klebsiella pneumoniae* (KIP17), *Klebsiella pneumoniae* (KIP34) e *Pseudomonas aeruginosa* (PSA13) que são bactérias multirresistentes coletadas de pacientes da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados obtidos nos testes biológicos					
Ácido Graxo	Formulação	Espécie de bactéria			
		ATCC12600	KIP17	KIP34	PSA13
CAPRÍLICO	Solução				
	Nanoestruturada				



Cabe ressaltar que a formulação nanoestruturada sem ativo e a solução sem ativo foram testadas para as referidas bactérias e apresentaram resultado negativo, ou seja, somente o veículo não tem ação bactericida ou bacteriostática.

Complementando a Tabela 12, a Tabela 13 mostra a CIM obtidas nos testes com uso das soluções dos ácidos graxos caprílico, cáprico, láurico e das suas formulações nanoestruturadas para as bactérias das espécies

Staphylococcus aureus (ATCC12600), *Klebsiella pneumoniae* (KIP17), *Klebsiella pneumoniae* (KIP34) e *Pseudomonas aeruginosa* (PSA13).

Tabela 13. Concentração inibitória mínima dos ácidos graxos para as respectivas bactérias

Ácido Graxo	Formulação	Espécie			
		ATCC12600	KIP17	KIP34	PSA13
		CIM (mg.mL ⁻¹)			
CAPRÍLICO	Solução	2,5	2,5	2,5	5
	Nanoestruturada	-	-	-	-
CÁPRICO	Solução	2,5	2,5	5	5
	Nanoestruturada	2,5	2,5	5	5
LÁURICO	Solução	0,625	0,625	2,5	2,5
	Nanoestruturada	2,5	2,5	5	-

Nesse estudo, pode-se observar que o ácido graxo caprílico em solução apresentou CIM de 2,5 mg.mL⁻¹ para as bactérias ATCC12600, KIP17 e KIP34, e de 5 mg.mL⁻¹ para a bactéria PSA13, o que mostra a necessidade de uma maior quantidade deste ácido graxo em solução para inibir o crescimento da bactéria. Entretanto, na presença da formulação nanoestruturada, nenhuma das bactérias se apresentou sensível à ação do ácido graxo encapsulado nas concentrações testadas do referido composto.

O ácido graxo cáprico em solução apresentou CIM de 2,5 mg.mL⁻¹ para as bactérias ATCC12600 e KIP 17, e de 5 mg.mL⁻¹ para as bactérias KIP34 e PSA13, sendo, portanto, as duas primeiras bactérias mais sensíveis à presença deste ácido graxo em solução. Todas as bactérias mostraram-se sensíveis à presença do ácido graxo cáprico encapsulado, apresentando os mesmos valores de CIM determinados para o ácido graxo em solução. Ao contrário do ácido graxo caprílico encapsulado, o ácido graxo cáprico apresenta atividade biológica para estas bactérias escolhidas, nas concentrações estudadas.

Para o ácido graxo láurico em solução, o composto apresentou CIM de 0,625 mg.mL⁻¹ para as bactérias ATCC12600 e KIP 17, e de 2,5 mg.mL⁻¹ para as bactérias KIP 34, PSA13. O ácido graxo láurico encapsulado apresentou atividade biológica contra as bactérias ATCC12600, KIP 17 e KIP 34, porém, foi necessária uma concentração maior do ativo encapsulado para que fosse

inibido o crescimento destas bactérias. A bactéria PSA13 não se mostrou sensível à formulação contendo o ácido graxo láurico encapsulado.

Todos os ácidos graxos em solução apresentaram atividade biológica contra as bactérias estudadas, sendo que as bactérias ATCC12600 e KIP17 foram mais sensíveis. Cabe salientar que a bactéria KIP 17 é considerada uma bactéria multirresistente, ou seja, é resistente à maioria dos antibióticos disponíveis. Pode ser observado que o ácido graxo mais eficiente em solução foi o ácido láurico, pois apresentou as menores concentrações necessárias para inibir o crescimento das bactérias.

Observa-se que os resultados para as formulações nanoestruturadas contendo os ácidos graxos não foram melhores que os resultados obtidos para os ácidos graxos em solução. Ainda assim, a formulação que apresentou o melhor resultado foi aquela contendo o ácido graxo cáprico, com atividade semelhante ao ativo em solução. O fato dos ácidos graxos estarem encapsulados pode interferir, por exemplo, na taxa de liberação deste ativo em solução.

Como exposto anteriormente, moléculas anfifílicas que contêm um grupo hidrofílico e um domínio de cadeia carbônica hidrofóbica, mediante adição de água formam estruturas de auto-organização, denominadas fases cristalinas líquidas (WANG *et al.*, 2018).

Substâncias hidrofóbicas adicionadas a um sistema líquido cristalino são incorporadas entre as caudas lipídicas, perturbando o empacotamento da mesofase e aumentando a repulsão no domínio das caudas, para fornecer um mecanismo promissor de liberação (WANG *et al.*, 2018). Por esse motivo, possivelmente os ácidos graxos podem ter ficado adsorvidos na superfície ou na interface, entre a fase óleo e a fase aquosa da nanoestrutura, estabilizadas ao longo do tempo. O que corrobora com o resultado obtido para o RH, já que a formulação contendo ácidos graxos apresentou RH maior que os valores obtidos para as formulações sem ativo, e que houve uma redução nos valores ao longo do tempo, justificando que o resultado em solução apresentou atividade melhor que o ácido graxo encapsulado. Porém, mais estudos são necessários para que se possa compreender os fatores que afetam a atividade dos ácidos graxos encapsulados.

6.3.3. Teste quanto ao composto ser bactericida ou bacteriostático

Como exposto anteriormente, este teste indica se o composto é bactericida ou bacteriostático. O composto ser bactericida significa que ele possui a capacidade de eliminar de fato as bactérias e o composto ser bacteriostático significa inibir momentaneamente o crescimento da bactéria quando exposta ao composto. Para tal, alíquotas dos poços que apresentaram resultados positivos, ou seja, não apresentaram respiração celular, foram colocadas em placas de petri com meio sólido (Mueller Hinton Ágar), e incubadas. O objetivo deste teste é verificar se há crescimento das bactérias.

Os testes foram realizados com todas as soluções e formulações nanoestruturadas que apresentaram resultado positivo para a inibição do crescimento bacteriano nas microplacas. A Figura 32 mostra a imagem da placa onde foram realizados os testes para o ácido graxo láurico em solução para a bactéria da espécie ATCC12600, da formulação nanoestruturada para a bactéria da espécie KIP34 e ainda da solução do ácido graxo caprílico para as bactérias das espécies KIP17 e ATCC12600.



Figura 32. Imagem da placa com o resultado, por exemplo, do teste realizado para verificar se o composto ativo é bactericida ou bacteriostático

Os resultados obtidos a partir das alíquotas retiradas das microplacas que apresentaram resultado positivo para a inibição do crescimento das bactérias indicaram que os compostos são bacteriostáticos, ou seja, houve

crescimento de todas as espécies de bactérias estudadas. O crescimento observado ocorreu tanto nas placas contendo os ácidos graxos em solução quanto nas placas contendo os ácidos graxos encapsulados, o que indica uma inibição momentânea no crescimento das bactérias, mas não as matam efetivamente. Assim, pode-se afirmar que os ácidos graxos, em solução ou encapsulados não são bactericidas, mas podem inibir momentaneamente o crescimento das bactérias, o que os classifica como substâncias bacteriotáticas.

Conclusão

7. Conclusão

De acordo com a primeira proposta deste trabalho, a etapa de síntese do monoacilglicerol foi possível através da glicerólise de ésteres etílicos (biodiesel) com resultados promissores de 98% de conversão do biodiesel em acilgliceróis e rendimento em monoacilgliceróis de 76%. Os ésteres etílicos foram obtidos com alta pureza pelo método TDSP, com conversão de 97% do óleo de linhaça com álcool etílico. O produto foi obtido sem utilização de solventes tóxicos.

Neste sentido, os monoacilgliceróis produzidos apresentam-se como transportadores seguros e biodegradáveis porque são elaborados com ingredientes não tóxicos e não irritantes, atendendo ao outro objetivo deste trabalho que foi a preparação de formulações nanoestruturadas lipídicas a partir do monoacilglicerol.

Em relação ao preparo das formulações nanoestruturadas, estas apresentaram resultados promissores, visto que a melhor formulação apresentou um tamanho de gotícula pequeno, com raio hidrodinâmico de 19 nm, ideal pois esta dimensão nano apresenta benefícios, incluindo biodisponibilidade aumentada, aumento da estabilidade a longo prazo e alta clareza óptica. A formulação também apresentou ótimos resultados em condições de estresse térmico e centrifugação, o que indica a sua estabilidade.

Outro objetivo deste trabalho foi encapsular ácidos graxos ativos na formulação nanoestruturada. Foi observado um resultado de tamanho de gotícula pequeno na presença do ativo e observou-se uma estabilidade até 45 dias para estas formulações.

Em relação a avaliação das formulações nanoestruturadas com ácidos graxos como agentes antibacterianos, os resultados se mostraram em parte promissores, pois apresentaram CIM com o ácido graxo láurico, por exemplo, de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, porém não foi melhor do que o resultado obtido com o ácido graxo em solução. São necessários testes posteriores para avaliação da taxa de liberação do ativo para melhor avaliação das formulações.

Por fim, conclui-se que as formulações nanoestruturadas lipídicas preparadas, apresentam características para uso na veiculação de compostos hidrofóbicos com possível aplicação em diferentes áreas como alimentícia, farmacêutica, cosmética e medicinal.

Sugestões para trabalhos futuros

8. Sugestões para trabalhos futuros:

- Testar a toxicidade da formulação nanoestruturada sem ativo e com os ácidos graxos encapsulados;
- Determinar a taxa de liberação dos ácidos graxos encapsulados na formulação nanoestruturada;
- Testar outras espécies de bactérias, principalmente com o ácido graxo que apresentou melhor resultado para as espécies de bactérias testadas até o momento;
- Avaliar o encapsulamento de novas substâncias como vitaminas e fármacos na formulação nanoestruturada preparada.

Referências

9. Referências

- ALI, A.; ANSARI, V. A.; AHMAD, U.; AKHTAR, J.; JAHAN, A. Nanoemulsion : An advanced vehicle for efficient drug delivery. **Drug Research**, v. 1, p. 1–15, 2017.
- BANCQUART, S.; VANHOVE, C.; POUILLOUX, Y.; BARRAULT, J. Glycerol transesterification with methyl stearate over solid basic catalysts I . Relationship between activity and basicity. **Applied Catalysis A: General**, v. 218, p. 1–11, 2001.
- BASSO, R. C.; MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, E. A. C. Experimental data, thermodynamic modeling and sensitivity analyses for the purification steps of ethyl biodiesel from fodder radish oil production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 341–353, 2017.
- BHATT, P.; MADHAV, S. A detailed review on nanoemulsion drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, p. 2482–2489, 2011.
- BUNKA, F.; PAVLÍNEK, V.; HRABĚ, J.; ROP, O. R. J.; KREJCI, J. Effect of 1-Monoglycerides on viscoelastic properties of processed cheese. **International Journal of Food Properties**, v. 2912, p. 819–828, 2007.
- ČERNOCH, M.; HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Ethanolysis of rapeseed oil – distribution of ethyl esters , glycerides and glycerol in ester and glycerol phase. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2071–2075, 2010.
- CHRISTIE, W. W.; HAN, X. **Lipid analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis**. Washington: Oily Press., 2010.
- ÇINAR, K. A review on nanoemulsions: preparation methods and stability. **Trakya University Journal of Engineering Sciences**, v. 18, p. 73–83, 2017.
- CLSI. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada - Sexta edição**, 2012.
- CZLONKA, S.; BERTINO, M. F.; KOSNY, J.; STRAKOWSKA, A.; MASLOWSKI, M.; STRZELEC, K. Linseed oil as a natural modifier of rigid polyurethane foams. **Industrial Crops & Products**, v. 115, p. 40–51, 2020.
- DALTIN, D. **Tensoativos: Química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.
- DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; GANDHI, M. Nanoemulsion ingredients and components. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 1–5, 2018.
- DIAS, T. P. V. B.; NETO, P. M.; ANSOLIN, M.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.;

BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. Liquid - liquid equilibrium for ternary systems containing ethylic biodiesel + anhydrous ethanol + refined vegetable oil (sunflower oil, canola oil and palm oil): experimental data and thermodynamic modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p. 699–706, 2015.

DRAPCHO, C. M.; NGHIM, N. P.; WALKER, T. **Biodiesel in: Biofuels engineering process technology**. McGraw-Hill, 2008.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. DE M. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo, Artliber, 2006.

FORMARIZ, T. P.; CRISTINA, M.; URBAN, C.; ANTÔNIO, A.; PALMIRA, M.; GREMIÃO, D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 301–313, 2005.

FREITAS, C.; MULLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, p. 221–229, 1998.

FREITAS, L.; BUENO, T.; HABER, V.; CASTRO, H. F. Monoglicerídeos: Produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 31, p. 1514–1521, 2008.

GELBARD, G.; BRES, O.; VARGAS, R. M.; VIELFAURE, F.; SCHUCHARDT, U. F. ¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 72, p. 1239–1241, 1995.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against , microbial spoilage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 392–397, 2014

GUZATTO, R.; DEFFERRARI, D.; REIZNAUTT, Q. B.; CADORE, Í. R.; SAMIOS, D. Transesterification double step process modification for ethyl ester biodiesel production from vegetable and waste oils. **Fuel**, v. 92, p. 197–203, 2012.

HE, Y.; LI, J.; KODALI, S.; CHEN, B.; GUO, Z. The near-ideal catalytic property of *Candida antarctica* lipase A to highly concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via one-step ethanolysis of triacylglycerols. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 466–478, 2016.

HO, D. P.; HAO, H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 742–749, 2014.

HUANG, J.; WANG, Q.; LI, T.; XIA, Q. Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil and lipoic acid micro-encapsulation: study on preparation and in vitro

characterization. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 98, p. 1513–1523, 2018.

HUANG, J.; WANG, Q.; SUN, R.; LI, T.; XIA, N. A novel solid self-emulsifying delivery system (SEDS) for the encapsulation of linseed oil and quercetin: Preparation and evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 226, p. 22–30, 2018.

HUANG, J.; YANG, Z.; GUAN, F.; ZHANG, S.; CUI, D. A novel mono- and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its application for food emulsifier preparation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1899–1904, 2013.

ISAACS, C. E.; LITOV, R. E.; THORMARS, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **Nutritional Biochemistry**, 6, pp. 362–366, 1995.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 285, p. 388–394, 2005.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion : an advanced mode of drug delivery system. **Biotechnology**, v. 5, p. 123–127, 2015.

JEBRANE, M.; CAI, S.; SANDSTRÖM, C.; TERZIEV, N. The reactivity of linseed and soybean oil with different epoxidation degree towards vinyl acetate and impact of the resulting copolymer on the wood durability. **Express Polymer Letters**, v. 11, p. 383–395, 2017.

JINTAPATTANAKIT, A. Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method. **Pharmaceutical Science of Ásia**, v. 45, p. 1–12, 2018.

JR, I. I.; GONC, K. M.; CORDEIRO, Y. M. L.; ZOUMPANIOTI, M.; LEAL, I. C. R. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 96, p. 34–39, 2013.

KARMAKAR, A.; KARMAKAR, S.; MUKHERJEE, S. Bioresource Technology Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7201–7210, 2010.

KAUR, N.; ALI, A. Biodiesel production via ethanolysis of jatropha oil solid catalyst. **RSC Advances**, v. 5, p. 13285–13295, 2015.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 342, p. 231–239, 2007.

KENAR, J. A. Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, p. 88–96, 2004.

KHAN, S.; BABOOTA, S.; ALI, J.; KHAN, S.; NARANG, R. S.; NARANG, J. K. Nanostructured lipid carriers: An emerging platform for improving oral bioavailability of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 5, p. 182–191, 2015.

KHEAWFU, K.; PIKULKAEW, S.; RADES, T.; MÜLLERTZ, A.; OKONOGI, S. Development and characterization of clove oil nanoemulsions and self-microemulsifying drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 330–338, 2018.

KNOTHE, G.; KENAR, J. A. Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, p. 88–96, 2004.

KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 21, p. 21–43, 2012.

LANGONE, M. A. P.; ABREU, M. E.; REZENDE, M. J. C.; JR, G. L. S. Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 987–996, 2002.

LENARDÃO, E. J.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, C. F. Green chemistry – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123–129, 2003.

LIU, Y.; WANG, L.; ZHAO, Y.; HE, M.; ZHANG, X.; NIU, M.; FENG, N. Nanostructured lipid carriers versus microemulsions for delivery of the poorly water-soluble drug luteolin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, p. 169–177, 2014.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 5353–5363, 2005.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current state of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 626–639, 2011.

LOZANO, P.; GOMEZ, C.; NIETO, S.; SANCHEZ-GOMEZ, G.; GARCIA-VERDUGO, E.; LUIS, S. V. Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 19, p. 390–396, 2017.

LUO, H.; ZHAI, Z.; FAN, W.; CUI, W.; NAN, G.; LI, Z. Monoacylglycerol synthesis by glycerolysis of soybean oil using alkaline ionic liquid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, p. 4923–4928, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, p. 2297–2316, 2011.

MEHANNA, M.; MOTAWAA, A.; SAMAHA, M. Pharmaceutical particulate carriers: Lipid - based carriers. **National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology**, v. 2, p. 10–22, 2012.

MORENO-PEREZ, S.; LUNA, P.; SEÑORANS, J.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ, G. Synthesis of sn-2 docosahexaenoyl monoacylglycerol by mild enzymatic transesterification of docosahexaenoic acid ethyl ester and glycerol in a solvent-free system. **Cogent Food & Agriculture**, v. 89, p. 1–7, 2016.

MORENO-PEREZ, S.; LUNA, P.; SEÑORANS, J.; ROCHA-MARTIN, J.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Enzymatic transesterification in a solvent-free system: synthesis of sn-2 docosahexaenoyl monoacylglycerol. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 2422, p. 1–6, 2017.

MORGENSTERN, M.; CLINE, J.; MEYER, S.; CATALDO, S. Determination of the Kinetics of biodiesel production using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR). **Energy & Fuels**, v. 20, p. 1350–1353, 2006.

NASIRPOURI, F. **Electrodeposition of nanostructured materials**. Trabiz, Springer, 2017.

NETO, O. Z. S.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. DE A. The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. **Jornal of Cleaner Production**, v. 180, p. 866–875, 2018.

NICULAE, G.; LACATUSU, I.; BADEA, N.; MEGHEA, A.; STAN, R. Influence of vegetable oil on the synthesis of bioactive nanocarriers with broad. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, p. 837–850, 2014.

NITBANI, F. O.; SISWANTA, D.; SOLIKHAH, E. N. Review article reaction path synthesis of monoacylglycerol from fat and oils. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 35, pp. 126–136, 2015.

NOUREDDINI, H.; MEDIKONDURU, V. Glycerolysis of Fats and Methyl Esters. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 74, p. 419–425, 1997.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 1–3, 2007.

PETRA, S.; RENATA, A.; VERA, K.; ERNESTO, R.; TOMAS, S.; MIROSLAV, P. Supercritical assisted atomization of emulsions for encapsulation of 1-monoacylglycerols in an hydrophilic carrier. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 183–191, 2015.

PILEGGI, R. G.; STUDART, A. R.; PANDOLFELLI, V. C. Um modelo para previsão da viscosidade mínima de suspensões cerâmicas. **Cerâmica**, v. 46, p. 160-165, 2000

PINZI, S.; GARCIA, I. L.; CASTRO, M. D. L.; DORADO, G.; DORADO, M. P.

The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 2325–2341, 2009.

POONIA, N.; KHARB, R.; LATHER, V.; PANDITA, D. Nanostructured lipid carriers : versatile oral delivery vehicle. **Future Science**, v. 2, p. 135–158, 2016.

RAROKAR, N. R.; MENGHANI, S.; KERZARE, D.; KHEDEKAR, P. B. Journal of experimental food progress in synthesis of monoglycerides for use in food and pharmaceuticals. **Journal of Experimental Food Chemistry**, v. 3, p. 1–6, 2017.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 391, p. 95–102, 2013.

SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E.; WATZKE, H. J.; MICHEL, M. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 204–214, 2006.

SAMIOS, D.; PEDROTTI, F.; NICOLAU, A.; REIZNAUTT, Q. B.; MARTINI, D. D.; DALCIN, F. M. A Transesterification double step process — TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 599–605, 2009.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; MATHEUS, R. Transesterification of vegetable oils : a review. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199–210, 1998.

SCHULZ, G. A. S.; SILVEIRA, K. C.; LIBARDI, D. B.; PERALBA, C. R. Synthesis and characterization of mono-acylglycerols through the glycerolysis of methyl esters obtained from linseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1533–1540, 2011.

SETYA, S.; TALEGAONKAR, S.; RAZDAN, B. K. Nanoemulsions: formulation methods and stability aspects. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 3, p. 2214–2228, 2014.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; FAISAL, M. S.; SHAFIQ, S. Stability evaluation of celecoxib nanoemulsion containing Tween 80', **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 4–9, 2008.

SHUKLA, A. K. **EMR/ESR/EPR Spectroscopy for characterization of nanomaterials**. Allahabad, Springer, 2017.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 854–867, 2012.

SINGH, N. A. Nanotechnology innovations, industrial applications and patents. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 1–7, 2017.

SINGH, Y.; GOPAL, J.; RAVAL, K.; ALI, F.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion : Concepts , development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SLOBODIAN, P.; VÍCHA, R.; DOLEŽÁLKOVÁ, I. V. A.; JANIŠ, R.; BUN, L. Preparation, characterization and antibacterial activity of 1 - monoacylglycerol of adamantane-1-carboxylic acid. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 544–553, 2013.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 246–254, 2012.

SONNTAG, N. O. V. Glycerolysis of fats and methyl esters. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 59, p. 795–802, 1982.

SOUZA, J. L. S.; ADRIANA, F.; CARVALHO, P. H. A.; PEREIRA, M. P.; LUND, R. G.; PACHECO, B. S. Aliphatic fatty acids and esters : Inhibition of growth and exoenzyme production of candida , and their cytotoxicity in vitro anti-Candida effect and cytotoxicity of fatty acids and esters. **Arquives of Oral Biology**, v. 59, p. 880–886, 2014.

STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141–3155, 2011.

TAGHAVI, E.; MIRHOSSEINI, H.; RUKAYADI, Y.; RADU, S.; BIABANIKHANKAHDANI, R. Effect of microfluidization condition on physicochemical properties and inhibitory activity of nanoemulsion loaded with natural antibacterial mixture. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 645–659, 2018.

TARIQ, M.; ALI, S.; AHMAD, M.; ZAFAR, M. Identification, FT-IR, NMR (1H and 13C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 336–341, 2011.

TIWARI, R.; PATHAK, K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics , pharmacokinetics and tissue uptake. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 232–243, 2011.

WANG, X.; ZHANG, Y.; GUI, S.; HUANG, J.; CAO, J.; LI, Z. Characterization of lipid-based lyotropic liquid crystal and effects of guest molecules on its microstructure: a systematic review. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 19, p. 2023–2040, 2018.

XIA, Y.; YANG, P.; SUN, Y.; WU, Y.; MAYERS, B.; GATES, B.; YIN, Y.; KIM, F.; YAN, H. One-dimensional nanostructures: Synthesis, characterization, and

applications. **Advanced Materials**, v. 15, p. 353–389, 2003.

Yusuf, C. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007.

ZAMBIAZI, R. C. **Análise físico-química de alimentos**. Pelotas, Editora Universitária/UFPEL, 2010.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, p. 111–120, 2007.

ZENG, L.; ZHANG, Y. Impact of short-chain alcohols on the formation and stability of nano-emulsions prepared by the spontaneous emulsification method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 509, p. 591–600, 2016.

ZHANG, Y.; WANG, X.; ZOU, S.; XIE, D.; JIN, Q.; WANG, X. Synthesis of 2-docosahexaenoylglycerol by enzymatic ethanolysis. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 334–340, 2017.

ZHONG, N.; CHEONG, L. Z.; XU, X. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 97–107, 2014.

Anexos

ANEXO I. Cromatogramas dos monoacilgliceróis obtidos pelas reações de glicerólise

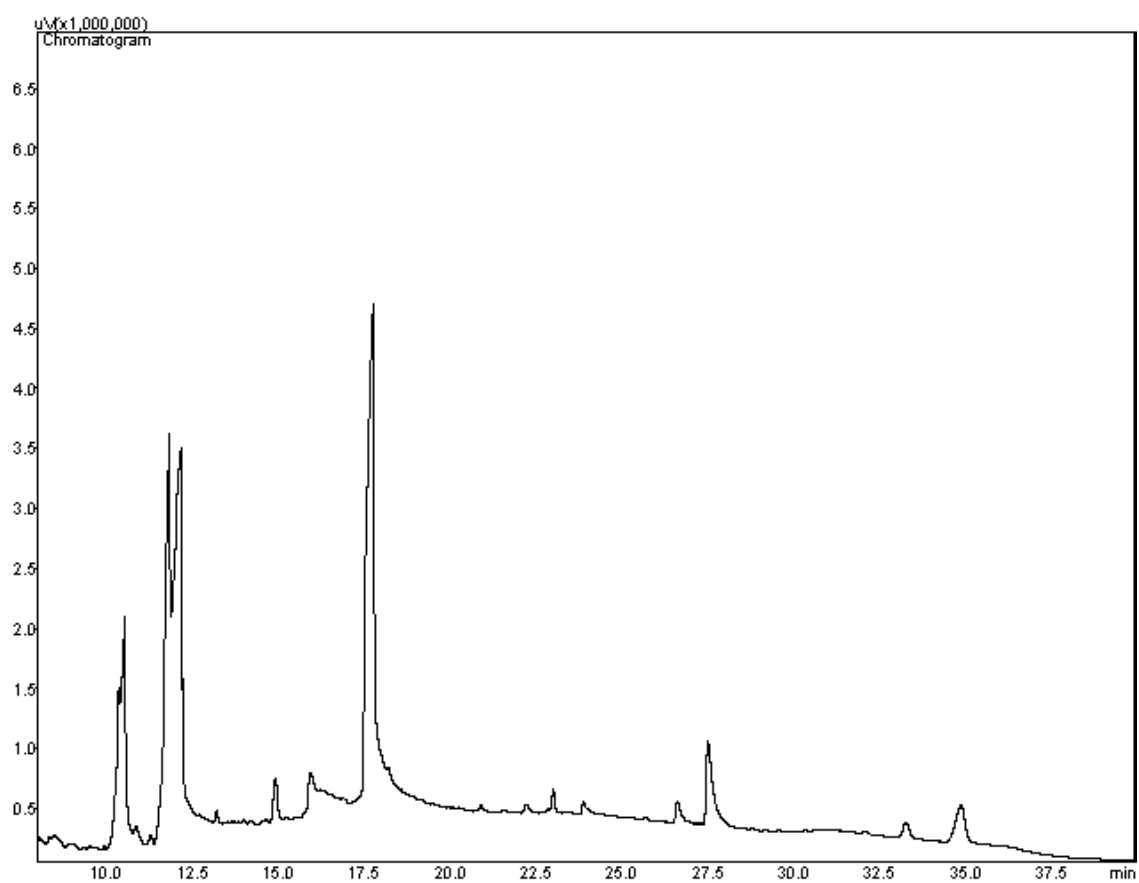


Figura 33. Cromatograma do teste M1 da reação de glicerólise

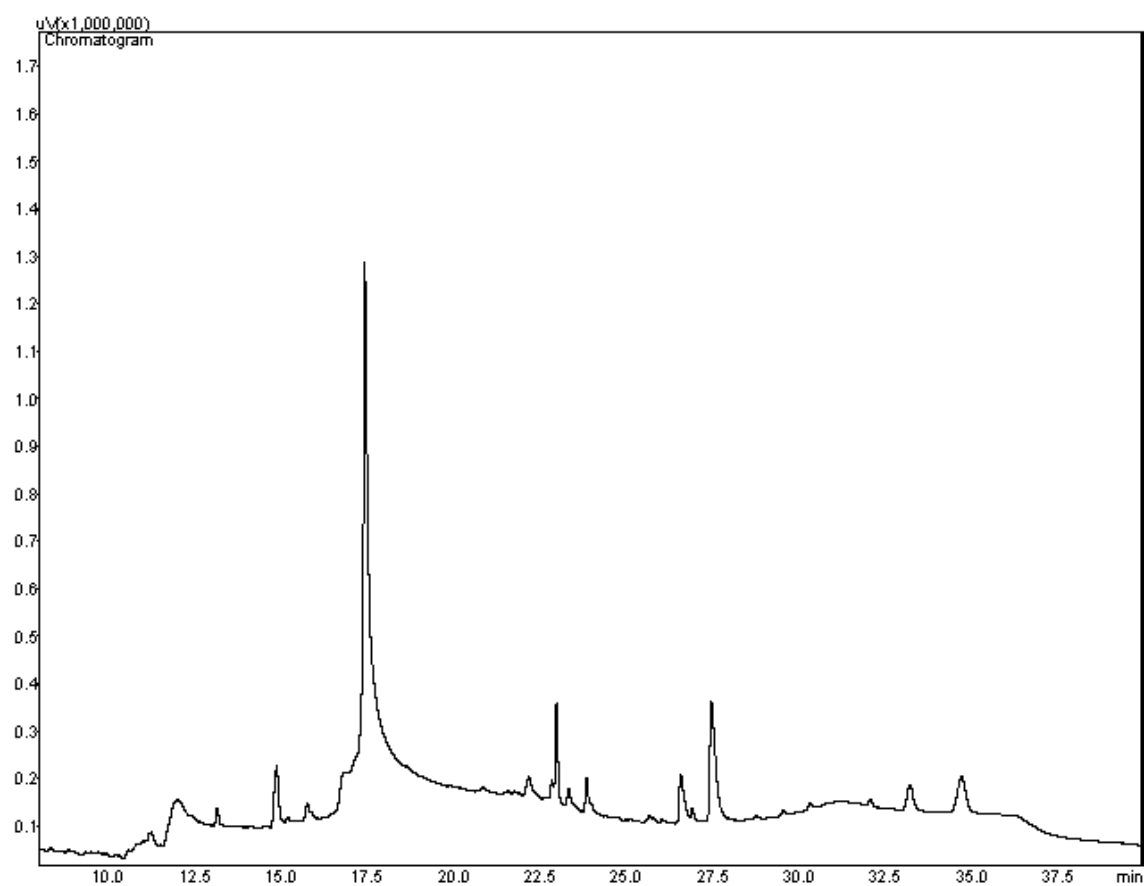


Figura 34. Cromatograma do teste M2 da reação de glicerólise

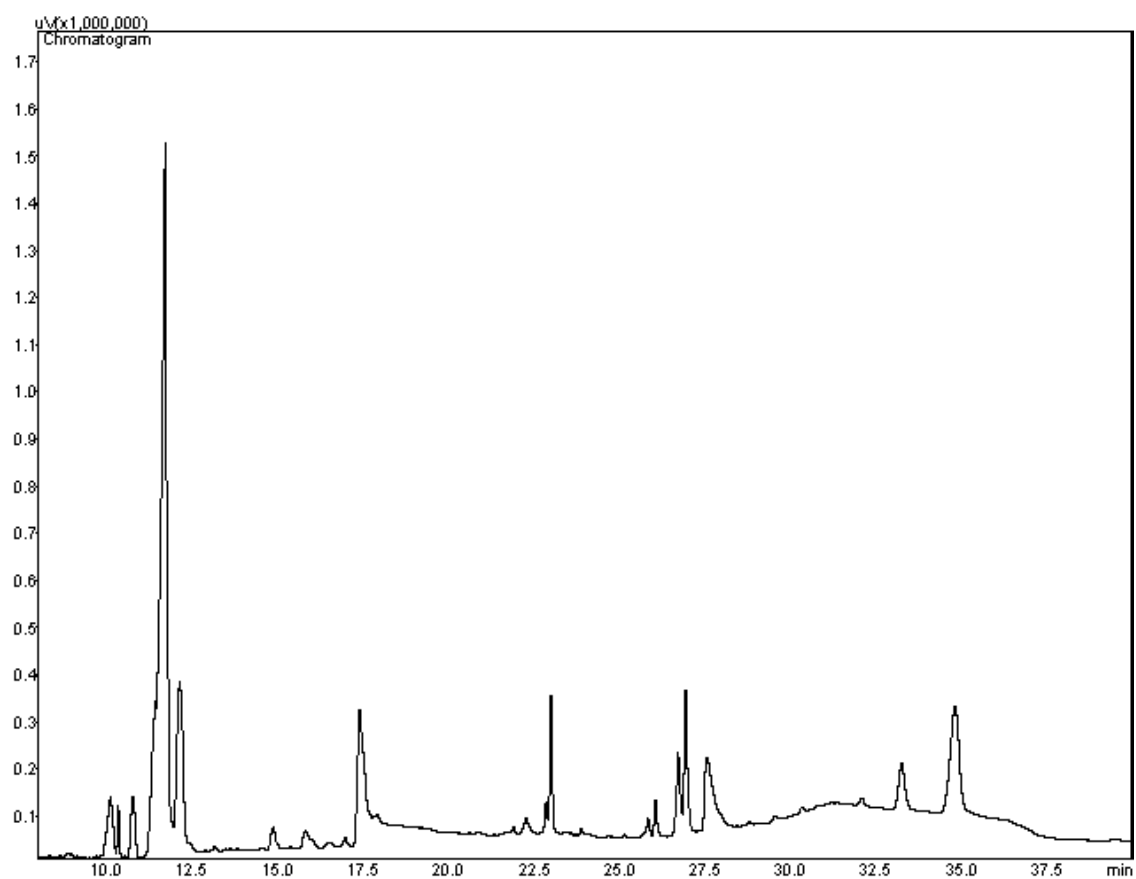


Figura 35. Cromatograma do teste M3 da reação de glicerólise

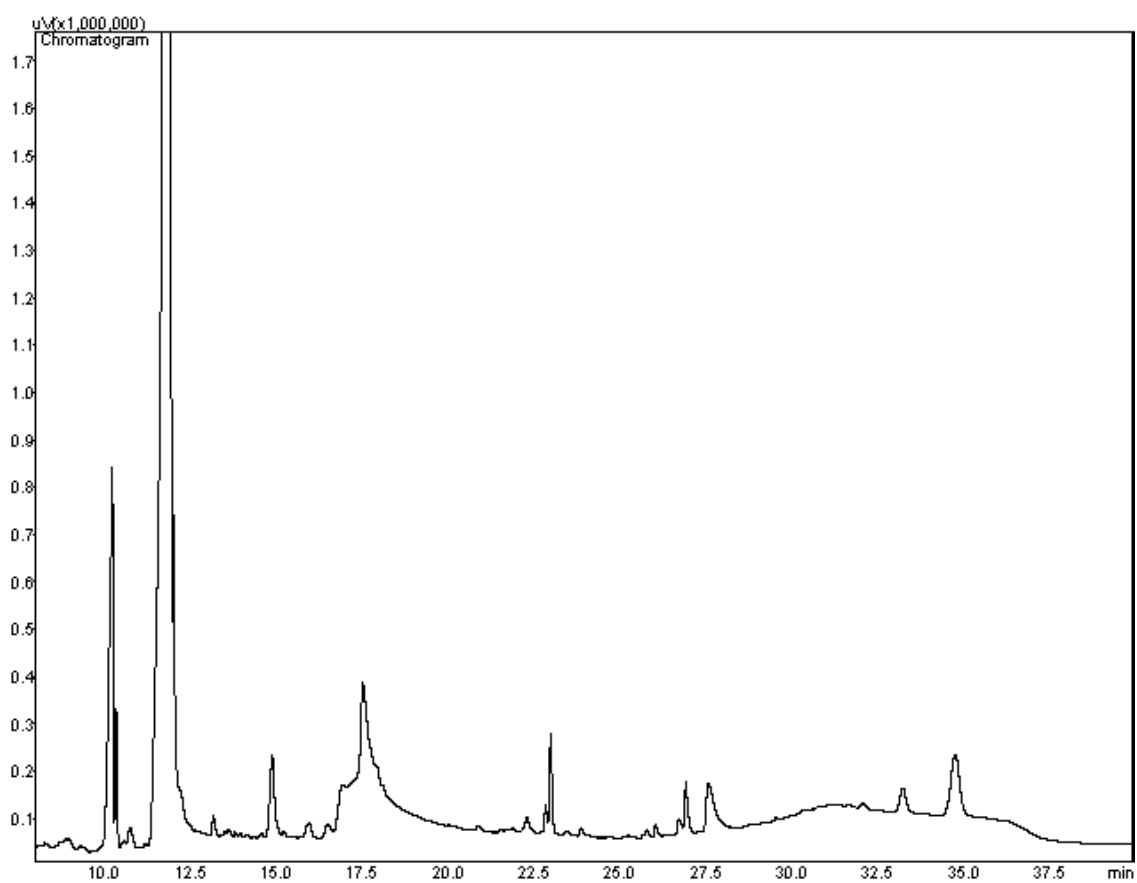


Figura 36. Cromatograma do teste M4 da reação de glicerólise

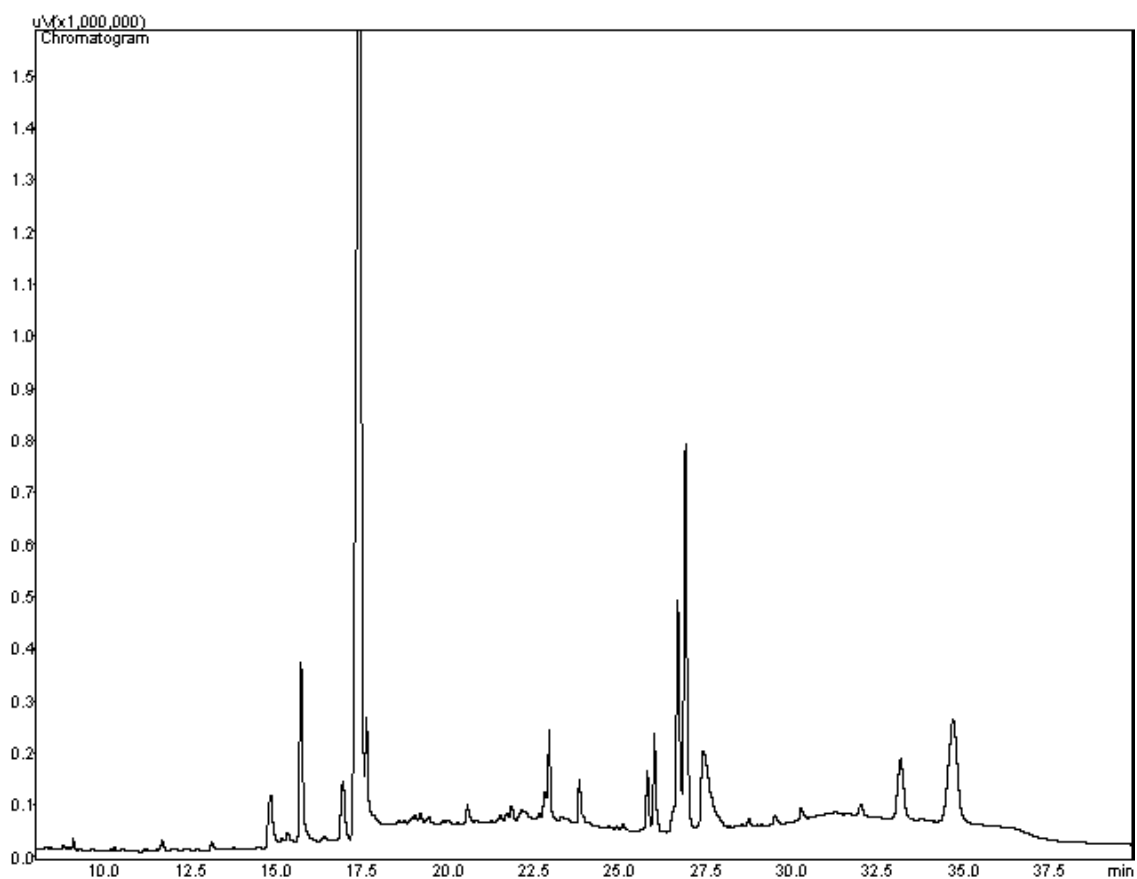


Figura 37. Cromatograma do teste M6 da reação de glicerólise

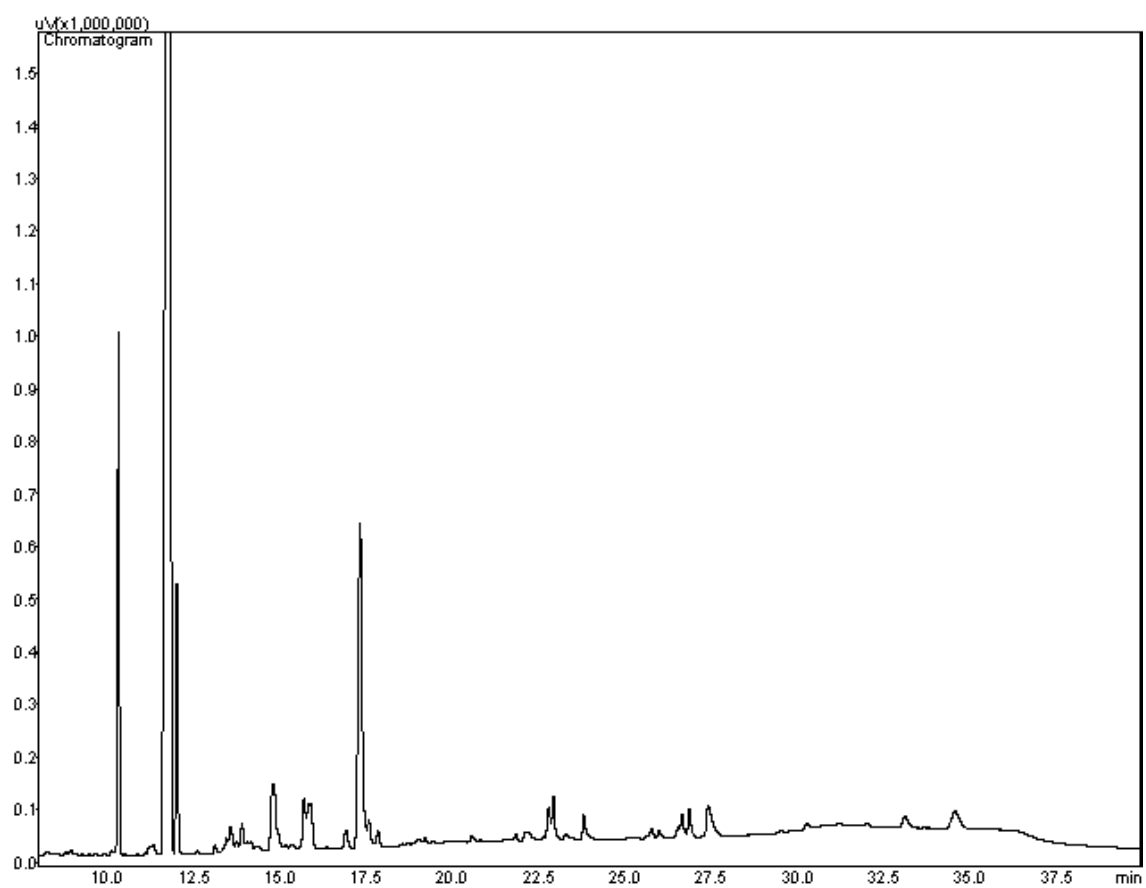
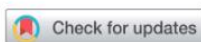


Figura 38. Cromatograma do teste M7 da reação de glicerólise



Cite this: *RSC Adv.*, 2020, 10, 2327

Synthesis and characterization of monoacylglycerols through glycerolysis of ethyl esters derived from linseed oil by green processes

Cristiane B. Hobuss,^a Felipe A. da Silva,^b Marco A. Z. dos Santos,^a Claudio M. P. de Pereira,^a Gracélie A. S. Schulz^{id}*^a and Daniela Bianchini^a

The synthesis of monoacylglycerol (MAG) through the glycerolysis of ethyl ester mixture (biodiesel) was investigated in this study from linseed oil, low-cost alternative feedstock, using an alkaline catalyst with green reagent. The transesterification double step process (TDSP), reaction with ethanol to ethyl esters yielded 97%. In the glycerolysis reaction, the optimum operating condition was in a temperature of 130 °C with 5% sodium hydroxide (NaOH) in 1 : 5 biodiesel–glycerol and 12 h reaction time, in open reactor. The reaction conditions showed an interesting conversion and monoacylglycerol yield of 98% and 76%, respectively. The determination and characterization of reaction products was carried out by Gas Chromatography (GC) method, Infrared Spectroscopy (IR), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H NMR).

Received 26th September 2019
Accepted 3rd December 2019

DOI: 10.1039/c9ra07834g

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Monoacylglycerols (MAGs) and their derivatives are widely used as emulsifiers in the food industry. They are considered safe and non-harmful agents at low concentration, giving no adverse reactions or toxicity to mucous membranes.¹ In fact, MAGs can be found at low concentration in natural products as milk, for example.² Besides the food industry, MAGs are applied in cosmetic products, such as ointments, lotions and deodorants.¹ In the plastic industry, MAGs work as antistatic, lubricant and plastifying agents.³ In the textile industry, MAGs can improve color fastness and contrast in fabrics.¹

MAGs are esters of the glycerol, a trihydric alcohol in which only one of the hydroxyl groups (OH groups) is esterified with a long-chain fatty acid.⁴ MAGs can be prepared by glycerolysis of triglycerides from fats or vegetable oils,^{5,6} by the glycerolysis of alkyl esters,^{5,7,8} by the esterification of fatty acids with glycerol and by transesterification of oils with short chain alcohols.⁹ Industrial glycerolysis process are usually promoted with fats or oils using homogeneous alkaline catalysts, such as NaOH, KOH and Ca(OH)₂, at elevated temperatures (e.g., 255 °C) giving rise 40–60% of MAGs. However, high temperatures can affect the physicochemical properties of final product and its application.^{2–7}

He *et al.*,⁸ reported the synthesis of MAGs with high yield via one-step enzymatic ethanolysis of commercial edible anchovy

oil. The authors reported that MAGs with high content of *n* – 3 polyunsaturated fatty acids (*n* – 3PUFAs) can be obtained by using *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) enzyme.⁹ Although MAGs can be obtained at lower temperatures with enzymatic catalysts, long reaction times are required to obtain MAGs with high yield. Besides, enzymes are more expensive than usual chemical catalysts. Thus, from the industrial point of view the enzymatic route is not economically viable. Lozano *et al.*,¹⁰ suggested the biocatalytic synthesis of MAGs, out by the direct esterification of fatty acids (*i.e.* capric, lauric, myristic, palmitic and oleic acids, respectively) with glycerol, catalyzed by lipase Novozym 435 in different ionic liquids (ILs), as an alternative method to industrial glycerolysis process, a high selectivity of MAGs was observed with the 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate.¹⁰ IL is considered a green solvent and promising catalyst, presenting high thermal stability with the possibility of recovery and reuse. However, IL presents high cost, complex preparation and some toxicity. Schulz *et al.*,⁸ obtained 72% of MAGs performing a simple and direct glycerolysis from methyl esters and glycerol. The authors performed the glycerolysis with alkaline catalysts, lower reaction times and mild conditions of temperature (<150 °C). Glycerolysis reactions performed with alkyl esters occur at temperatures lower than that performed with triacylglycerols (TAG). Besides, alkyl ester glycerolysis is usually faster than that performed with TAGs.⁸

Biodiesel which is recognized as “green fuel”, is alternative fuel,¹¹ consists of fatty acid methyl esters (FAMES) or fatty acid ethyl esters (FAEEs). It can be obtained from animal fat or vegetable oils through transesterification reactions of large TAGs,^{12,13} or through esterification reactions of free fatty acids (FFAs).¹⁴ The main source of TAGs for biodiesel production are

^aCenter of Science Chemistry, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. E-mail: gracelie.serpa@gmail.com; Fax: +55 53 3275 7354; Tel: +55 53 3275 7356

^bChemistry and Food School, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil



vegetable oils from sunflower, tobacco seed, rapeseed, corn, palm, linseed, castor, babaçu, soybean, peanut and jatropa, among others.^{15,16} The oil content in oilseeds strongly depends on the characteristic of each crop and the environmental conditions.¹⁷ In Brazil, for instance, the climatic and soil conditions are convenient for the production of linseed (*Linum usitatissimum*) crop.^{18,19}

According to the Table 1, the linseed oil is a bioactive ingredient with high α -linolenic acid content.^{21,22} The long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs), especially linoleic acid (C18:2n – 6) and linolenic acid (C18:3n – 3) have anticarcinogenic and cardioprotective roles in humans. The reduction of the consumption of saturated fatty acids (SFAs) and the increase of the consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), fatty acids with more than one double bond are encouraged. Monounsaturated fatty acids (MUFAs, fatty acids with one double bond) are also usually regarded beneficial for human health.²³ Linseed seeds contain high amount of oil, around 40%, which can be converted into biodiesel.^{18,19}

Transesterification reactions of TAGs can be performed with homogeneous or heterogeneous catalysts, in acidic or basic medium.^{24,25} Lipases and ion exchange resins can also catalyze these reactions.^{26,27} Reactions catalyzed by bases as NaOH, KOH or alkoxides can be performed faster than that catalyzed by acids. Another advantage of basic catalysis is the possibility to carry out the transesterification reactions at low temperatures, near alcohol boiling point.^{14,28} On the other hand, the transesterification reactions catalyzed with basis is sensitive to water content in the raw matter. Even low content of water in TAGs results in the soap formation, which decreases the efficiency of the biodiesel synthesis. Samios *et al.*,²⁹ proposed a two-step synthesis with KOH as basic catalyst in the first step, followed by addition of H₂SO₄ as acidic catalyst in the second step. This methodology was denominated Transesterification Double Step Process (TDSP). The combination of catalysts results in high conversion efficiency, excellent biodiesel quality and easy phase separation procedure between biodiesel and glycerol. Besides, the synthesis of biodiesel by this method is faster than that performed with conventional methods.²⁹

The nature of primary alcohol is also an important parameter in the biodiesel synthesis. Acid-catalyzed transesterification reactions have included methanol, ethanol, propanol, butanol, and amyl alcohol. Methanol and ethanol are used most frequently in both laboratory research and the biodiesel industries.^{30,31} Methanol presents the best performance in the

biodiesel synthesis and can be obtained with high purity, which makes it the first choice for the transesterification reactions. However, methanol is a toxic compound to human health and its employment in the synthesis of biodiesel to produce MAGs is not acceptable for food industry.¹⁴ The employment of ethanol instead of methanol offers a number of benefits, include higher miscibility with vegetable oils that allows better contact in the reaction step.³² Besides, as reduce environmental impacts avoiding the emission of greenhouse gases and using a renewable product obtained by biotechnological processes, the ethanol still is a non-toxic compound and safe to human health,³³ and it is produced in large quantities from sugar cane in Brazil.³⁶

Schulz *et al.*,⁸ reported the synthesis of MAGs from glycerolysis of the fatty acid methyl esters with glycerol. These FAMES were obtained from transesterification reactions of the linseed oil and methanol.⁸ Despite the advantages of MAGs obtained from FAMES and glycerol reported by Schulz *et al.*⁸ Methanol is highly toxic and non renewable as it is mainly derived from non renewable sources such as petroleum refining products.³⁴ The use of methanol in the synthesis restricts the use of MAGs for food industries. Methanol traces are not desired in food and other products for human consumption.³⁵ Benefits of MAGs for human health would be best exploited if the MAGs would be synthesized from FAEE and glycerol. Guzzato *et al.*,³⁵ performed transesterification reactions of several vegetable oils with ethanol. FAEEs were successfully synthesized with high yield via TDSP process.³⁵

In this context, this work aims to optimize the synthesis of MAGs from fatty acid ethyl esters (FAEE) obtained by the transesterification reactions of linseed oil and ethanol. The glycerolysis process proposed in this work rises as an alternative to reduce the environmental impact of the large amount of glycerol produced in the biodiesel synthesis by fuel industries,³⁷ it is expected that this quantity will increase in the future due to the growing demand for biodiesel.³⁸ This methodology uses mild reaction conditions and non-toxic solvent for MAGs synthesis. In addition, the starting material of glycerolysis (biodiesel) comes from transesterification reaction performed with green reagent (ethanol). Therefore the process is sustainable because all products generated and surplus components can be recovered and reused in the process. The final product is safe to be applied in food, beverage and pharmaceutical industries.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chemicals were purchased as follows: purified linseed oil (Mundo dos Óleos, Brasília, Brazil); glycerin, KOH, NaCl and anhydrous Na₂SO₄ (Synth, Diadema, Brazil); NaOH and *n*-heptane (Vetec, Duque de Caxias, Brazil); anhydrous ethyl alcohol and H₂SO₄ (Dinâmica, Indaiatuba, Brazil); deuterated acetone from Scielab. The internal standard for CG measurements tricaprín (1,2,3-tricaproylglycerol), the external standards (monolein, diolein and triolein), and the derivatives *N*-

Table 1 Fatty acid composition of linseed oil²⁰

Name of fatty acid ^a	Structure	Formula	Weight (%)
Palmitic	C16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	5
Stearic	C18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	3
Oleic	C18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	21
Linoleic	C18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	15
Linolenic	C18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	54

^a Other fatty acids add up to approximately 2%.



methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) were purchased from Sigma-Aldrich, (USA) with 99.9% purity.

2.2. Experimental setup

2.2.1. Transesterification reaction: production of biodiesel from linseed oil. The obtaining of ethyl esters from linseed oil was carried out in two steps, produced according to the TDSP method, methodology was adapted from Guzzato *et al.*³⁵ The first stage consisted of basic catalysis using KOH, followed by acid catalysis with H₂SO₄.

Initially, 120 mL of ethanol was introduced in a simple reactor equipped with a reflux device and stabilized at 65 °C. Potassium hydroxide (2.0 g) was added to the ethanol, and the mixture was vigorously stirred until the potassium hydroxide was completely dissolved, allowing the formation of the active species of basic catalyst. Under constant stirring, 100 mL of linseed oil were then added to the reaction vessel. The alcohol/oil/catalyst molar ratio was 20 : 1 : 0.35. The system was remained under these conditions for 30 min. In the second step, 4 mL of sulfuric acid (P.A., 18.77 mol L⁻¹) was added dropwise to the reaction mixture, followed by soft heating until 80 °C and the addition of 60 mL of ethanol. After stabilizing temperature the system was remained under these conditions for 2 h 30 min. Reaction mixture was filtered to remove the solid residue (K₂SO₄). Liquid phase was concentrated using a rotary evaporator to remove the alcohol excess and this specific procedure promoted a fast and clear separation in two liquid phases. The ethyl esters (biodiesel) were in the upper phase, with some traces of non-reacted oil, monoacylglycerols, diacylglycerols and a small amount of ethanol. The glycerol formed was in the lower phase. After phase separation, the biodiesel was washed with NaCl solution (5%) and dried under anhydrous Na₂SO₄ followed by filtration procedure. Obtained ~87 mL from the product.

2.2.2. Glycerolysis reaction: synthesis of acylglycerols. The glycerolysis reactions were performed by varying the reaction time (6–12 h) and temperature (100–150 °C). The biodiesel/glycerol/catalyst molar ratio was 1 : 5 : 0.38. The excess of glycerol was added in order to shift the equilibrium to a greater production of MAGs.

Initially, 30 g of biodiesel, 46 g of glycerol and 1.5 g of NaOH were introduced in a simple reactor and the mixture was constantly stirred. The glycerolysis was performed under reflux or in open system with variable time and temperature. The product obtained is a viscous liquid, this was washed with NaCl solution (5%) and heated at 70 °C. The heating favors the solubilization of the glycerol in the aqueous solution. The product was subsequently cooled in an ice bath, to facilitate removal of the aqueous phase by loading glycerol. This washing process with heating and cooling was performed several times, after the product was dried by heating at 100 °C. Obtained ~20 g from the product.

2.3. Analytical procedures

The ¹H NMR spectra were obtained by spectrometer Bruker instrument operating at 400 MHz. The linseed oil and biodiesel

samples were dissolved in deuterated chloroform and the glycerolysis product in deuterated acetone. Chemical shifts are related in parts per million (ppm) relative to the internal TMS standard.

The nature of the samples were analyzed by using a Shimadzu spectrometer (IRAffinity-1, Kyoto, Japan), coupled to an Attenuated Total Reflectance accessory (ATR) (Pike Tech, Madison, WI.). The samples were placed on the zinc selenide (ZnSe) crystal and the analyses were performed in the range of 4000–700 cm⁻¹, co-adding 32 scans and spectral resolution of 4 cm⁻¹.

Thermal stability of samples was obtained using a Shimadzu thermogravimetric analyzer (DTG-60, Kyoto, Japan). Samples (4–6 mg) were heated between 25 and 650 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹ and a nitrogen gas flow of 50 mL min⁻¹.

A Shimadzu GC-2010 chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) was used for individual separation and determination of FAEE. The analysis of the samples was carried using the standard technique ASTM 6584, is used to determine the content of free glycerin, monoacylglycerol, diacylglycerol and triacylglycerol in fatty acid methyl esters, which was adapted to quantify the conversion of ethyl esters into reaction products, yield and selectivity. A 15 m × 0.32 mm × 0.1 μm SGE-HT5 column was used for the determination of FAEE. Chromatographic conditions were: detector temperature: 380 °C; injector temperature: 50 °C; gas carrier: nitrogen; linear gas velocity: 12 cm s⁻¹; total running time: 40 min; oven temperature program: 50 °C during 1 min, 15 °C min⁻¹ until 180 °C, 7 °C min⁻¹ until 230 °C, and 10 °C min⁻¹ until 370 °C, remaining isothermally for 10 min. Three solutions were used for quantitative analysis of glycerolysis products: a standard solution (solution 3) used to determine retention time and calculate the response factor in relation to the internal standard, a solution containing the biodiesel (with the biodiesel used in the reaction) and a solution containing the products (solution with glycerolysis products), according to technique, dissolved in heptane. Aliquots of 1 μL of these solutions were injected into the equipment. This methodology was used by Schulz *et al.*⁸

3. Results and discussion

Different analyses were carried out to characterize biodiesel and monoacylglycerol synthesized from linseed oil. The oil conversion to biodiesel was evaluated using ¹H NMR and the biodiesel conversion to MAG was evaluated using ¹H NMR and CGFID, following the methodologies described in the Section 2.2. The MAG chemical structure was identified by ¹H NMR and FTIR. Thermal stability of the biodiesel and MAG was evaluated by TGA.

3.1. The transesterification process

The transesterification reactions of linseed oil to FAEE (biodiesel) were performed by TDSP methodology and in the presence of the green reagent ethanol.

The scheme of the transesterification reaction is shown in the Fig. 1.

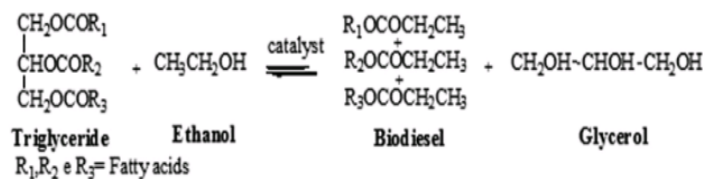


Fig. 1 Scheme of the transesterification reaction.

Molar ratio of alcohol to oil is one of the most significant factors affecting the conversion efficiency and yield of biodiesel, the molar ratio of alcohol to oil is 3 : 1 and the reaction is reversible, higher molar ratios are required to increase the miscibility and to enhance the contact between the alcohol molecule and the triglyceride. Therefore, an excess of ethanol should be added in order to shift thermodynamic equilibrium towards the formation of biodiesel.

The ^1H NMR spectrum of the linseed oil (Fig. 2) emphasizes the chemical shift regions of interest.

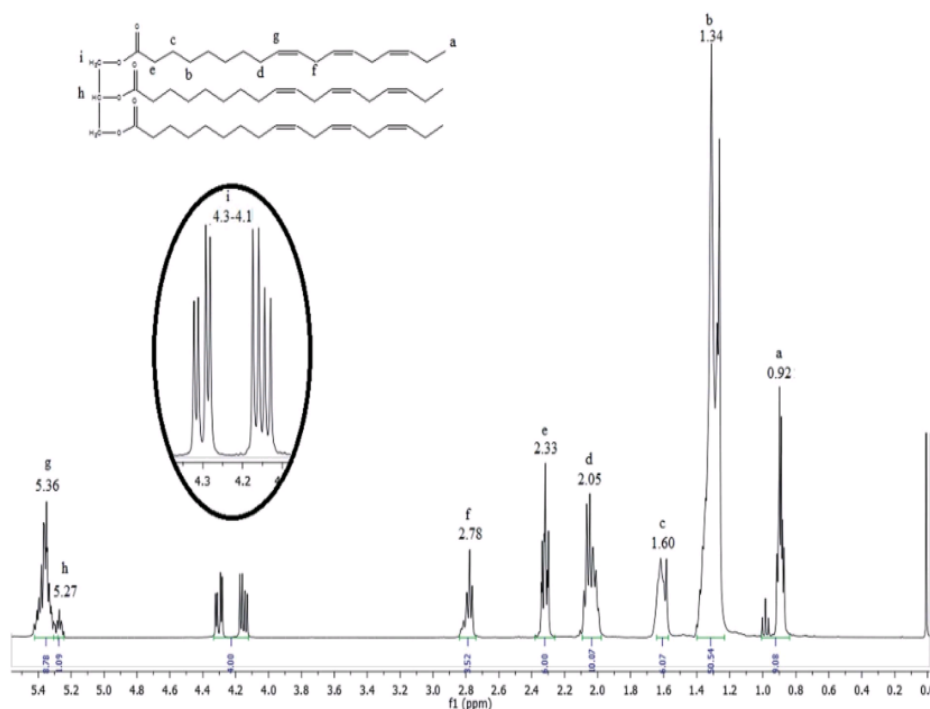
The most shielded peak observed at 0.92 ppm (peak a) is characteristic of the hydrogen atoms of terminal methyl groups in fatty acid chains, as indicated in the linseed oil chemical structure inserted in the Fig. 2. The signals observed between 2.78 and 1.34 ppm (peak f to b) are attributed to hydrogen atoms of internal methylene groups in fatty acid chains. The olefinic hydrogen atoms of carbon-carbon double bonds of fatty acids are placed in a downfield region at 5.36 ppm (peak g). The highlighted signals located between 4.1 and 4.3 ppm (peak i) are

characteristic of external hydrogen atoms of glycerol fragment. The internal hydrogen atom of glycerol fragment is observed at 5.27 ppm (peak h).³⁵

Fig. 3 shows the ^1H NMR spectrum of the linseed oil biodiesel.

Many signals in the biodiesel spectrum are similar to those observed in the linseed oil spectrum. However, glyceridic fragment was removed during transesterification reactions and replaced by an ethyl ester fragment. Then, the absence of the peaks h and i in the spectrum of the Fig. 3 indicates that linseed oil was completely converted to biodiesel. The hydrogen atoms of methylene group of ethyl ester, highlighted in the Fig. 3, can be observed as a quartet at 4.12 ppm (peak j). According to Guzzato *et al.*,³⁵ the hydrogen atoms of methyl group of ethyl ester are overlapped by other signals at 1.2 ppm. These signals appear around 1.3 ppm (peak h) in the spectrum of the Fig. 2.

Gelbard *et al.*,³⁹ Knothe *et al.*, Kenar *et al.*,⁴⁰ Morgenstern *et al.*,⁴¹ and Tariq *et al.*,⁴² have used a reliable methodology to obtain ethyl ester conversion (C_{EE}) from mono-, di- and

Fig. 2 ^1H NMR spectrum of the linseed oil.

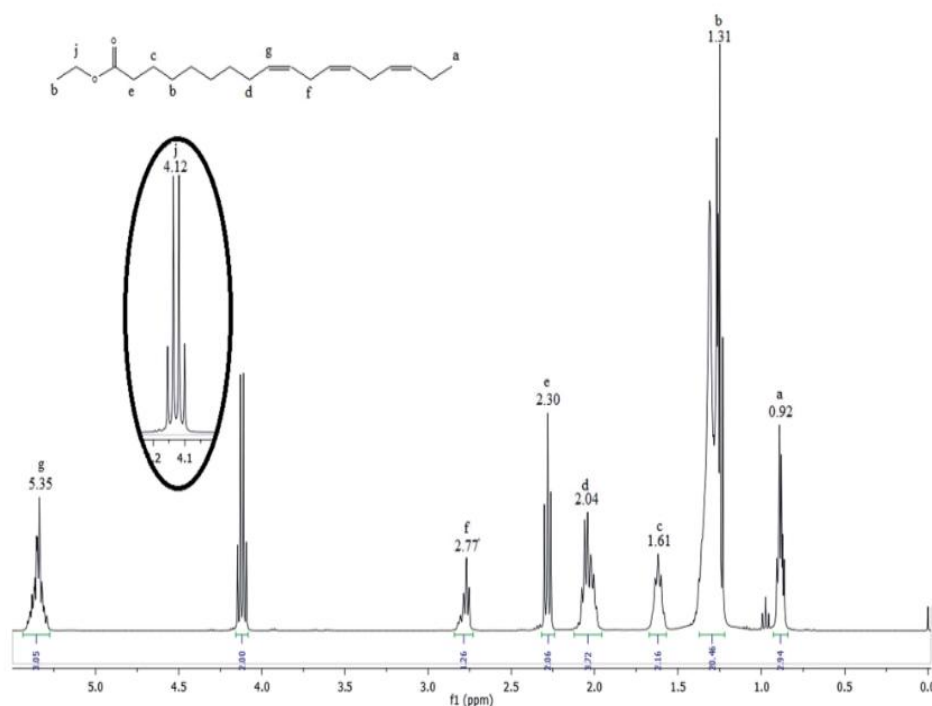


Fig. 3 ^1H NMR spectrum of the linseed oil biodiesel.

triacylglycerols, as well as fatty acids methyl esters. This methodology is based on the integration of some peaks of ^1H NMR spectrum of biodiesel. In the Fig. 3, the peak at 4.12 ppm was used to calculate the ethyl ester content. The peak at 2.30 ppm was chosen to represent all possible linseed oil derivatives and all other species that were formed during transesterification reactions. According to eqn (1):

$$C_{\text{EE}} = \frac{I_{\text{EE-CH}_2}/2}{I_{\text{a-CH}_2}/2} \quad (1)$$

$I_{\text{EE-CH}_2}$ is the integration value of the peak j, which corresponds to the hydrogen atoms of methylene of ethyl ester. $I_{\text{a-CH}_2}$ is the integration value of the peak e, which is attributed to the hydrogen atoms of methylene adjacent to carbonyl group. The factor 2, which divides both integration values, is the normalization factor, because each integral corresponds to two hydrogens.³⁵

Thus, the transesterification reaction performed in this work produced 97% of biodiesel from the linseed oil. The present yield was similar to the 98% obtained by Guzzato *et al.*,³⁵ and higher than the 85% obtained by Schulz *et al.*,⁸ considering a high conversion efficiency using a non-toxic reagent.

3.2. The glycerolysis process

In the present work, the glycerolysis reactions of ethyl esters were performed in basic medium at different temperatures and reaction times.

The scheme of the glycerolysis reaction is shown in the Fig. 4.

Glycerolysis is a reversible reaction and an excess of glycerol should be added in order to shift thermodynamic equilibrium towards the formation of MAGs. In this work, reactions were performed with molar ratio biodiesel/glycerol of 1/5, since Schulz *et al.*,⁸ have reported that it is the most efficient molar ratio.

The Fig. 4 shows that the byproduct of the glycerolysis reaction is ethanol, another advantage over the work done by Schulz *et al.*, in which the reaction byproduct is methanol, thus reducing the environmental impact with a less toxic residue generated.

GC analyses were used to quantify the glycerolysis products, according to ASTM method D6584. Chromatograms of the biodiesel before conversion, the glycerolysis product and the mixture of internal and external standards were used to evaluate the biodiesel conversion and the respective acylglycerols yield.

In order to quantify glycerolysis products, the response factors (rF) of each involved specie, should be considered. Biodiesel weight conversion (C_{BD}) can be obtained from areas of chromatogram peaks of the biodiesel before conversion and the glycerolysis products, according to eqn (2):

$$C_{\text{BD}} = 1 - \frac{\sum A_{\text{EE-product}}}{\sum A_{\text{EE-biodiesel}}} \times 100 \quad (2)$$

$\sum A_{\text{EE-biodiesel}}$ is the summation of the peak areas corresponding to ethyl esters of the biodiesel before the reaction. $\sum A_{\text{EE-product}}$ is the summation of the peak areas corresponding to ethyl esters in the product after the reaction.

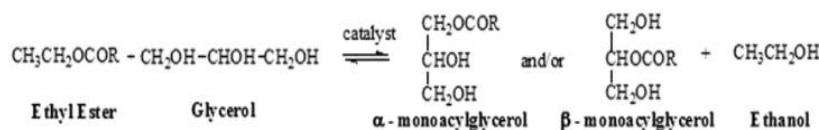


Fig. 4 Scheme of the ethyl ester glycerolysis reaction.

The acylglycerols yield (%) must be expressed in relation to the C_{BD} . The mono-, di-, and triacylglycerol yield (%) (Y_{MG} , Y_{DG} , and Y_{TG} , respectively) were calculated according to eqn (3)–(5):

$$Y_{\text{MG}}(\%) = \frac{C_{\text{BD}} \times \sum A_{\text{MG}}/rF_{\text{MG}}}{[(\sum A_{\text{MG}}/rF_{\text{MG}}) + (\sum A_{\text{DG}}/rF_{\text{DG}}) + (\sum A_{\text{TG}}/rF_{\text{TG}})]} \quad (3)$$

$$Y_{\text{DG}}(\%) = \frac{C_{\text{BD}} \times \sum A_{\text{DG}}/rF_{\text{DG}}}{[(\sum A_{\text{MG}}/rF_{\text{MG}}) + (\sum A_{\text{DG}}/rF_{\text{DG}}) + (\sum A_{\text{TG}}/rF_{\text{TG}})]} \quad (4)$$

$$Y_{\text{TG}}(\%) = \frac{C_{\text{BD}} \times \sum A_{\text{TG}}/rF_{\text{TG}}}{[(\sum A_{\text{MG}}/rF_{\text{MG}}) + (\sum A_{\text{DG}}/rF_{\text{DG}}) + (\sum A_{\text{TG}}/rF_{\text{TG}})]} \quad (5)$$

A_{MG} , A_{DG} , and A_{TG} are the respective areas. Term rF gives the corresponding response factors.

The Fig. 5 shows the three chromatograms used to quantify the biodiesel conversion and glycerolysis products yield.

According to chromatogram obtained, that ethyl esters eluted between 10 and 16 min retention time. Monoacylglycerols (a) appear in the range 17 min, diolein (c) appears after 27 min and triolein (d) is detected in chromatogram after 35 min. The chromatogram A is the one composed with the external standards monoolein, diolein and triolein. The chromatogram B is the biodiesel before reaction. The chromatogram C is the sample prepared with the product obtained in the test using 5% NaOH, biodiesel : glycerol 1 : 5 ratio and 12 h time. All three chromatograms include internal standard tricaprins (b) at the same concentration.

In order to improve the performance on the biodiesel conversion to MAG the effects of temperature and reaction time have been studied to the glycerolysis reactions.

According to the Table 2 a simple comparison of these data indicates that the highest value of the biodiesel conversion, 98%, was obtained for the experiment performed with reaction time of 12 h at 130 °C, in open reactor (test M5). For open reactor testing, the best C_{BD} results are obtained when temperature and reaction time are increased simultaneously. At the lowest temperature (test M7, which has a long time) and at the shortest time (test M4, at a high temperature) the results were worse. Simultaneously increasing both factors seems to improve conversion. However, a temperature increase above 130 °C (see test M6) does not appear to improve biodiesel conversion and the energy cost of the reaction is higher, which is not interesting from an industrial point of view. All tests performed with open system were more effective than the reflux system due to the evaporation of ethanol, a volatile by-product of the glycerolysis reaction. The ethanol removal shifts

thermodynamic equilibrium towards the MAG formation. In a glycerolysis industrial plant the ethanol could be recovered at the end of the process, which would avoid waste generation, one of the basic principles of green chemistry.⁴³

It should be considered that the aim of this study is optimize conditions for MAGs synthesis. In other words, it means obtain the maximum yield in monoacylglycerol, and a process with as mild temperatures as possible is sought. The Table 2 shows that higher content of MAG can be obtained with reaction time of 12 h at 130 °C (test M5). Glycerolysis reaction temperature seems to be an important parameter to reach higher MAG content. Experiments performed at 100 and 150 °C presented a lower content of MAG and an increasing content of DAG and TAG in the glycerolysis products.

It is noteworthy, the great difficulty of mass transfer, due to the high viscosity of the product, therefore, to remove excess glycerol from the formed product, a slight heating to 70 °C is required, as explained in Section 2.2.2, and subsequent cooling with ice bath to facilitate phase separation.

Thus, these results demonstrate the feasibility of producing MAGs at relatively low temperature in biodiesel glycerolysis reactions. These good results can be explained by the ethyl esters that are more miscible in glycerol when compared to the vegetable oil, used in the traditional method of glycerolysis by industry, with temperatures above 200 °C. These results are similar to those observed by Schulz *et al.*,⁸ which also observed good results with 130 °C, in the present work, the results were as good as those of the article, but with green reagent.

The ¹H NMR spectrum of MAG is shown in the Fig. 6.

The most shielded peak observed at 0.89 ppm (peak a) is characteristic of the hydrogen atoms of terminal methyl groups in fatty acid chains. The signals observed between 2.80 and 1.27 ppm (peak f to b) are attributed to hydrogen atoms of internal methylene groups in fatty acid chains. The olefinic hydrogen atoms of carbon-carbon double bonds of fatty acids are placed in a down-field region at 5.35 ppm (peak g). The small signal observed at 5.30 (peak h) included in this area is originated from the central glycerol hydrogen. The acylglycerol protons signal at 4.14 ppm (peak k) are characteristic of external hydrogen atoms of glycerol fragment and the signal at 3.72 (peak l) is attributed to hydrogen of the hydroxyl group. The peaks k and l are characteristic of the monoacylglycerols.⁴⁴ Comparing the spectra presented in Fig. 2, 3 and 6, it is observed that the signal referring to the double bonds were not changed, which means that after the reaction process the MAG maintains the double bonds, which characterize important and beneficial for the human health and can be used in the food and pharmaceutical industry.

The IR spectrum of MAG obtained from linseed oil biodiesel, with 76% yield, is shown in Fig. 7.



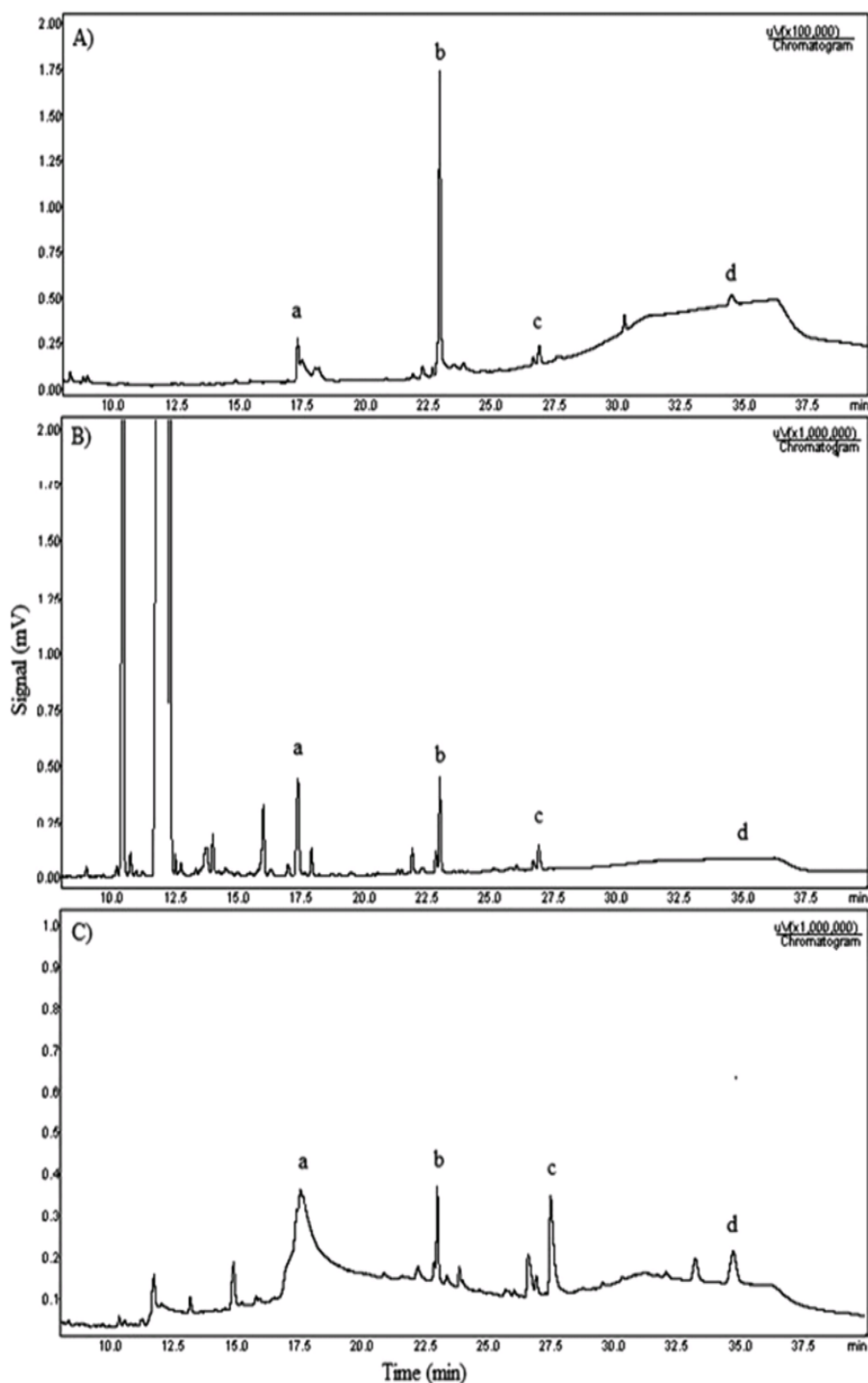


Fig. 5 Chromatograms of the: (A) external and internal standards mixture: nonolein (a), tricaprin (b), diolein (c) and triolein (d); (B) pure biodiesel before the glycerolysis reaction; (C) glycerolysis product obtained with 76% yield of MAG.

The bands shown in the spectrum of the Fig. 7, assigned according to Schulz *et al.*,⁸ confirm the formation of MAG. The broad and strong band centered at 3360 cm^{-1} was assigned to O–H stretching modes, $\nu(\text{O–H})$, typical of hydroxyl groups remaining from glycerolysis reaction of biodiesel. This enlargement suggests a large extension of OH groups associated

Table 2 Biodiesel conversion (C_{BD}) values obtained according to the parameters used in the glycerolysis reaction^a

Reaction	Time (h)	Temp. (°C)	C_{BD}^c (%)	MAG (%)	DAG (%)	TAG (%)
M1 ^a	10	130	50	44	1	5
M2 ^b	10	130	88	52	7	28
M3 ^b	8	130	89	39	11	39
M4 ^b	6	130	76	49	5	23
M5 ^b	12	130	98	76	7	15
M6 ^b	12	150	98	22	27	48
M7 ^b	12	100	84	26	8	49

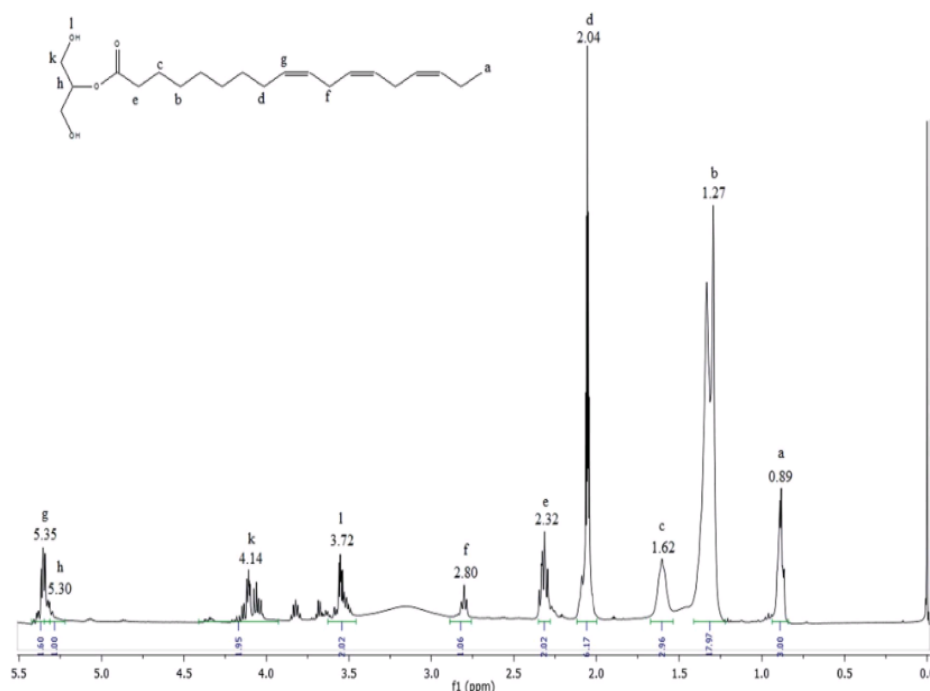
^a Reflux. ^b Open. ^c C_{BD} : converted biodiesel.

by H-bonds. The weak band at 3008 cm^{-1} can be assigned to C–H stretching modes, $\nu(\text{C–H})$, of disubstituted *cis* double bonds, as those found in the unsaturated chains of linseed oil.³⁵ Antisymmetric and symmetric C–H stretching modes of the methylene groups of the fatty acid chains can be observed at 2922 and 2853 cm^{-1} , respectively. Bands characteristic of C–H vibrational modes of terminal methyl (CH_3) groups were not observed between 3000 and 2800 cm^{-1} , which indicates a high proportion of CH_2/CH_3 . This information is according to the presence of the long chain fatty acids of linseed oil. The strong band at 1739 cm^{-1} is assigned to C=O stretching modes, $\nu(\text{C=O})$, of carbonyl groups characteristic of esters. Esters present also C–O stretching modes, $\nu(\text{C–O})$, between 1300 and 1100 cm^{-1} . The spectrum in the Fig. 8 shows a broad unsolved envelope of bands, which can include C–O ester vibrations around 1165 cm^{-1} .³⁵

The bands characteristic of LC-PUFAs shown in the spectrum of the Fig. 7 indicates the functional groups of linseed oil were preserved during the glycerolysis reaction. Besides, the high proportion of hydroxyl and methylene groups indicate MAG was successfully synthesized from linseed oil.

Fig. 8 shows the TGA curves, of the biodiesel obtained with 97% yield, and monoacylglycerol, obtained with 76% yield. The biodiesel thermogram shows a weight loss of approximately 96% in only one-step. This thermal event occurred between 160 and 260°C with maximum weight loss at 244°C , which can be attributed to the degradation of organic matter.

On the other hand, the MAG presents a different thermal decomposition profile. The thermogram in the Fig. 8 shows a weight loss of approximately 78% and, at least, three thermal events between 160 and 510°C . These thermal events can be observed by the different slopes in the curve. Besides, thermal

Fig. 6 ^1H NMR spectrum of the glycerolysis product obtained with 76% yield of monoacylglycerol in green solvent.

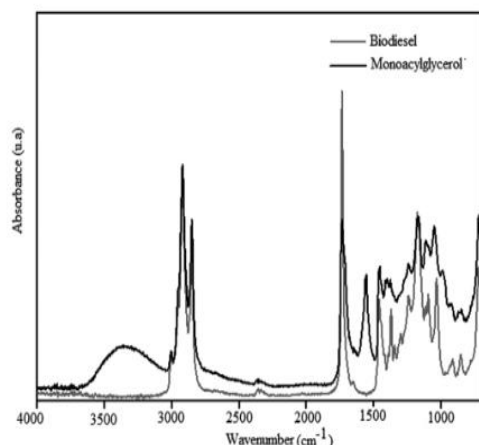


Fig. 7 IR spectrum of the monoacylglycerol synthesized from linseed oil biodiesel.

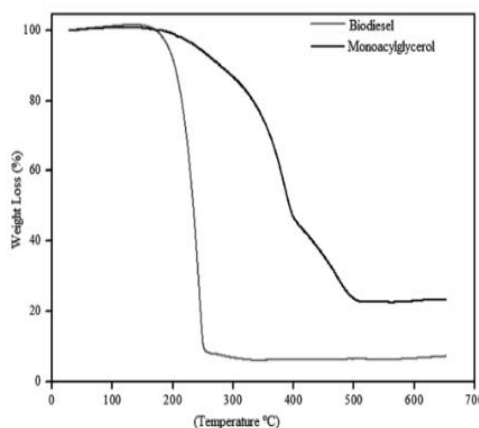


Fig. 8 TGA curves of linseed oil biodiesel and monoacylglycerol.

decomposition of MAG seems to be slower than shown by biodiesel. It should be considered that MAG structure has hydroxyl groups, which can significantly interfere in its thermal decomposition mechanism.

4. Conclusion

The results obtained in our experiments indicate the production feasibility of monoacylglycerol through the glycerolysis of ethyl ester mixture (biodiesel). Also, we can obtain high-purity ethylic esters by the TDSP method, with conversion of 97%. With respect to the system, it is demonstrated that the most efficient one was the open reactor than the reflux reactor. Monoglycerides were produced at high yields and selectivities. Conversions (defined as the percentage of consumed fatty acid) reached 98%, with monoglyceride being the major product, with yield of 76%. Thus, we can achieve expressive results for green monoacylglycerol production through a cheaper chemical

route possible for several industrial sectors like the food and pharmaceutical. Finally, it should be stressed that the production of monoglycerides was successfully carried out in a very simple reaction system.

List of abbreviations

A (CAL-A)	<i>Candida antarctica</i> lipase
ASTM	American society for testing and materials
DAG	Diacylglycerol
FAEE	Fatty acid ethyl ester
FAME	Fatty acid methyl esters
IL	Ionic liquid
LC-PUFA	Long-chain polyunsaturated fatty acid
MAG	Monoacylglycerol
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
MUFA	Monounsaturated fatty acid
<i>n</i> - 3PUFA	<i>n</i> - 3 Polyunsaturated fatty acid
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
SFA	Saturated fatty acid
TAG	Triacylglycerol
TDSP	Transesterification double step process

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP Brasil for financial support.

Notes and references

- P. Slobodian, R. Vicha, I. V. A. Doležalková, R. Janiš and L. Bun, *J. Food Biochem.*, 2013, **37**, 544.
- C. E. Isaacs, R. E. Litov and H. Thormars, *J. Nutr. Biochem.*, 1995, **6**, 362.
- F. Bunka, V. Pavlínek, J. Hrabě, O. Rop, R. Janiš and J. Krejci, *Int. J. Food Prop.*, 2007, **10**, 819.
- W. W. Christie and X. Han, *Lipid analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis*, Oily Press, Washington, 2010.
- H. Nouredini and V. Medikonduru, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, **74**, 419.
- H. Luo, Z. Zhai, W. Fan, W. Cui, G. Nan and Z. Li, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2015, **54**, 4923.
- N. O. V. Sonntag, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1982, **59**, 795.
- A. S. Schulz, K. C. Silveira, D. B. Libardi and C. R. Peralba, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 1533.
- Y. He, J. Li, S. Kodali, B. Chen and Z. Guo, *Bioresour. Technol.*, 2016, **219**, 466.
- P. Lozano, C. Gomez, S. Nieto, G. Sanchez-Gomez, E. Garcia-Verdugo and S. V. Luis, *Green Chem.*, 2017, **19**, 390.



- 11 M. G. Kulkarni, R. Gopinath, L. C. Meher and A. K. Dalai, *Green Chem.*, 2006, **8**, 1056.
- 12 C. M. Drapcho, N. P. Nghim and T. Walker, *Biodiesel*, in *Biofuels Engineering Process Technology*, McGraw-Hill, 2008.
- 13 S. Pinzi, I. L. Garcia, M. D. L. De Castro, G. Dorado and M. P. Dorado, *Energy Fuels*, 2009, **23**, 2325.
- 14 E. Lotero, Y. Liu, D. E. Lopez, K. Suwannakarn, D. A. Bruce and J. G. Goodwin, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005, **44**, 5353.
- 15 M. Černoch, M. Hájek and F. Skopal, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 2071.
- 16 O. S. Stamenkovic, A. V. Velickovic and V. B. Veljkovic, *Fuel*, 2011, **90**, 3141.
- 17 S. Bancquart, C. Vanhove, Y. Pouilloux and J. Barrault, *Appl. Catal. Gen.*, 2001, **218**, 1.
- 18 D. P. Ho, H. Hao and W. Guo, *Bioresour. Technol.*, 2014, **169**, 742.
- 19 A. Karmakar, S. Karmakar and S. Mukherjee, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 7201.
- 20 R. U. I. C. Zambiasi, R. Przybylski, M. W. Zambiasi and C. B. Mendonça, *Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.*, 2007, **25**, 111.
- 21 J. Huang, Q. Wang, T. Li and Q. Xia, *J. Sci. Food Agric.*, 2018, **98**, 1513.
- 22 S. Czlonka, M. F. Bertino, J. Kosny, A. Strakowska, M. Maslowski and K. Strzelec, *Ind. Crops Prod.*, 2020, **115**, 40.
- 23 M. Jebrane, S. Cai, C. Sandström and N. Terziev, *EXPRESS Polym. Lett.*, 2017, **11**, 383.
- 24 B. Freedman, E. H. Pryde, T. L. Mounts and N. Regional, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, **61**, 1638.
- 25 A. Corma, S. Bee, A. Hamid, S. Iborra and A. Velty, *J. Catal.*, 2005, **234**, 340.
- 26 L. A. Nelson, T. A. Foglia and W. N. Marmer, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 1191.
- 27 Y. Shimada, Y. Watanabe, A. Sugihara and Y. Tominaga, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, **17**, 133.
- 28 R. Kumar, P. Tiwari and S. Garg, *Fuel*, 2013, **104**, 553.
- 29 D. Samios, F. Pedrotti, A. Nicolau, Q. B. Reiznautt, D. D. Martini and F. M. Dalcin, *Fuel Process. Technol.*, 2009, **90**, 599.
- 30 A. Demirbas, *Energy Convers. Manage.*, 2003, **44**, 2093.
- 31 H. Fukuda, A. Kond and H. J. Noda, *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, **92**, 405.
- 32 R. C. Basso, A. J. A. Meirelles and E. A. C. Batista, *Braz. J. Chem. Eng.*, 2017, **34**, 341.
- 33 O. Z. S. Neto, E. A. C. Batista and A. J. de A. Meirelles, *J. Cleaner Prod.*, 2018, **180**, 866.
- 34 N. Kaur and A. Ali, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 13285.
- 35 R. Guzzato, D. Defferrari, Q. B. Reiznautt, Í. R. Cadore and D. Samios, *Fuel*, 2012, **92**, 197.
- 36 T. P. V. B. Dias, P. M. Neto, M. Ansolin, L. A. Follegatti-Romero, E. A. C. Batista and A. J. A. Meirelles, *Braz. J. Chem. Eng.*, 2015, **32**, 699.
- 37 Q. Tu, M. Lu and G. Knothe, *J. Cleaner Prod.*, 2017, **162**, 504.
- 38 A. E. Díaz-álvarez, J. Francos, P. Crochet and V. Cadierno, *Green Chem.*, 2014, **1**, 51.
- 39 G. Gelbard, O. Bres, R. M. Vargas, F. Vielfaure and U. F. Schuchardt, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1995, **72**, 1239.
- 40 G. Knothe and J. A. Kenar, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2004, **106**, 88.
- 41 M. Morgenstern, J. Cline, S. Meyer and S. Cataldo, *Energy Fuels*, 2006, **20**, 1350.
- 42 M. Tariq, S. Ali, M. Ahmad and M. Zafar, *Fuel Process. Technol.*, 2011, **92**, 336.
- 43 E. J. Lenardão, M. J. Dabdoub and C. F. Batista, *Quim. Nova*, 2003, **26**, 123.
- 44 I. O. Bakare, C. Pavithran, F. E. Okieimen and C. K. S. Pillai, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, **100**, 3748.

**ANEXO III. Solicitação de Registro de Patente intitulada:
Formulação nanoestruturada lipídica, contendo monoacilglicerol derivado
do óleo de linhaça, seus usos e processos de produção.**

- 23110.038325/2019-31  
-  PRPPGI Formulário de Busca de Anterior
-  PRPPGI Formulário de Informação Tecn
-  Despacho SDAP 0783969 
-  E-mail CCQFA 0784373 
-  Despacho SDAP 0797180 
-  Solicitação (0826124) 
-  Despacho CCQFA 0826448 
-  Despacho SDAP 0826929 
-  Despacho NAdm-CCQFA 0828040 
-  Despacho SDAP 0862890 
-  PRPPGI Formulário de Busca de Anterior
-  E-mail NAdm-CCQFA 0879357
-  Despacho SDAP 0899383 

 Consultar Andamento

Processos Relacionados:

Inovação Tecnológica: Apoio à Redação de Patentes
Orçamento e Finanças: Pagamento a Pessoa Jurídica

Bases de Conhecimento Associadas

 Imprimir

Lista de Bases de Conhecimento Associadas (1 registro):

☒	Unidade	Descrição	Usuário Liberação	Data Liberação	Ações
☐	SDAP	Pedido de registro de patente	62015753087	10/06/2019 09:12:50	