



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

STÉFANO ARRAIS PEREIRA

**BIOMASSA DE COCO CATOLÉ: SÍNTESE OTIMIZADA DO BIODIESEL E DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS**

FORTALEZA

2025

STÉFANO ARRAIS PEREIRA

BIOMASSA DE COCO CATOLÉ: SÍNTESE OTIMIZADA DO BIODIESEL E DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor na área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientadora: Dr^a. Tathilene Bezerra Mota Gomes Arruda.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P1b

Pereira, Stefano Arrais.

Biomassa de coco catolé: síntese otimizada do biodiesel e de carreadores lipídicos nanoestruturados / Stefano Arrais Pereira. – 2025.

90 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo..

Coorientação: Profa. Dra. Tathilene Bezerra Mota Gomes Arruda..

1. Biodiesel. 2. Coco catolé. 3. Método Taguchi. 4. CLN_s. I. Título.

CDD 540

STÉFANO ARRAIS PEREIRA

BIOMASSA DE COCO CATOLÉ: SÍNTESE OTIMIZADA DO BIODIESEL E DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor na área de concentração: Química.

Aprovada em: 24/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Cecília Rocha da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª Antonia Flavia Justino Uchoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as conquistas proporcionadas durante essa caminhada.

A minha mãe Estefânia pelo incentivo dado no que diz respeito aos estudos e ao companheirismo sempre dado para mim, mostrando-se como referência fundamental para o que me tornei como pessoa.

Ao meu pai Benedito que infelizmente faleceu durante essa trajetória, mas foi e sempre será a pessoa mais importante para o sucesso que alcancei como pessoa, obrigado pai.

À Sarah Brenda pelo companheirismo, amor e toda ajuda dada nos momentos cruciais, sendo bastante importante nesse processo, inclusive para muito além do desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a Dra. Nágila Ricardo, pela oportunidade de ter me acolhido quando cheguei, pela orientação dada, por toda estrutura fornecida, que foi vital no desenvolvimento da pesquisa e por todo o suporte dado nos momentos mais difíceis desse processo.

Aos meus gatos, Waxy Chim e Igor por todo o companheirismo e carinho dado nessa trajetória.

À CAPES pelo fomento dado ao desenvolvimento da pesquisa e ao custeio pessoal durante parte do trabalho.

À Dra Tathilene Arruda, pelas contribuições valorosas na produção do trabalho, e por todo esforço empregado nesse processo.

Ao LabPIM por toda infraestrutura física e de recursos humanos fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas de LabPIM, Karen, Pedro, Alexandre, e em especial ao Alessandro que facilitou minha inserção no grupo, Neto que é um amigo de longa data, ao Rafael e Aiêrta pela amizade que construímos e sobretudo pelos momentos de companheirismo. Ao Elano por toda a gentileza, prestatividade e companheirismo mostrado ao longo de todos esses anos.

Ao NuBEx pela parceria e realização das análises de toxicidade e atividade locomotora utilizando o *zebrafish* como modelo animal, ao LABIMAN pela parceria e realização das análises de atividade antifúngica, ao CENAUREMN por realizar as análises de RMN requeridas pelo trabalho, à EMBRAPA Fortaleza pela realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Programa de Pós-graduação em Química pela estrutura fornecida para o desenvolvimento da pesquisa e a Universidade Federal do Ceará por possibilitar a me tornar um indivíduo melhor como profissional, e sobretudo como pessoa.

RESUMO

A utilização de fontes oleaginosas regionais com produção intermitente, são ideais para proporcionar alternativas para aplicações renováveis e biocompatíveis, pois diminuem os custos de produção, devido a redução do impacto da indisponibilidade de matéria prima, nesse contexto este trabalho propõe o aproveitamento da biomassa de coco catolé para a síntese de biodiesel através da transesterificação *in situ* e a síntese de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), atreladas ao planejamento experimental utilizando o método de Taguchi. A transesterificação *in situ* foi conduzida através de nove experimentos variando-se taxa do catalisador, proporção metanol/ óleo e temperatura. O rendimento de massa foi analisado como resposta. A condição otimizada foi obtida através da reação com 2% de catalisador, proporção metanol/óleo 5:1 e 60 °C, propiciando rendimento em massa de 66,17%. Os parâmetros avaliados apresentaram p-valor com significado estatístico, com a taxa de catalisador propiciando maior impacto no rendimento da síntese. Avaliou-se os parâmetros físico-químicos do biodiesel, atestando-se que o material atende as normas internacionais, ressaltando o resultado de estabilidade oxidativa superior a 18 h, e os eventos de combustão em análise termogravimétrica variando de 224 a 258 °C, e energia de ativação (E_a) de 48,12 KJ.mol^{-1} , justificada pelo perfil majoritário de ácidos graxos saturados demonstrado na análise cromatográfica. A partir da análise de ressonância magnética nuclear (RMN), confirma-se a eficácia da síntese em produzir biodiesel com taxa de conversão igual a 100%. A síntese otimizada dos CLNs foi conduzida através da variação das massas de óleo da amêndoa do coco catolé OACC, cera de abelha e o tensoativo Brij[®] 78, aliada ao método de Taguchi. Após a síntese, os CLNs foram avaliados através das respostas: tamanho de partícula, índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta. Os resultados do estudo de otimização indicam maior relevância das taxas de cera de abelha para proporcionar menores tamanhos de partículas e IPD. Os resultados de potencial zeta foram mais impactados pela quantidade em massa de OACC. As (CLNs) foram produzidas com tamanho de partícula entre 236 a 976 nm e moderado IPD, resultados que foram confirmados pela análise de microscopia eletrônica de transmissão com tamanhos entre 200 a 300 nm. A. O sistema otimizado incorporou o bioativo isoquercitrina com 93,99% de eficiência, além de apresentar segurança não clínica, pois não apresentou toxicidade frente aos peixes *zebrafish*. As CLNs demonstraram ação de efeito não sedativo e/ou relaxante muscular no teste de atividade locomotora, excetuando-se a menor concentração. As CLNs apresentaram atividade antifúngica frente as cepas *candida spp* testadas nesse estudo trabalho.

Palavras-chave: biodiesel; método Taguchi; coco catolé; CLNs.

ABSTRACT

The use of regional oil sources with intermittent production are ideal for providing alternatives for renewable and biocompatible applications, as they reduce production costs, due to the reduction of the impact of the unavailability of raw materials. In this context, this work proposes the use of catolé coconut biomass for the synthesis of biodiesel through in situ transesterification and the synthesis of nanostructured lipid carriers (NLCs), linked to experimental planning using the Taguchi method. In situ transesterification was conducted through nine experiments varying catalyst rate, methanol/oil ratio and temperature. The mass yield was analyzed as a response. The optimized condition was obtained through the reaction with 2% catalyst, methanol/oil ratio 5:1 and 60 °C, providing a mass yield of 66.17%. The evaluated parameters presented a p-value with statistical significance, with the catalyst rate providing a greater impact on the synthesis yield. The physical-chemical parameters of biodiesel were evaluated, certifying that the material complies with international standards, highlighting the result of oxidative stability exceeding 18 h, and the combustion events in thermogravimetric analysis ranging from 224 to 258 °C, and activation energy (E_a) of 48.12 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, justified by the majority profile of saturated fatty acids demonstrated in the chromatographic analysis. Using nuclear magnetic resonance (NMR) analysis, the effectiveness of the synthesis in producing biodiesel with a conversion rate equal to 100% is confirmed. The optimized synthesis of CLNs was conducted by varying the masses of OACC catole coconut almond oil, beeswax and the surfactant Brij® 78, combined with the Taguchi method. After synthesis, the NLCs were evaluated based on the following responses: particle size, polydispersity index (IPD) and zeta potential. The results of the optimization study indicate greater relevance of beeswax rates to provide smaller particle sizes and IPD. Zeta potential results were most impacted by the mass amount of CCAO. (NLCs) were produced with particle sizes between 236 and 976 nm and moderate IPD, results that were confirmed by transmission electron microscopy analysis with sizes between 200 and 300 nm. A. The optimized system incorporated the bioactive isoquercitrin with 93.99% efficiency, in addition to presenting non-clinical safety, as it did not present toxicity towards zebrafish. NLCs demonstrated a non-sedative and/or muscle relaxing effect in the locomotor activity test, except for the lowest concentration. The NLCs showed antifungal activity against the *candida* spp strains tested in this study.

Keywords: biodiesel; Taguchi method; coco catolé; CLNs.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1- | Esquema reacional da transesterificação | 19 |
| Figura 2- | Esquema reacional das etapas da reação de transesterificação | 20 |
| Figura 3- | Esquema reacional comparativo entre a síntese do biodiesel convencional e a transesterificação in situ | 21 |
| Figura 4- | Imagens do coco catolé e das amêndoas do coco catolé trituradas | 22 |
| Figura 5- | Ácidos graxos majoritários no óleo de coco catolé | 23 |
| Figura 6- | Esquema reacional da transesterificação in situ do coco catolé | 27 |
| Figura 7- | Gráfico de efeito principal para médias quando rendimento era a resposta | 32 |
| Figura 8- | RMN ¹ H obtida a partir do óleo de coco catolé e do éster metílico do óleo de coco catolé, respectivamente | 35 |
| Figura 9- | Curvas TG e DTG do BMOACC em atmosfera oxidativa | 38 |
| Figura 10- | Regressão linear usando o método Flynn-Wall-Osawa a partir da análise de dados termogravimétricos de BMOACC em atmosfera oxidativa | 40 |
| Figura 11- | Gráfico do teste Rancimat acelerado obtido da amostra BMOACC | 42 |
| Figura 12- | Esquema de representação dos diferentes modelos de CLN | 49 |
| Figura 13- | Estrutura da Isoquercitrina | 51 |
| Figura 14- | Gráfico dos efeitos principais para a razão sinal-ruído quando a resposta é o tamanho de partícula | 62 |
| Figura 15- | Gráfico dos efeitos principais para a razão sinal-ruído quando a resposta é a polidispersividade da nanoemulsão..... | 64 |
| Figura 16- | Gráfico dos efeitos principais para a razão sinal-ruído quando a resposta é o potencial zeta da nanoemulsão | 66 |
| Figura 17- | Espectro comparativo na região do Infravermelho, entre CLN_B, CLN_ISQC e seus constituintes | 68 |
| Figura 18- | Imagens de CLN_B (A) e CLN_ISQC (B) obtidas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão | 69 |
| Figura 19- | Gráfico de distribuição dos tamanhos de partícula obtidas a partir de imagens extraídas da medida de microscopia eletrônica de transmissão. | 69 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 20- | Curvas de calorimetria exploratória diferencial das amostras CLN_B e CLN_ISQC | 70 |
| Figura 21- | Espectro de varredura da isoquercitrina | 71 |
| Figura 22- | Curva de Calibração da isoquercitrina | 72 |
| Figura 23- | Efeito da ISQC ou CLN_B ou CLN_ISQC sob a atividade locomotora do zebrafish (Danio rerio) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min) | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1- | Variáveis avaliadas na síntese de biodiesel em três níveis | 27 |
| Tabela 2- | Matriz experimental desenhada para o planejamento de experimentos com o rendimento da síntese de transesterificação <i>in situ</i> como resposta avaliada | 30 |
| Tabela 3- | Tabela contendo a resposta às relações sinal-ruído | 31 |
| Tabela 4- | Análise de variância (ANOVA) para os parâmetros que afetam o rendimento do éster metílico | 32 |
| Tabela 5- | Composição de ácidos graxos do óleo de coco catolé | 33 |
| Tabela 6- | Parâmetros físico-químicos de BMOACC e OACC | 36 |
| Tabela 7- | Resultados representativos da curva de degradação térmica BMOACC | 38 |
| Tabela 8- | Energia de ativação (E_a) e correlação linear (R) obtida pelo método Flynn- Wall-Ozawa para BMOACC em atmosfera oxidativa . | 40 |
| Tabela 9- | Codificação dos fatores e seus níveis | 53 |
| Tabela 10- | Design experimental por Taguchi para formulação de nanoemulsão contendo óleo de coco catolé (L9 3x3) | 54 |
| Tabela 11- | Resultados de Tamanho de partícula, Índice de polidispersividade e Potencial zeta das nove formulações dos dias 1 ao 30 | 55 |
| Tabela 12- | Resposta para razões sinal-ruído – tamanho de partícula | 61 |
| Tabela 13- | Análise de variância para razões S/N quando a resposta é tamanho de partícula | 61 |
| Tabela 14- | Resposta para razões sinal-ruído – índice de polidispersividade | 63 |
| Tabela 15- | Análise de variância para razões S/N quando a resposta é o índice de polidispersividade | 63 |
| Tabela 16- | Resposta para razões sinal-ruído– potencial zeta | 65 |
| Tabela 17- | Análise de variância dos resultados de potencial zeta para razões S/R | 65 |
| Tabela 18- | Correlação entre sinal x ruído de maior impacto para cada resposta avaliada na obtenção da nanoemulsão usando óleo de coco catolé | 67 |
| Tabela 19- | Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras testes frente ao <i>zebrafish</i> adulto | 73 |

Tabela 20- Avaliação do efeito antifúngico da isoquercitrina e dos nanocarreadores sintetizados frente a isolados de Candida spp 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| %CC | Capacidade de carregamento |
| %EE | Eficiência de encapsulamento |
| μ L | Microlitros |
| ANOVA | Análise de variância. |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| BMOACC | Biodiesel metílico do óleo da amêndoa de coco catolé |
| CA | Cera da Abelha |
| CED | Calorimetria Exploratória Diferencial |
| CG/EM | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa |
| CLN_B | Carreador lipídico nanoestruturado sem bioativo |
| CLN_ISQC | Carreador lipídico nanoestruturado com isoquercitrina |
| DTG | Derivada termogravimétrica |
| DZP | Diazepam |
| Ea | Energia de ativação |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| IE | Ionização eletrônica |
| IPD | Índice de Polidispersividade |
| ISQC | Isoquercitrina |
| IPD | Índice de polidispersividade |
| m/m | Massa/Massa |
| OACC | Óleo da amêndoa de coco catolé |
| PI | Período de indução |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| Rpm | Rotações por minuto |
| S/R | Sinal- ruído |
| TG | Termogravimétrica |
| UV | Ultravioleta |
| Uv- vis | Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta- visível. |

Zfa

Zebrafish

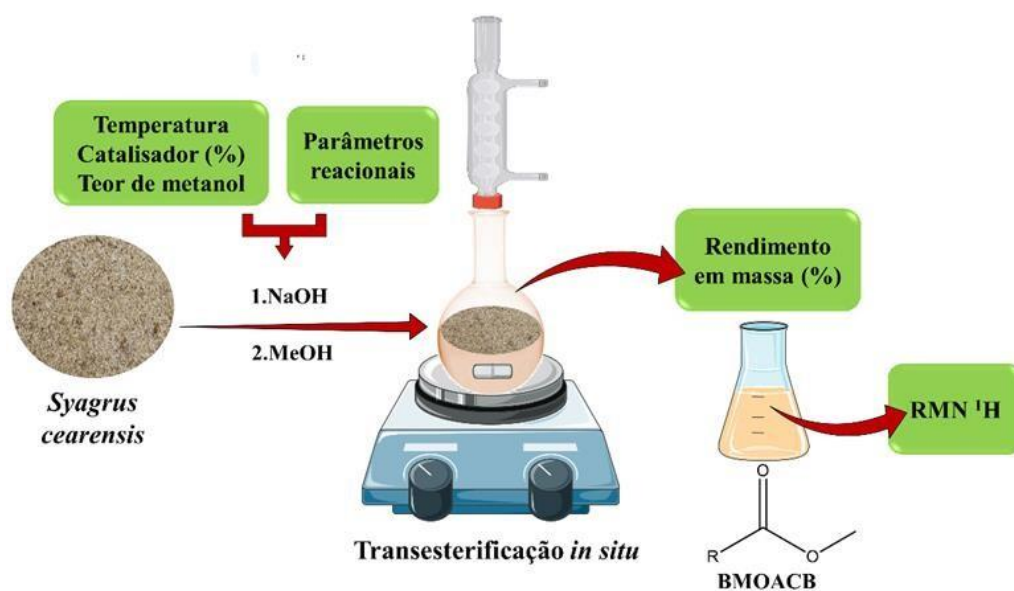
SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|-----------|
| 1 | CAPÍTULO I: TRANSESTERIFICAÇÃO <i>IN SITU</i> DO COCO CATOLÉ (<i>Syagrus cearensis</i>) UTILIZANDO DESENHO EXPERIMENTAL PELO MÉTODO TAGUCHI | 17 |
| 1.1 | Introdução | 18 |
| 1.2 | Fundamentação teórica | 19 |
| 1.2.1 | <i>Biodiesel</i> | 19 |
| 1.2.2 | <i>Transesterificação in situ</i> | 21 |
| 1.2.3 | <i>Coco catolé</i> | 22 |
| 1.2.4 | <i>Método Taguchi</i> | 23 |
| 1.3 | Objetivos | 25 |
| 1.3.1 | <i>Objetivo geral</i> | 25 |
| 1.3.2 | <i>Objetivos específicos</i> | 25 |
| 1.4 | Materiais e métodos | 26 |
| 1.4.1 | <i>Materiais</i> | 26 |
| 1.4.1.1 | <i>Matéria-prima</i> | 26 |
| 1.4.1.2 | <i>Reagentes</i> | 26 |
| 1.4.2 | <i>Métodos</i> | 26 |
| 1.4.2.1 | <i>Extração do óleo de coco catolé</i> | 26 |
| 1.4.2.2 | <i>Matriz experimental utilizando matriz ortogonal L9 – abordagem de Taguchi e análise de variância</i> | 26 |
| 1.4.3 | <i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa</i> | 28 |
| 1.4.4 | <i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN)</i> | 28 |
| 1.4.5 | <i>Caracterização físico-química</i> | 28 |
| 1.4.6 | <i>Análise termogravimétrica</i> | 28 |
| 1.4.7 | <i>Estabilidade oxidativa</i> | 29 |
| 1.5 | Resultados e discussão | 30 |
| 1.5.1 | <i>Otimização dos parâmetros da transesterificação in situ com óleo de coco catolé</i> | 30 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.5.2 | <i>Composição química do óleo de coco catolé</i> | 33 |
| 1.5.3 | <i>RMN ¹H</i> | 34 |
| 1.5.4 | <i>Parâmetros Físico-Químicos</i> | 36 |
| 1.5.5 | <i>Estabilidade Termo-Oxidativa</i> | 37 |
| 1.5.5.1 | <i>Análise termogravimétrica</i> | 37 |
| 1.5.5.2 | <i>Estabilidade oxidativa</i> | 41 |
| 1.6 | Conclusões | 43 |
| 2 | CAPÍTULO II: SÍNTESE DE CARREADORES LÍPIDICOS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DO ÓLEO DE COCO CATOLÉ E CERA DE ABELHA | 45 |
| 2.1 | Introdução | 46 |
| 2.2 | Fundamentação teórica | 48 |
| 2.2.1 | <i>Infecções fúngicas</i> | 48 |
| 2.2.2 | <i>Carreador lipídico nanoestruturado</i> | 48 |
| 2.2.3 | <i>Cera de abelha</i> | 50 |
| 2.2.4 | <i>Isoquercitrina</i> | 50 |
| 2.3 | Objetivos | 52 |
| 2.3.1 | <i>Objetivo geral</i> | 52 |
| 2.3.2 | <i>Objetivos específicos</i> | 52 |
| 2.4 | Materiais e métodos | 53 |
| 2.4.1 | <i>Materiais</i> | 53 |
| 2.4.2 | <i>Metodologia</i> | 53 |
| 2.4.2.1 | <i>Síntese dos carreadores lipídicos nanoestruturados</i> | 53 |
| 2.4.2.2 | <i>Tamanho de partícula e Índice de polidispersividade</i> | 54 |
| 2.4.2.3 | <i>Potencial zeta</i> | 54 |
| 2.4.2.4 | <i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR) ..</i> | 56 |
| 2.4.2.5 | <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i> | 56 |
| 2.4.2.6 | <i>Calorimetria exploratória diferencial</i> | 56 |
| 2.4.2.7 | <i>Eficiência de encapsulação e capacidade de carreamento</i> | 56 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 2.4.2.8 | <i>Avaliação da segurança não clínica</i> | 57 |
| 2.4.2.8.1 | Zebrafish | 57 |
| 2.4.2.8.1 | Protocolo geral | 57 |
| 2.4.2.8.3 | <i>Toxicidade aguda 96 h</i> | 58 |
| 2.4.2.8.4 | <i>Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)</i> | 58 |
| 2.4.2.9 | <i>Avaliação da atividade antifúngica</i> | 59 |
| 2.5 | Resultados e discussão | 59 |
| 2.5.1 | Tamanho de Partícula e Potencial Zeta | 59 |
| 2.5.2 | Determinação de parâmetros ótimos para formulação de nanoemulsão utilizando óleo de coco catolé (<i>Syagrus cearensis</i>) | 60 |
| 2.5.2.1 | Resposta – Tamanho de partícula | 60 |
| 2.5.2.2 | Resposta – Índice de polidispersividade | 62 |
| 2.5.2.3 | Resposta – Potencial Zeta | 64 |
| 2.5.3 | Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR) | 67 |
| 2.5.4 | Microscopia eletrônica de transmissão | 68 |
| 2.5.4 | Calorimetria exploratória diferencial | 70 |
| 2.5.5 | Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento da isoquercitrina | 71 |
| 2.5.6 | Avaliação da segurança não clínica | 73 |
| 2.5.6.1 | Toxicidade 96 h | 73 |
| 2.5.6.2 | Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto) | 73 |
| 2.5.7 | Análise antifúngica | 75 |
| 2.6 | Conclusões | 77 |
| | Referências | 78 |

CAPÍTULO I
TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* DO ÓLEO DE COCO CATOLÉ (*Syagrus cearensis*)
UTILIZANDO DESENHO EXPERIMENTAL PELO MÉTODO TAGUCHI



1.1 Introdução

O nível atual de consumo global dos combustíveis fósseis está aumentando constantemente, devido à crescente demanda por energia (MOHIDDIN et al., 2021). Nessa conjuntura o petróleo desempenha um grande papel no fornecimento de energia. Todavia, esse combustível fóssil é uma fonte não renovável, além de ser mais prejudicial ao meio ambiente.

O uso de reservas energéticas baseadas em combustíveis fósseis ao longo de muitos anos trouxe como consequência um aumento na temperatura média do planeta, contribuindo desta forma para o aquecimento global, devido à liberação extensiva do dióxido de carbono (CO₂) (ZULQARNAIN et al., 2021), além disso o aumento da poluição devido ao emprego de combustíveis fósseis, principalmente carvão e gás natural, resulta no aumento de problemas respiratórios.

Atualmente, a substituição de combustíveis fósseis (carvão, gás natural e petróleo) por energias renováveis está sendo fomentada devido ao esgotamento das fontes de energia não renováveis e seu impacto negativo no meio ambiente (LEMÕES et al., 2016). Dentro dessa perspectiva, os biocombustíveis produzidos a partir da biomassa, se constituem em alternativas de recursos energéticos mais viáveis para superar as desvantagens advindas da utilização de combustíveis agressivos ao meio ambiente, além de fornecerem maior segurança energética (TIEN THANH et al., 2022).

A partir da crescente demanda por energia e preferencialmente com emissões mais limpas, a produção de biodiesel tem sido considerada uma alternativa promissora frente a utilização dos combustíveis fósseis (HOEKMAN et al., 2012). O biodiesel torna-se um candidato promissor para ser utilizado como biocombustível pelos setores de transporte, devido a baixa emissão de poluentes, biodegradabilidade e não toxicidade (KIRUBAKARAN; ARUL MOZHI SELVAN, 2018).

Todavia, a utilização do biodiesel em escala maior apresenta alguns fatores limitantes, dentre os quais lista-se os altos custos de produção, a disponibilidade de matéria-prima e o custo dos óleos vegetais (BARUA et al., 2020). Visando a redução de custos de produção, a utilização da transesterificação *in situ* é preferível em relação aos métodos convencionais porque o tempo de reação, a utilização de solvente e a necessidade de energia são reduzidos (PARTHIBAN; PANDIAN; SUBRAMANIAN, 2021).

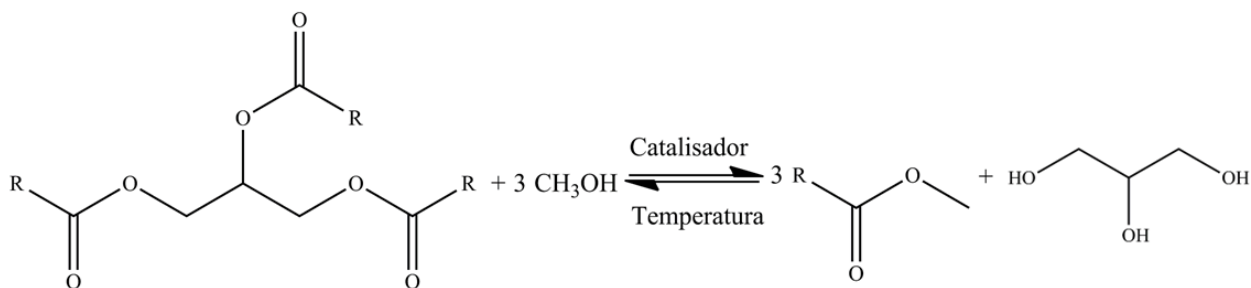
O emprego de fontes oleaginosas da região e que apresentam produção intermitente, são ideais para mitigar os efeitos sobre o custo de produção do biodiesel, pois reduz o impacto no aspecto da disponibilidade de matéria-prima (DA COSTA CARDOSO et al., 2019). Partindo dessa premissa o *Syagrus cearensis* (coco catolé) é um promissor candidato a fonte de produção do biodiesel com custo de produção reduzido, pois apresenta produção intermitente e amêndoas com alto teor de lipídeos, tornando-se ideal para aplicação idealizada.

1.2. Fundamentação teórica

1.2.1. Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável formado por ésteres alquílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa (HOEKMAN et al., 2012), obtidos a partir de processos químicos tais como a transesterificação ou esterificação. Utilizando como base a reação de transesterificação conforme a Figura 1, que por sua vez é a mais comumente empregada. Os triglicerídeos presentes nas fontes de óleo reagem com um álcool primário, metanol ou etanol, na presença de um catalisador, homogêneo (ácido ou base) ou heterogêneo, gerando dois produtos: o biodiesel e a glicerina (AMBAT; SRIVASTAVA; SILLANPÄÄ, 2018).

Figura 1- Esquema reacional da transesterificação.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

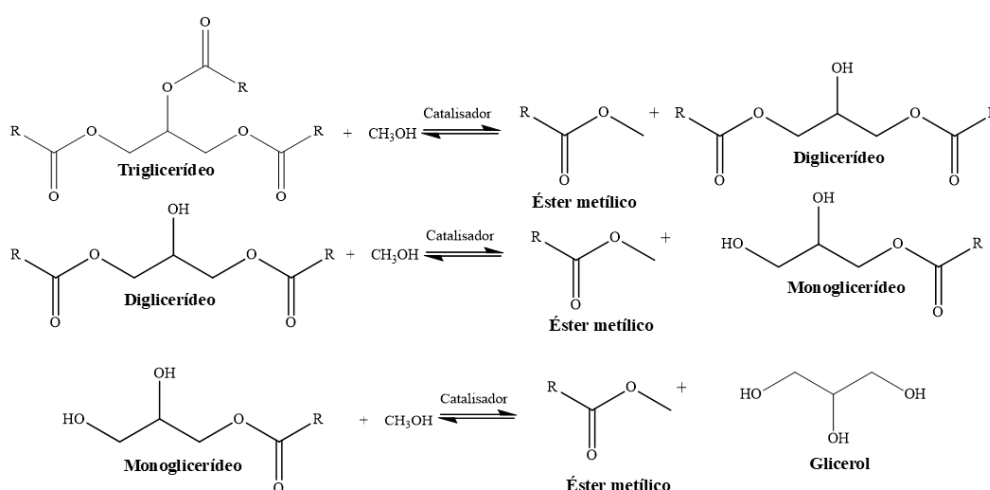
A reação de transesterificação possui como característica ser reversível, portanto os fatores que perturbam um equilíbrio químico geral, influenciam na reação de transesterificação. A razão molar álcool/óleo para a reação de transesterificação é um parâmetro relevante de acordo com a teoria do princípio de Le Chatelier, haja vista que adições de álcool podem deslocar o equilíbrio no sentido da formação dos produtos. No entanto, o excesso de metanol pode resultar no aumento da solubilidade do glicerol, levando a uma redução da conversão de triglicerídeo em éster metílico (BOKHARI et al., 2020).

No que diz respeito à concentração do catalisador, quantidades insuficientes de catalisador resultam na conversão incompleta de triglicerídeos em ésteres alquílicos, contudo a adição excessiva de catalisador alcalino pode proporcionar através da reação com os triglicerídeos, um aumento da reação de saponificação, contribuindo para a redução do rendimento de síntese (TAN et al., 2019). Os catalisadores podem ser ácidos, básicos e heterogêneos, todavia os catalisadores heterogêneos são dispendiosos, catalisadores ácidos tendem a retardar as reações e contribuem para o desgaste do equipamento, tornando-os menos adequados para aplicações em larga escala. Em contraste, os catalisadores básicos são mais econômicos, apresentam maior reatividade, e eficiência (KOSURO et al., 2024).

A temperatura é outro parâmetro relevante da reação visto que esta conversão é um processo endotérmico, sendo favorecido pelo aumento da temperatura. No entanto, um aumento drástico na temperatura pode causar a ebulição do metanol, o que levaria a uma diminuição na conversão.

Tomando por base o mecanismo geral apresentado na Figura 2, a transesterificação dos ácidos graxos em biodiesel envolve três etapas reversíveis sequenciais: a conversão de triglicerídeo em diglicerídeo, o diglicerídeo transformando-se em monoglicerídeo e o monoglicerídeo convertido em glicerol, não obstante em que cada etapa está interligada com a formação de diferentes ácidos graxos (TIEN THANH et al., 2022).

Figura 2- Esquema reacional das etapas da reação de transesterificação.



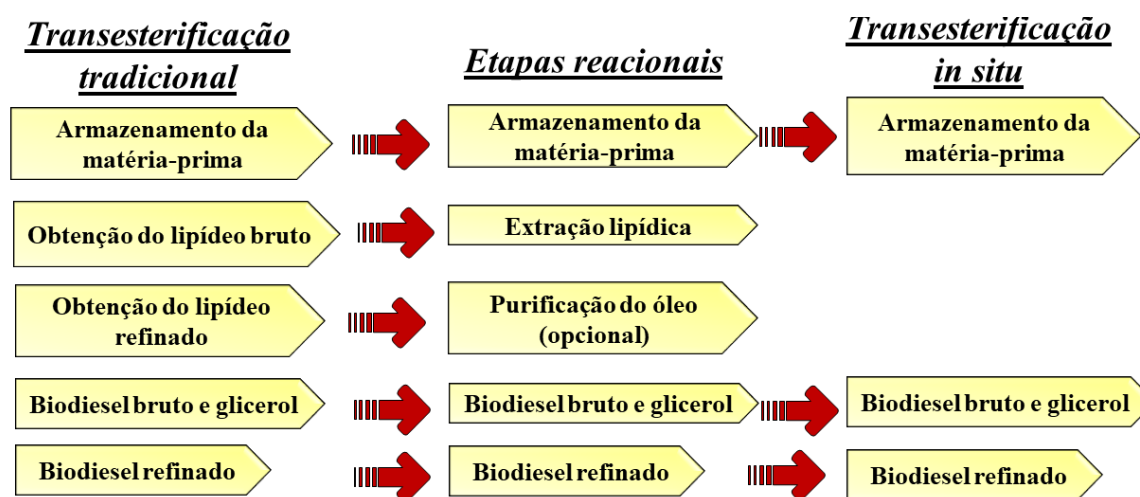
A aplicabilidade do biodiesel sintetizado, como substituto do diesel de petróleo apresenta viabilidade devido similaridade das propriedades físico-químicas entre os combustíveis, o que propicia a aplicação direta no motor sem a realização de modificação

mecânica (NIU et al., 2018). Além disso, o biodiesel possui como vantagens adicionais em comparação com o diesel de petróleo, a sua renovabilidade, sustentabilidade e emissão minimizada de CO₂, SO₂ e hidrocarbonetos (SHAN et al., 2018). Contudo o biodiesel só pode ser comercializado na forma de produto, após passar por processos de purificação para adequação à especificação de qualidade, destinando-se principalmente à aplicação em motores de ignição por compressão (ANP., 2014).

1.2.2. Transesterificação *in situ*

A transesterificação *in situ*, consiste em um método de produção de biodiesel realizado em um único sistema, necessitando da utilização de um solvente que seja capaz de atuar como solvente de extração e reagente de transesterificação simultaneamente, enquanto que na transesterificação convencional emprega-se diferentes solventes de extração e reagentes de transesterificação conforme demonstrado na Figura 3. Desta forma o método *in situ* apresenta-se vantajoso devido a redução tanto do uso de reagentes quanto do número de etapas usadas na síntese do biodiesel (AHMED et al., 2022).

Figura 3- Fluxograma comparativo entre a síntese de biodiesel convencional e a transesterificação *in situ*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Uma diferença perceptível nas etapas de produção é a necessidade de extração e a possível necessidade de refinamento do material lipídico advindo da matéria-prima sólida em etapas de processamento separadas. A prensa mecânica e o extrator de solventes utilizados no processo de extração e refino de óleos costumam contribuir para o aumento dos custos de produção. A eliminação das etapas de extração de óleo não apenas reduz a quantidade de etapas, mas também pode resultar em um menor custo de investimento inicial (GO et al., 2016)

(MOHAMADZADEH SHIRAZI; KARIMI-SABET; GHOTBI, 2017). Além disso, expõem em menor proporção o material lipídico à degradação/oxidação pós extração resultando na eliminação da degradação por estresse térmico.

Essas características da rota sintética reduzem o custo do processo de produção em uma única etapa, melhoram sua eficiência de conversão, oferecendo assim uma produção de biodiesel viável economicamente (DA COSTA CARDOSO et al., 2019). Nesse contexto, a busca por recursos abundantes, inovadores e de baixo custo é essencial para fornecer alternativas viáveis para o desenvolvimento da indústria de biodiesel (HOEKMAN et al., 2012).

Os principais fatores que afetam a reação de transesterificação são a fonte oleaginosa, a concentração dos catalisadores, o tipo de álcool, a razão molar, a temperatura e o tempo da reação. A compreensão da cinética da reação na transesterificação *in-situ*, bem como a perspectiva termodinâmica, são importantes para revelar a barreira de energia da reação e espontaneidade da reação (KIM et al., 2015).

1.2.3. *Coco catolé*

O catolé (*Syagrus cearensis*) é uma árvore brasileira da família *Arecaceae*, amplamente utilizada para fins ornamentais no Brasil (ALVES et al., 2022). Devido à sua impressionante capacidade de adaptação ao clima semiárido e tropical, esta palmeira pode ser encontrada no Nordeste do Brasil, produzindo frutos que são chamados de coco catolé, conforme mostrados na figura 4 (SOUSA et al., 2017).

Figura 4- Imagens do coco catolé e das amêndoas do coco catolé trituradas.

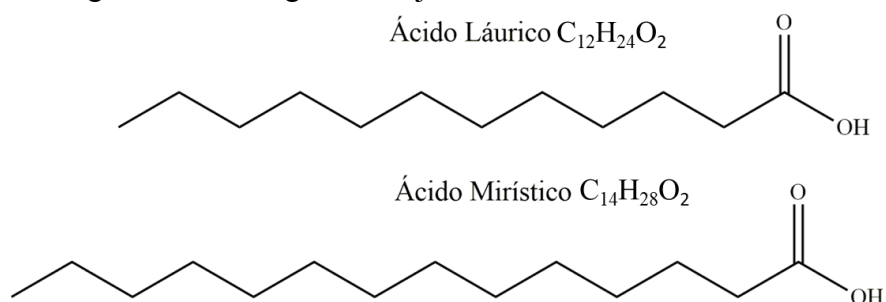


Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

As amêndoas desse coco têm potencial de aplicação para a síntese de biodiesel devido ao alto teor de triglicerídeos, cerca de 50%. Estudos publicados relatam que o óleo da amêndoa de coco catolé (OACC), possui composição química com alto teor de ácidos carboxílicos saturados (ácido láurico e mirístico) cujas estruturas estão dispostas na Figura 5 (PASCOAL et al., 2020). Essa composição de ácidos graxos da oleaginosa, resulta na característica dos óleos fixos desta fonte, apresentarem propriedades emolientes quando

incorporados em formulações tópicas (SOUSA et al., 2017).

Figura 5- Ácidos graxos majoritários no óleo de coco catolé.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

A composição da fração de ácidos graxos da molécula de éster metílico é o fator que mais afeta suas propriedades, como propriedades de fluxo a frio, índice de cetano, ponto de fulgor, estabilidade à oxidação e estabilidade térmica, por exemplo (ATHAR; ZAIDI, 2020).

Outras propriedades influenciadas pela composição química do óleo de coco catolé são as emissões de gases NO_x , CO e hidrocarbonetos totais (HCs), que decrescem com a medida em que as cadeias carbônicas apresentam configuração saturada (PUHAN et al., 2010), além disso estudos apontam correlação entre o resultado de índice de iodo e as emissões dos gases supracitados (VARGHESE et al., 2022).

1.2.4. Método Taguchi

A produção de biodiesel pode ser afetada por diversos parâmetros, suscitando a necessidade da aplicação de métodos que proporcionem a otimização da síntese de biodiesel (NAYAK; VYAS, 2022). A partir da premissa outrora dissertada, Genichi Taguchi criou um método estatístico para investigar a influência de diferentes variáveis nas características de desempenho que determinam as condições operacionais otimizadas de um processo produtivo.

Através da abordagem de Taguchi, procede-se por meio da escolha de um problema, a partir de então é realizada a seleção cuidadosa de parâmetros do projeto, chamados de fatores, resultando em um design mais robusto capaz de suportar variações de fontes indesejadas. Partindo da premissa anteriormente exposta, Taguchi propôs um método eficaz para determinar a combinação viável de parâmetros de projeto que reduz a variabilidade nas respostas do produto (RAO et al., 2013).

O método Taguchi é uma abordagem usada para determinar a combinação ideal de fatores para melhorar o desempenho de qualquer processo de produção (SIDDESHWARE; KHICHADE; LOKAVARAPU, 2022). A melhoria desses produtos e processos de fabricação

vem da percepção de que a qualidade de fabricação de um produto é afetada por influências externas, também conhecidos como ruídos ou variáveis incontroláveis (CHEN et al., 2022). A principal vantagem deste método de otimização Taguchi, é o emprego da matriz ortogonal L9 de quatro fatores, o que significa que esta plataforma de otimização irá requerer apenas 9 experimentos (FALOWO; BETIKU, 2022).

A utilização da relação sinal-ruído (S/R) na aplicação do método Taguchi torna-se fundamental como parâmetro indicador de qualidade, haja vista que a relação S/R refere-se a um resultado obtido através de cálculo ao invés de um valor de desvio padrão. O desvio padrão e o valor médio são diretamente proporcionais entre si, resultando em reduções no valor médio que provavelmente causam diminuição no desvio padrão e vice-versa. Portanto, as características de qualidade são listadas em três categorias em três grupos denominados “quanto maior os resultados, melhor”, “quanto menor os resultados, melhor” e “resultados nominais, melhor” (ALIY GOBENA; KUMAR; SUPPIAH, 2021).

O presente estudo utilizou um experimento fatorial desenhado pelo método de Taguchi para otimizar as condições da reação de transesterificação *in situ* do óleo de coco catolé. Os seguintes parâmetros foram otimizados: proporção de catalisador, proporção de metanol/OACC e temperatura. Os resultados de rendimento de massa da síntese de biodiesel *in situ* foram selecionados como a resposta desejada, portanto o rendimento da síntese foi maximizado, haja vista que a resposta desejada era “quanto maior o rendimento da reação em massa, melhor”. A eficiência da síntese do biodiesel foi avaliada pela transformação de triglicerídeos em ésteres metílicos, com o objetivo de avaliar a viabilidade de empregar o óleo de coco catolé como recurso para produção de biocombustível.

1.3. Objetivos

1.3.1 *Objetivo geral*

Otimizar a síntese de biodiesel do óleo da amêndoa de coco catolé com intuito de tornar o produto sintetizado viável nos aspectos químico e econômico.

1.3.2. *Objetivos específicos*

- Sintetizar biodiesel através do óleo de coco catolé;
- Otimizar os parâmetros da transesterificação *in situ* do óleo de coco catolé;
- Determinar a composição de ácidos graxos da amostra;
- Analisar as propriedades físico-químicas do biodiesel produzido;
- Determinar o rendimento da síntese;
- Investigar as propriedades térmicas do biodiesel sintetizado;
- Analisar a estabilidade oxidativa do material;
- Determinar a taxa de conversão da reação.

1.4. Materiais e métodos

1.4.1 Materiais

1.4.1.1. Matéria-prima

O coco catolé (*Syargrus cearensis*) foi coletado na Universidade Federal do Ceará, localizada em Fortaleza, CE, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 3° 44.5508' Sul, Longitude: 38° 34.4573' Oeste. O uso foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) pelo número de registro AF8D0A2. Os frutos foram coletados e armazenados, com o objetivo de retirar-se as amêndoas após os processos de despulpamento dos frutos e secagem dos endocarpos em local aberto, e posteriormente foram quebradas por equipamentos mecânicos adequados.

1.4.1.2. Reagentes

Os solventes utilizados neste estudo foram: metanol (Synth, 99,9%), hexano (Synth, 98,5%) e água destilada e hidróxido de sódio (Synth), utilizado como catalisador.

1.4.2. Métodos

1.4.2.1. Extração do óleo de coco catolé

A extração do óleo de coco catolé foi realizada para determinar o teor de óleo nas amêndoas coletadas, pois esse dado foi necessário para o planejamento experimental da transesterificação *in-situ*. As amêndoas de coco catolé (50 g) foram secas em estufa a 45 °C, trituradas em liquidificador e colocadas no sistema Soxhlet. O óleo de coco catolé foi extraído com 500 mL de hexano sob refluxo por 6 h. O óleo extraído foi filtrado, submetido a secagem com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para retirada de água remanescente e concentrado em evaporador rotativo para obtenção do óleo de *Syargrus cearensis* com rendimento médio de 50 ± % m/m.

1.4.2.2. Matriz experimental utilizando matriz ortogonal L9 – abordagem de Taguchi e análise de variância.

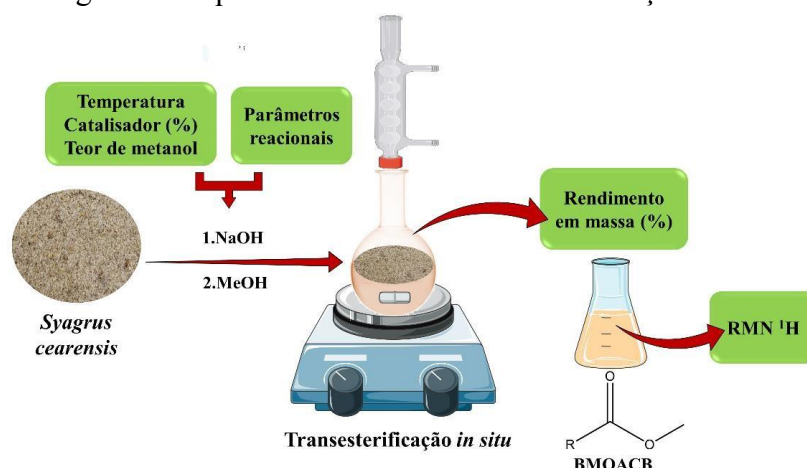
As condições experimentais ótimas para a transesterificação *in situ* foram determinadas usando o método de planejamento estatístico de Taguchi. A modelagem estatística foi desenvolvida para avaliar o rendimento da reação como resposta, e a temperatura (40 °C - 60 °C), teor de metanol/óleo (4:1-6:1) respeitando a seguinte ordem: (volume de metanol:massa de CCAO) e taxa de catalisador (1% - 3%,) com relação a massa de OACC,

como parâmetros. As variáveis foram avaliadas em três níveis, conforme descrito na Tabela 1: Tabela 1- Variáveis avaliadas na síntese de biodiesel em três níveis.

| Variáveis | Baixo (1) | Médio (2) | Alto (3) |
|---------------------------|-----------|-----------|----------|
| Catalisador (%) | 1 | 2 | 3 |
| Metanol/Óleo (v(mL)/m(g)) | 4:1 | 5:1 | 6:1 |
| Temperatura (°C) | 40 | 50 | 60 |

A síntese foi conduzida com o catalisador sendo pesado em função da massa de óleo (25 g) e o volume de álcool inserido no experimento. O catalisador foi dissolvido no álcool e transferido para o frasco que funcionaria como um reator. Em seguida, o coco foi seco e moído, sendo adicionado ao reator constituído por balão de fundo redondo, condensador e barra magnética, de acordo com a disposição mostrada na figura 6.

Figura 6- Esquema reacional da transesterificação *in situ* do coco catolé.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Todos os reagentes foram inseridos no sistema após atingir a temperatura requerida em cada experimento. O reator permaneceu sob refluxo na temperatura especificada no projeto experimental e agitação contínua por cinco horas. Ao final do tempo de reação, o material sólido foi filtrado em kitassato para separação da fração líquida. A parte líquida foi submetida a evaporação rotativa para retirada do excesso de álcool e o biodiesel obtido, lavado com água destilada com intuito de retirar-se excessos de KOH, até a neutralização. Após a neutralização, o material foi submetido à análise de ressonância magnética nuclear para verificar a conversão do OACC em biodiesel metílico do óleo da amêndoa de coco catolé (BMOACC).

A análise estatística de variância (ANOVA) foi realizada para verificar quais parâmetros foram significativos para o experimento considerando os dados estatísticos. A

análise da relação sinal/ruído (S/R) dos parâmetros permitiu determinar o nível otimizado para cada parâmetro e as condições ótimas para a extração. Teste de Fischer (valor F) e valor P foram realizados para avaliar como os parâmetros afetam a resposta e a significância do modelo de experimento, que foi analisada utilizando $P < 0,05$.

1.4.3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

BMOACC sintetizado, foi submetido à análise pela técnica de CG/EM no equipamento SHIMADZU QP-2010 ULTRA equipado com coluna capilar (5%-fenil)-metilpolissiloxano (DB-5) (30 m × 0,25 mm). O gás hélio foi utilizado como gás carreador (vazão de 0,6 mL. min⁻¹) no modo *splitless* (com um volume de material injetado correspondente a 1 µL da solução de 1 mg/mL do produto diluído em acetato de etila). A temperatura do forno foi inicialmente ajustada para 120 °C e programada com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ a 300 °C, mantida por 10 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 e 300 °C, respectivamente. O analisador quadrupolo configurado para ionização eletrônica (IE) e escaneado em uma faixa entre 50 a 450 m/z.

1.4.4. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN)

A caracterização da estrutura do BMOACC bem como a determinação da taxa de conversão da reação foram obtidas através da técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN), que foi realizada no centro nordestino de aplicação e uso da ressonância magnética nuclear (CENAUREMN) utilizando um espectrômetro Bruker modelo DRX-500, operado a uma frequência de 498 MHz. Neste ensaio as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado. Os deslocamentos químicos obtidos no espectro foram expressos em PPM.

1.4.5. Caracterização físico-química

A viscosidade cinemática a 40 °C e 100 °C foi medida de acordo com ASTM D1298 e ASTM D445, respectivamente. A densidade foi medida a 20 °C e o índice de viscosidade foram calculados de acordo com ASTM D2270. O índice de saponificação foi determinado usando o AOCS Cd 3-25.

1.4.6. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do BMOACC foi avaliada usando um equipamento de análise termogravimétrica/diferencial Shimadzu DTG-60H sendo operado em uma atmosfera

de ar sintético. A análise foi realizada em cinco taxas de aquecimento diferentes (5, 15, 25, 30 e 40 °C. min⁻¹), com o intuito de viabilizar o estudo cinético reação.

1.4.7. Estabilidade oxidativa

O teste Rancimat acelerado foi realizado para fornecer uma estimativa da estabilidade oxidativa do BMOACC. O período de indução (PI) é definido como o intervalo de tempo que corresponde ao ponto de inflexão da curva de condutividade em função do tempo, conforme (EN 14112, 2016). Os testes foram realizados em aparelho Rancimat 873 (Metrohm, Herisau, Suíça), com temperatura de 110 °C e vazão de ar de 20 L.h⁻¹. A massa de 2 g da amostra foi inserida em cada tubo de reação e as análises foram realizadas em triplicata.

1.5. Resultados e discussão

1.5.1. Otimização dos parâmetros da transesterificação *in situ* do óleo de coco catolé.

Na Tabela 2 foram expressos os resultados de rendimento em massa obtidos a partir dos nove experimentos realizados, podendo-se concluir que os experimentos 1 e 5 proporcionaram o menor e o maior resultado de rendimento em massa respectivamente. Entretanto, a condição dada no experimento 5, que proporcionou o maior resultado de rendimento em massa bem como as demais condições testadas no planejamento experimental, não foram capazes de propiciar a condição ideal para a reação tendo em vista os resultados obtidos, que não alcançaram 100%, podendo ser explicado pela capacidade extratora limitada do metanol, proporcionando menor disponibilidade de triglicerídeos para a reação, propiciando leve redução no rendimento da síntese. Partindo dessa premissa aplicou-se o projeto estatístico para que se alcançasse a condição otimizada da síntese, através de equação que descreva as condições ideais.

Tabela 2- Matriz experimental desenhada para o planejamento de experimentos com o rendimento da síntese de transesterificação *in situ* como resposta avaliada.

| Experimentos realizados | Catalisador (%) | Metanol/Óleo V(mL)/m(g)) | Temperatura (°C) | Rendimento em massa da síntese (%) |
|-------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|------------------------------------|
| 1 | 1 | 4:1 | 40 | 24,38 |
| 2 | 1 | 5:1 | 50 | 55,37 |
| 3 | 1 | 6:1 | 60 | 34,24 |
| 4 | 2 | 4:1 | 50 | 60,66 |
| 5 | 2 | 5:1 | 60 | 66,17 |
| 6 | 2 | 6:1 | 40 | 49,59 |
| 7 | 3 | 4:1 | 60 | 39,88 |
| 8 | 3 | 5:1 | 50 | 42,28 |
| 9 | 3 | 6:1 | 40 | 48,44 |

Após a realização dos experimentos sugeridos pelo delineamento de Taguchi, os dados foram processados no software estatístico Minitab®. Uma das principais vantagens na utilização de Taguchi como método de projeto estatístico é a redução dos experimentos necessários na modelagem (CHOWDHURY et al., 2014). Para a análise, o rendimento da síntese de BMOACC foi maximizado, pois a resposta desejada era “quanto maior o rendimento da reação, melhor”.

Estudos mostraram que quantidades excessivas de catalisadores alcalinos tendem a reduzir o rendimento do biodiesel, pois proporcionam aumento na viscosidade aparente dos reagentes, levando à formação de géis, um obstáculo na separação da glicerina, reduzindo o rendimento da reação (BOKHARI et al., 2020). Porém, quantidades insuficientes de catalisador proporcionam menor rendimento da reação de transesterificação, pois a quantidade de catalisador pode ser menor que a necessária para dar prosseguimento as reações (SINGH et al., 2022). Baseado na premissa anteriormente citada, existem possibilidades nas quais a condição utilizada para a taxa de catalisador neste estudo esteja entre os valores mínimo e máximo.

A análise de variância mostrou que o valor F para o catalisador como fator foi significativamente maior do que o observado para temperatura e razão metanol/OACC. Os três parâmetros foram avaliados através do fator P e apresentaram valor abaixo de 0,05, reforçando sua importância estatística no rendimento como resposta, conforme a Tabela 4. Na análise da parcela de efeito principal para médias mostrada na Tabela 3 e na Figura 7, o nível 2 para os parâmetros foi escolhido como a condição ótima, pois nesse nível as três variáveis estudadas apresentaram os maiores resultados de rendimento em massa, logo o biodiesel produzido nesta condição foi submetido à caracterização química e físico-química.

A Tabela 3 contendo as respostas para a relação sinal/ruído mostrou que o catalisador foi o fator que mais impactou na resposta rendimento em massa da síntese, seguido da temperatura e posteriormente da relação metanol/OACC. Contudo ao confrontarmos esses resultados com dados publicados por (ESAN et al., 2021) utilizando o carbonato de dimetila ao invés do metanol, percebeu-se que o fator mais impactante na síntese foi a temperatura, explicitando como a utilização de diferentes reagentes impactam na forma como os parâmetros estudados influenciam na síntese.

Tabela 3- Resposta às relações sinal-ruído com relação ao rendimento em massa da síntese de biodiesel.

| Nível | Catalisador | Metanol/Óleo | Temperatura |
|--------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Alto | 31,10 | 31,80 | 31,39 |
| Médio | 35,33 | 34,60 | 34,74 |
| Baixo | 32,75 | 32,77 | 33,04 |
| Delta | 4,23 | 2,80 | 3,35 |

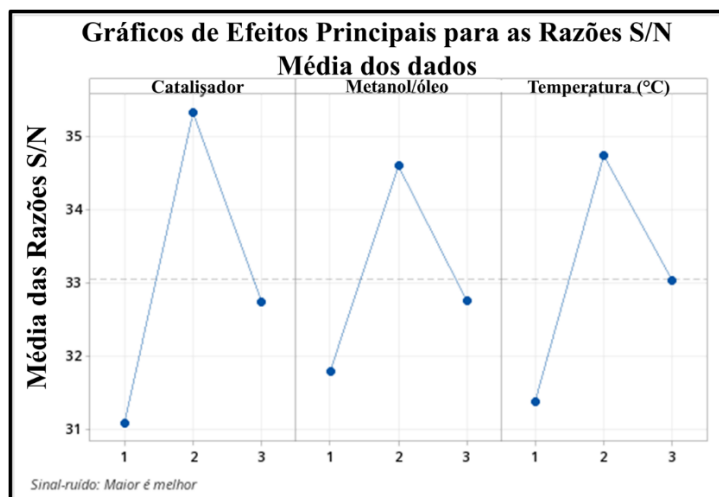
| | | | |
|----------------|---|---|---|
| Rank | 1 | 3 | 2 |
| Maior é melhor | | | |

Tabela 4- Análise de variância (ANOVA) para os parâmetros que afetam o rendimento do éster metílico.

| Fonte | GL ^a | Aj SQ ^b | Aj MQ ^c | Valor – F ^d | Valor – P ^e |
|--------------|-----------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| Catalisador | 2 | 696,99 | 348,493 | 65,22 | 0,015 |
| Metanol/Óleo | 2 | 284,74 | 142,369 | 26,65 | 0,036 |
| Temperatura | 2 | 387,53 | 193,765 | 36,27 | 0,027 |
| Erro | 2 | 10,69 | 5,343 | | |
| Total | 8 | | | | |

^aGraus de liberdade. ^bAjuste da soma dos quadrados. ^cAjuste da média dos quadrados.

Figura 7- Gráfico de efeito principal para médias quando rendimento era a resposta.



Em contrapartida quando comparamos os dados obtidos nesse estudo com os resultados obtidos por (YESILYURT; CESUR, 2022), pode-se concluir que o perfil das respostas envolvendo as variáveis também utilizando o método Taguchi, apresentou comportamento similar, pois taxa de catalisador e temperatura respectivamente, foram os fatores mais eficazes para proporcionar uma melhor resposta.

Conforme o processamento dos dados pelo software estatístico, o modelo linear

geral previu uma equação de regressão para o modelo experimental, descrita na Equação 1, que considerou os fatores e os níveis adotados no experimento. O coeficiente de regressão linear (r^2) foi de 0,9923 e o coeficiente de regressão linear ajustado $-r^2_{adj}$ foi de 0,9660, respectivamente. Esses valores estavam de acordo com o coeficiente de regressão linear predito $-r^2_{pred}$ pela análise de variância (ANOVA) para o modelo sugerido, que foi de 0,8432.

Rendimento (%) = $(46,779 - 8,78 \text{ catalisador}_1 + 12,03 \text{ catalisador}_2 - 3,25 \text{ catalisador}_3 - 5,14 \text{ metanol/óleo}_1 + 7,83 \text{ metanol/óleo}_2 - 2,69 \text{ metanol/óleo}_3 - 8,03 \text{ temperatura}_1 - 8,04 \text{ temperatura}_2 - 0,02 \text{ temperatura}_3)$ Equação 1.

Os níveis das condições de reação apontadas pela abordagem de Taguchi na presente pesquisa foram inferiores aos observados em outros estudos relatados na literatura (NAYAK; VYAS, 2022). Nesse sentido, a abordagem de Taguchi foi extremamente eficiente para fornecer a melhor condição de reação e identificar os fatores que afetam a transesterificação *in situ*.

1.5.2. Composição química do óleo de coco catolé

O perfil de ácidos graxos do material foi analisado pela técnica de CG-EM, cujos resultados estão detalhados na Tabela 5.

Tabela 5- Composição de ácidos graxos do óleo de coco catolé.

| Ácidos graxos | Símbolos | Resultados obtidos (%) | (PASCOAL et al.; 2020) (%) |
|----------------------|----------|------------------------|----------------------------|
| Ácido Cáprico | C8:0 | ----- | 7,09 |
| Ácido Caprílico | C10:0 | ----- | 5,74 |
| Ácido Láurico | C12:0 | 41,58 | 45,66 |
| Ácido Mirístico | C14:0 | 21,61 | 17,73 |
| Ácido Palmítico | C16:0 | 11,15 | 7,27 |
| Ácido Linoleico | C18:2 | ----- | 0,79 |
| Ácido Oleico | C18:1 | 16,74 | 11,86 |
| Ácido Estearico | C18:0 | 6,95 | 3,86 |
| Σ saturados | - | 81,29 | 87,35 |
| Σ insaturados | - | 16,74 | 12,65 |
| Total | - | 98,03 | 100,00 |

A composição química do óleo de coco catolé foi determinada por CG-EM e apresentada na Tabela 5. A partir dos resultados coletados, observou-se que o OACC possui 81,29% de sua composição formada por ácidos graxos saturados, e 16,74% por ácidos graxos insaturados. Esses resultados obtidos na composição do óleo são característicos de oleaginosas da família *Aracaceae*. A massa molar média do óleo de coco catolé foi estimada em 742,85 g.mol⁻¹, resultado diferente do encontrado por (PASCOAL et al; 2020), devido à grande presença de ácidos graxos saturados.

O ácido graxo majoritário no óleo de coco catolé foi o ácido láurico, correspondendo a 41,58% da composição total, seguido do ácido mirístico com 21,61% e do ácido oleico com 16,74%. Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por (PASCOAL et al;2020), em que a fonte oleaginosa estudada apresentou perfil de composição semelhante, principalmente em percentuais acima de 80% para a presença de ácidos graxos saturados (CODEX, 2015). O óleo analisado apresenta 2% de ácidos graxos não listados na Tabela 5 que são constituídos de frações minoritárias de vários ácidos graxos com cadeia longa.

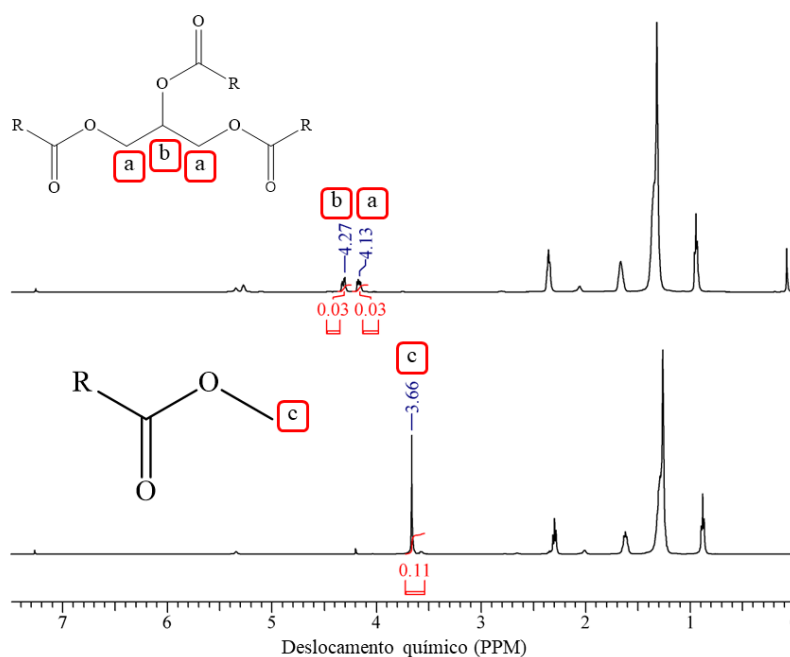
1.5.3. RMN ¹H

A técnica de ressonância magnética nuclear foi utilizada para comparar as diferenças nas estruturas do BMOACC e do OACC, além de propiciar o percentual de conversão dos triglicerídeos do coco catolé em éster metílico, de acordo com a equação 2. Os sinais presentes entre 4,31 e 4,12 ppm para o óleo de coco catolé foram relacionados aos hidrogênios metilênicos da porção do glicerol presente no triglicerídeo, e sua ausência no espectro para o biodiesel indica a total remoção do glicerol no produto final (YAAKOB et al., 2014). Os sinais entre de 5,3 e 5,1 ppm no espectro do OACC foram correlacionados com os hidrogênios olefínicos $-C=C-$ indicando a presença de insaturação na cadeia de ácidos graxos, e a baixa intensidade deste sinal corrobora o perfil de composição de ácidos graxos obtido por cromatografia gasosa além de concordar com estudos realizados com a mesma oleaginosa, haja vista que a composição de ácidos graxos do óleo de catolé era predominantemente saturada (DE OLIVEIRA et al., 2021). O sinal em 3,60 mostra a presença do grupo O-CH₃, indicando que o processo de transesterificação in situ proporcionou a conversão de triglicerídeo em biodiesel metílico, confirmando assim a eficácia da rota escolhida no trabalho.

$$\text{Conversão} = 100 \times \frac{2A_{\text{me}}}{3A_{\text{CH}_2}} \text{ equação 2}$$

Onde Conversão = conversão percentual de triglicerídeos em ésteres metílicos correspondentes, ACH_2 = valor de integração de prótons α -CH₂ carbonil e AMe = valor de integração de prótons metóxila de ésteres metílicos.

Figura 8- RMN ¹H obtida a partir do óleo de coco catolé e do éster metílico do óleo de coco catolé, respectivamente.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

A equação 2 previamente estabelecida na literatura, apresenta importância para a determinação da conversão de biodiesel usando o espectro RMN ¹H (TARIQ et al., 2011). Com base no RMN ¹H (figura 8) e na equação 2, concluímos que a transesterificação *in situ* utilizando catalisador básico obteve um resultado de 100% de conversão dos triglicerídeos em ésteres metílicos para a formação de biodiesel, ratificando a eficácia da rota sintética no que tange a formação do produto, proporcionando alternativa viável química e economicamente para a produção de biodiesel.

Viabilizar a síntese de um produto no contexto atual inclui o emprego de medidas sustentáveis, o descarte do uso de co-solventes derivados de fontes não-renováveis e poluentes representando a adoção de uma prática ecologicamente sustentável na síntese, bem como a redução dos custos de produção. Representa também economia nas etapas de produção, simplificação do processo de purificação e maior alinhamento com a química verde (DOBLE e KRUTHIVENTI, 2007).

1.5.4. Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos, além de fornecerem evidências de que reação de transesterificação transcorreu até o final, funcionam como parâmetros que avaliam a qualidade do biodiesel sintetizado, sobretudo quando compara-se os resultados obtidos (Tabela 6) com as normas estabelecidas pela legislação vigente.

Tabela 6- Parâmetros físico-químicos de BMOACC e OACC.

| Parâmetros | OACC | BMOACC | ANP | ASTM |
|---|----------------|---------------|-----------|-----------|
| Densidade (Kg.cm ⁻³) | 924,4 | 872,3 | 850 a 900 | 850 a 900 |
| Viscosidade dinâmica a 20 °C (mm ² .s ⁻¹) | 66,3503±0,0581 | 4,2748±0,0039 | | |
| Viscosidade cinemática a 40 °C (mm ² .s ⁻¹) | 28,5300±0,0581 | 2,7802±0,0039 | 3,0 a 6,0 | 3,5 a 5,0 |
| Viscosidade cinemática a 100 °C (mm ² .s ⁻¹) | 6,0338±0,0110 | 1,1946±0,0028 | | |
| Índice de viscosidade | 165,6±0,93 | 310,75±9,75 | | |
| Índice de acidez (mg KOH g ⁻¹ oil) | 2,5±0,32 | 0,48±0,02 | | |
| Índice de saponificação mg (KOH g ⁻¹) | 200,68±0,57 | 228,6579±3,12 | | |

Os resultados obtidos dos parâmetros físico-químicos foram comparados com a legislação brasileira, que por sua vez também está alinhada com a legislação internacional. Os resultados da Tabela 6 mostraram que o índice de acidez do biodiesel diminuiu em relação ao do OACC, fenômeno explicado pela neutralização parcial dos ácidos graxos livres (MEIRELES et al., 2021). A redução do índice de acidez é primordial para a manutenção da integridade das peças do motor que sofreriam corrosão em contexto de índice de acidez elevado. Ambos os resultados estão em conformidade com as legislações brasileira e internacional.

A viscosidade cinemática é uma propriedade importante do combustível, pois influencia nos parâmetros de qualidade e velocidade da atomização (SINGH et al., 2022)

apresentando drástica redução a 40 °C. A diminuição da viscosidade está relacionada à formação do éster metílico, que apresenta uma viscosidade menor quando comparada ao triglicerídeo correspondente.

A densidade do combustível é um parâmetro que afeta a relação ar- combustível, pois exerce influência na quantidade de massa do combustível injetada dentro da câmara de combustão. Comparando-se com o ácido graxo que deu origem ao biocombustível, nota-se que ocorreu uma redução na densidade do produto, portanto este parâmetro é um dos indicativos de que a conversão dos triglicerídeos em biodiesel ocorreu por completo. O resultado obtido está dentro da margem estabelecida nas normas do biodiesel (ANP; 2019).

O índice de saponificação é uma medida inversamente proporcional a massa molecular do óleo ou do biodiesel, isso acontece devido aos ácidos graxos de cadeia média ou longa apresentarem menor quantidade de moléculas de glicerídeo por grama de óleo, essas moléculas reagem com 3 mols de KOH utilizados no teste de saponificação (AZUMAH et al., 2012). Podendo-se extrair dessa medida também informações acerca do tamanho da cadeia dos ácidos graxos. Ao comparar os resultados deste estudo com os dados publicados por LUGO-MÉNDEZ et al., (2021), observa-se uma diferença no índice de saponificação, que no estudo anterior foi de 244 mg KOH g⁻¹. Isso reforça que, apesar de ambos os óleos pertecerem à família araceae, pequenas variações na composição podem influenciar as propriedades físico-químicas do biodiesel produzido. Os resultados obtidos suscitaram a necessidade de uma investigação sobre como o biodiesel se comportaria nos ensaios preliminares de estabilidade térmica e oxidativa.

1.5.5. Estabilidade Termo-Oxidativa

1.5.4.1 Análise termogravimétrica

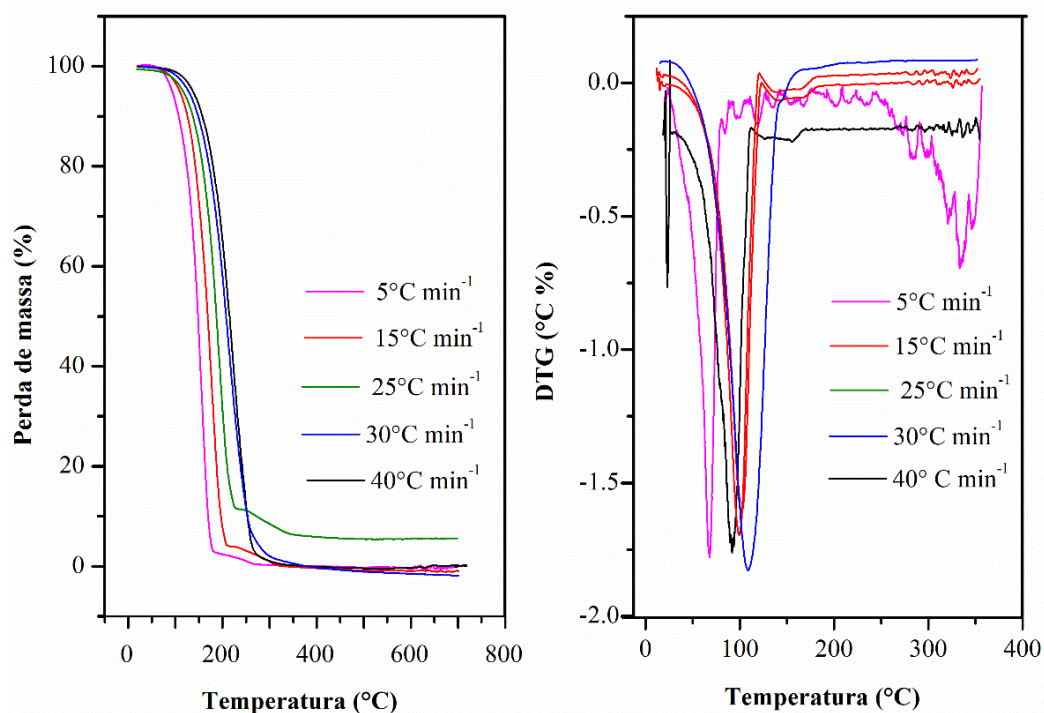
As propriedades térmicas do biodiesel são determinadas em função dos parâmetros de temperatura e perda de massa. Análises termogravimétricas foram realizadas em cinco diferentes taxas de aquecimento e atmosfera oxidativa (ar sintético) com o intuito de aprofundamento acerca do estudo cinético. Ambas as curvas TG e DTG (Figura 9) apresentaram um evento térmico característico para amostras de biodiesel. A partir das curvas termogravimétricas obteve-se os resultados representativos que foram expostos na tabela 7.

Tabela 7- Resultados representativos da curva de degradação térmica BMOACC.

| Taxa de aquecimento (°C. min ⁻¹) | ^a T _{onset} (°C) | ^b T _{burnout} (°C) | ^c T _{pico} (°C) | α (%) |
|---|--------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------|
| 5 | 119,0 | 172,5 | 142,8 | 96,8 |
| 15 | 129,4 | 202,8 | 176,3 | 95,7 |
| 25 | 150,1 | 222,7 | 197,5 | 94,7 |
| 30 | 153,6 | 256,4 | 213,8 | 97,1 |
| 40 | 161,4 | 264,9 | 222,8 | 97,7 |

^aT_{onset} é utilizada para indicar a resistência do biodiesel à degradação térmica, sendo determinada a partir da extrapolação da linha de base horizontal com degradação de 1% do termograma, esta linha possuirá a intercepção com a tangente da porção descendente da curva de massa. ^bT_{burnout} é determinada quando a amostra está completamente queimada e a curva da TGA estabiliza em tendência plana, havendo a intercepção entre a extrapolação na mesma linha e a tangente à porção descendente. ^cT_{pico} é a temperatura do evento térmico.

Figura 9- Curvas TG e DTG do BMOACC em atmosfera oxidativa.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

O evento térmico que resulta na perda de massa do biodiesel está relacionado com a composição da porção de ácidos graxos e suscetibilidade à decomposição. Portanto, a resistência à degradação térmica do ácido graxo está associada as cadeias carbônicas saturadas do ácido graxo, onde a suscetibilidade à degradação dos ácidos graxos aumenta nesta ordem:

saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (VOLLI; PURKAIT, 2014).

Este único evento pode ser correlacionado com a combustão de ésteres metílicos em uma atmosfera oxidativa (MOREIRA et al., 2018), principalmente laurato de metila e miristato, os componentes mais abundantes no BMOACC (KASIM; HARVEY; ZAKARIA, 2010). A faixa de decomposição térmica do biodiesel derivado do óleo de coco catolé foi investigada e constatou-se que este biodiesel apresentou uma faixa de decomposição térmica de 172,5 a 264,9 °C e T_{onset} de 119 a 161,4 °C, levando em consideração as diferentes taxas de aquecimento. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por (JAIN; SHARMA, 2012) em estudos realizados durante o processo de síntese de biodiesel a partir da fonte oleaginosa *Jatropha curcas*.

A temperatura do evento térmico, bem como os dados termogravimétricos dele retirados, são proporcionalmente maiores com o aumento do número de carbono nas moléculas do combustível e também aumentam à medida que a proporção de carbono e hidrogênio em relação ao oxigênio aumenta. Outro fator que justifica a obtenção de temperaturas mais elevadas para os parâmetros do termograma é o perfil de ácidos graxos majoritariamente saturados, por serem menos suscetíveis à degradação térmica devido à ausência de fatores desestabilizadores, como a insaturação. Essa observação na estrutura das cadeias também foi observada em trabalho publicado por (SIA et al., 2020), estudando como o perfil de ácidos graxos impacta na estabilidade termo-oxidativa dos triglicerídeos.

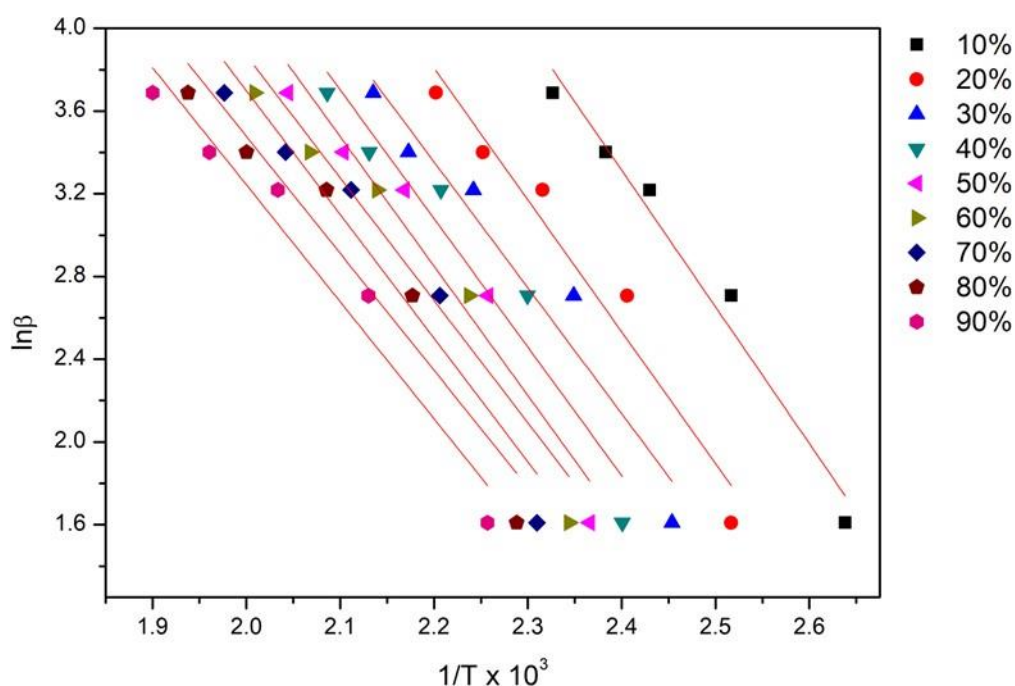
O percentual médio de perda da massa das amostras foi de 96,5%, indicando que a formação de resíduos nas câmaras de combustão é irrisória. As temperaturas de início, queima e pico para cada taxa de aquecimento empregada na análise termogravimétrica e o percentual de perda de massa (α) para o único evento de degradação térmica observado nas curvas TG foram listados na Tabela 7.

Os dados termogravimétricos foram utilizados para determinar a energia de ativação para a combustão do BMOACC. A energia de ativação (E_a) é um parâmetro cinético importante, pois está correlacionada com o período de retardo da ignição do combustível na câmara de combustão (FERREIRA et al., 2019), (FOCKE et al., 2012). Para o estudo cinético, foi escolhida a equação proposta por Flynn-Wall-Osawa (LAKSHMINARAYANAN; AGHAV, 2010), (MOREIRA et al., 2018) haja vista que este método não requer o conhecimento do modelo cinético específico que descreve a reação (*model free*). Portanto, a energia de ativação segundo o modelo adotado é obtida através da regressão linear que relaciona a

respectiva temperatura da conversão considerada em estudo e o logaritmo neperiano da taxa de aquecimento aplicada na análise.

Outro aspecto importante que deve ser considerado é a larga aplicação do método Flynn-Wall-Osawa no estudo cinético de diversos tipos de combustíveis, inclusive o biodiesel (OZAWA, 1965), (KOK, 2012). O resultado médio da energia de ativação estimada para BMOACC foi de $48,12 \text{ KJ.mol}^{-1}$ e este valor foi semelhante aos encontrados para outros estudos com biodiesel (FERREIRA et al., 2019) incluindo biocombustíveis não saturados como BMOACC (RAJAMOHAN et al., 2022). A regressão linear entre a temperatura recíproca e o logaritmo neperiano da taxa de aquecimento obtida com os dados termogravimétricos do BMOACC foi apresentada na figura 10 e os valores da energia de ativação e correlação linear (R^2) para cada conversão considerada no estudo foram descritos na Tabela 8.

Figura 10- Regressão linear usando o método Flynn-Wall-Osawa a partir da análise de dados termogravimétricos de BMOACC em atmosfera oxidativa.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 8- Energia de ativação (E_a) e correlação linear (R) obtida pelo método Flynn-Wall-Ozawa para BMOACC em atmosfera oxidativa.

| Conversão (%) | Energia de Ativação E_a (KJ.mol^{-1}) | r^2 – Coeficiente linear |
|---------------|--|----------------------------|
| 10 | 52,26 | 0,9662 |
| 20 | 50,40 | 0,9419 |

| | | |
|----|-------|--------|
| 30 | 48,10 | 0,9303 |
| 40 | 49,17 | 0,9171 |
| 50 | 49,52 | 0,9308 |
| 60 | 46,82 | 0,9195 |
| 70 | 47,31 | 0,9125 |
| 80 | 44,72 | 0,9072 |
| 90 | 44,74 | 0,9409 |

Comparando-se com estudos realizados com o diesel de origem fóssil comercializado, nota-se similaridade nos resultados de energia de ativação encontrados no presente estudo, com os resultados obtidos por (ROCÍO MORALES LEIVA; MANOEL CRNKOVIC ANTONIO MOREIRA DOS SANTOS, 2006), que ao analisar três amostras de diesel comercial verificou que os resultados de E_a apresentaram-se entre 44,1 e 63,0 KJ.

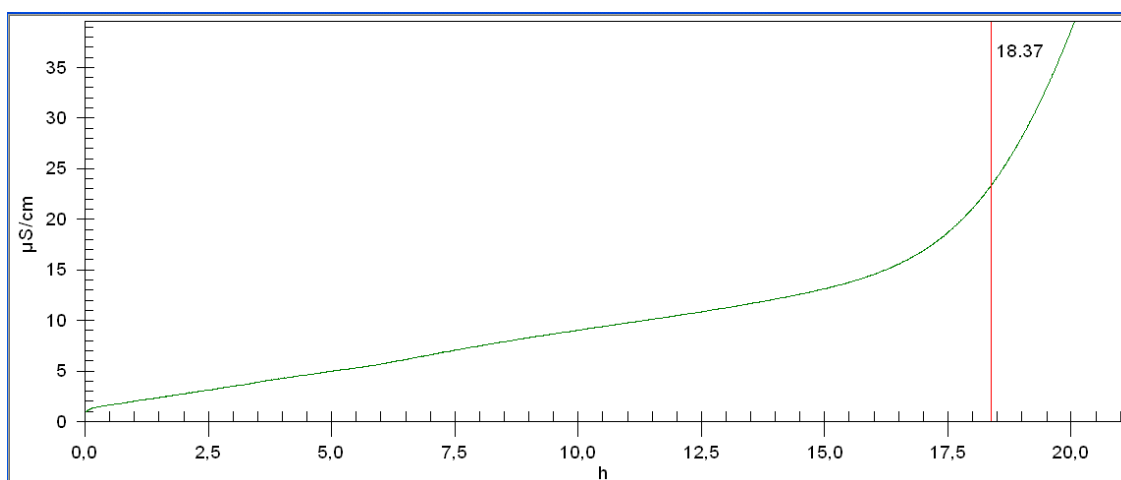
O método de Flynn-Wall-Osawa é classificado como isoconversional, pois a progressão da conversão ocorre através da redução de massa com taxa de aquecimento constante, portanto as reduções de E_a , são proporcionais a evolução da conversão haja vista que a massa de biodiesel se apresenta em constante redução (POPESCU, 1996).

1.5.5.2. Estabilidade oxidativa

O gráfico mostrado na Figura 11 representa a curva de condutividade elétrica relacionando a mudança na condutividade com o tempo. Demonstra-se o período de indução em horas, traçando-se uma reta paralela ao eixo referente à condutividade representada em vermelho.

A estabilidade oxidativa do biodiesel foi avaliada durante o período de indução, relacionando-se o processo de resistência à oxidação do biodiesel ao seu processamento e principalmente à composição química do produto, majoritariamente formado por ácidos graxos saturados, que são menos susceptíveis à degradação por oxidação devido à menor presença de ligações duplas que são quimicamente mais instáveis diante da oxidação (HAO et al., 2018).

Figura 11- Gráfico do teste Rancimat acelerado obtido da amostra BMOACC.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

O resultado obtido no teste conforme a Figura 11 foi de 18,37 horas, mostrando que o biodiesel sintetizado pela rota adotada pode ser considerado promissor para aplicação como combustível, visto que além da redução de custos em sua produção, por ser uma espécie com estabilidade oxidativa superior a 12 horas exigida por lei (MOREIRA et al., 2018), não requer adição de antioxidantes, o que torna o custo de produção ainda mais baixo.

As reações de oxidação no biodiesel são responsáveis pela formação de hidroperóxidos com grandes quantidades de ácidos, que podem promover corrosão no sistema do motor, levando à baixa eficiência e desempenho do motor (SIA et al., 2020). O resultado de estabilidade oxidativa obtido neste estudo é expressivo, pois dependendo da extensão da degradação oxidativa do biodiesel, podem ser produzidos polímeros insolúveis de alto peso molecular, que apresentam efeito deletério durante a utilização do combustível, pois promovem a formação de sedimentos insolúveis, substâncias capazes de bloquear linhas de combustível e filtros de motores, resultando em combustão incompleta e coqueificação de injetores (YAAKOB et al., 2014). Portanto mitigar os efeitos da oxidação do biodiesel dispensando a utilização de aditivo antioxidante, torna o material sintetizado promissor para aplicação.

A rota de síntese utilizada por transesterificação *in situ* bem como o planejamento experimental, proporcionaram a otimização dos parâmetros de síntese, além de contribuir para a produção do material que atende a legislação vigente no que tange aos parâmetros físico-químicos e com resultados promissores de estabilidade termo-oxidativa.

1.6. Conclusões

A partir do estudo de otimização envolvendo o planejamento experimental utilizando método proposto por Taguchi, aplicado à transesterificação *in situ* de coco catolé, estabeleceu-se que a reação com 2% de catalisador, 60 °C e relação metanol/OACC de 5:1 constitui-se como a condição experimental que propiciou o melhor resultado de rendimento em massa, que foi de 66,17%. No estudo envolvendo o planejamento experimental, verificou-se que os três parâmetros avaliados apresentaram valor-p estatisticamente significativo sendo a taxa de catalisador o fator que mais impactou no aumento do rendimento em massa da síntese.

A presente pesquisa conclui que o aprimoramento da rota de reação de transesterificação *in situ* adotada para a síntese do biodiesel foi bem-sucedida, pois conseguiu sintetizar o biodiesel com 100% de conversão, ou seja, não há vestígio de triglicerídeos remanescentes no produto final. Além disso, o produto sintetizado atende a todos os parâmetros físico-químicos exigidos pela legislação. O biodiesel apresentou faixa de decomposição térmica de 162 a 258 °C e T_{onset} de 133 a 162 °C, considerando as taxas de aquecimento avaliadas, além de apresentar energia de ativação de combustão de biodiesel de 48,12 KJ.mol⁻¹. Também apresentou resultado de estabilidade oxidativa superior a 18 horas, acima do exigido pela legislação e, portanto, eliminando a necessidade do uso de antioxidantes, gerando economia no processo produtivo.

Atualmente, existem vários fatores que dificultam o desenvolvimento da produção biodiesel em larga escala, que incluem o preço das matérias-primas, os custos de produção e o menor preço dos combustíveis fósseis. Entre estes fatores, uma das barreiras mais importantes é o elevado custo de produção em comparação com os combustíveis petrolíferos, principalmente devido ao custo de matérias-primas e reagentes químicos, como óleos vegetais, catalisadores e álcool.

Na perspectiva de mitigar os efeitos do uso de combustíveis fósseis, atender a uma crescente demanda por fontes de energia, fornecer um combustível renovável com custos de produção reduzidos e baixa complexidade na realização da síntese, este estudo mostrou que a síntese de biodiesel oriunda do coco catolé está apta para contemplar as soluções para essas demandas.

A partir da pesquisa realizada, publicou-se os resultados obtidos na revista *Industrial Crops and Products*. Devido a relevância dos resultados publicados nesse estudo, em 2024 o artigo publicado, foi laureado com a comenda prof^o Ícaro de Sousa Moreira concedida pelo programa de pós graduação em química.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



In situ transesterification of the catolé coconut (*Syagrus Cearensis*) utilizing experimental design by Taguchi method

Stéfano Arrais Pereira^a, Sarah Brenda Ferreira dos Santos^a, Tathilene Bezerra Mota Gomes Arruda^a, Elano Nery Ferreira^a, Pedro Oríbio Bastos Chaves^a, Diego Lomonaco Vasconcelos de Oliveira^b, Joyce Ellen de Almeida Sousa^b, Francisco Eduardo Arruda Rodrigues^c, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo^{a,*}

^a Laboratory of Polymers and Materials Innovation, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Sciences Center, Federal University of Ceará, Campus of Pici, CEP 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Five St., Fortaleza 60355-636, CE, Brazil

^c Federal Institute of Ceará, Campus Caucaia, CEP 61609-090 Caucaia, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

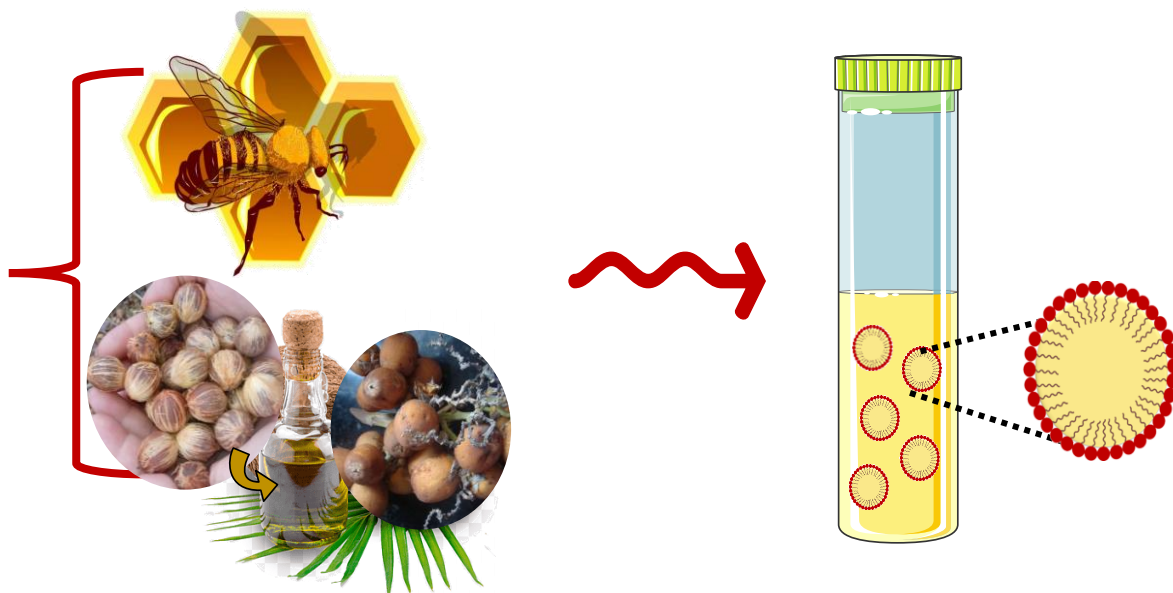
Biodiesel
Experimental design
Taguchi method
Catolé coconut

ABSTRACT

This work proposes the optimization of biodiesel synthesis utilizing *in situ* transesterification, through experimental design by the Taguchi method. In this process, nine experiments were carried out and the influence of reaction parameters as catalyst mass, proportion of methanol in relation to oil content and temperature were statistically evaluated. The mass yield was analyzed as a response. The optimized condition was obtained

CAPÍTULO II

SÍNTESE DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DO ÓLEO DE COCO CATOLÉ E CERA DE ABELHA



2.1. Introdução

As infecções fúngicas cutâneas são amplamente prevalentes em todo o mundo, afetando aproximadamente 25% da população global (CORZO-LEÓN; MUNRO; MACCALLUM, 2019). As regiões mais suscetíveis a essas manifestações superficiais são os tecidos queratinizados, que englobam a pele, as unhas e os cabelos (KOVITWANICHKANONT; CHONG, 2019).

No contexto das infecções fúngicas, a candidíase possui maior incidência, sendo investigada através de várias espécies de *Candida*, incluindo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. A proliferação desses microorganismos ocorre em tecidos úmidos e quentes do corpo tais como: dobras cutâneas no caso de indivíduos obesos, áreas entre os dedos das mãos e dos pés, genito crural e áreas perineais (NENE et al., 2021).

Atualmente, várias estratégias de tratamento estão disponíveis para a administração de medicamentos antifúngicos por meio de formulações orais e tópicas, contudo o emprego indiscriminado destas plataformas de tratamento, resultaram na formação de cepas mais resistentes ao protocolo convencional. Nesse contexto a síntese de nanocarreadores lipídicos que propiciam a liberação controlada de drogas antifúngicas, se constituem em estratégias promissoras e vantajosas quando confrontadas com a terapia convencional (ZEB et al., 2019).

Os nanocarreadores de base lipídica são compostos de lipídeos biodegradáveis e biocompatíveis, possuindo semelhanças estruturais com os lipídeos da pele. Eles alteram as características de solubilidade e permeabilidade, melhoram a biodisponibilidade, controlam a liberação de fármacos, protegem os bioativos de enzimas metabolizadoras, promovem o transporte dos bioativos através de várias barreiras biológicas, prolongam o período na faixa terapêutica, aumentam a estabilidade físico-química e biológica de fármacos, melhoram a internalização celular (SALA et al., 2018).

A nanoformulação tem o benefício de superar uma série de limitações associadas à farmacocinética, biodisponibilidade de medicamentos e seus efeitos adversos. Os sistemas em escala nanométrica representam um método de encapsulação dos medicamentos para torná-los adequados as mais variadas formas de administração (JAIN et al., 2016). Dentre os sistemas em escala nanométrica empregados, destaca-se a utilização dos carreadores lipídicos nanoestruturados, que possuem como característica aumentar a eficiência de encapsulamento e

prolongar o tempo de encapsulação do bioativo durante o período de estocagem (COLA et al., 2016).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são sistemas que contêm lipídeos sólidos e lipídeos líquidos quimicamente diferentes à temperatura ambiente (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Esses sistemas foram desenvolvidos para superar limitações como liberação de bioativos por ruptura do núcleo e baixa capacidade de carreamento de outras nanopartículas lipídicas (ZHANG et al., 2022).

Contudo para o emprego das CLNs em sistemas biológicos, necessita-se de estudar a interação com sistemas biológicos de forma que se proporcione investigar toxicidade e avaliar riscos biológicos frente aos novos agentes terapêuticos, considerar a suscetibilidade de agentes terapêuticos nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. (LIN et al., 2003) (LEMMENS et al., 2024).

Sistemas biológicos tais como o *Zebrafish* adulto são fundamentais como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, neurobiológicos e toxicológicos (RESENDE e SOCCOL, 2015), pois apresenta baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto (DAI et al., 2014). Quando os peixes apresentam menores tamanhos na fase adulta, requerem diminuição da concentração das substâncias a serem testadas e dosadas, bem como as quantidades de reagentes e materiais utilizados no tratamento e manutenção dos animais (HILL, 2005). A presença de órgãos e vias metabólicas do *Zebrafish* análogas as dos humanos permite avaliações toxicológicas e de biocompatibilidade (HORZMANN e FREEMAN, 2018) e, no campo da nanomedicina, este modelo está sendo proposto para avaliar a biocompatibilidade, toxicidade e eficácia terapêutica de vários nanomateriais (LEE et al., 2017; SIEBER et al., 2019; PENSADO-LÓPEZ et al., 2021).

Avaliando a problemática do aumento da resistência das cepas fúngicas frente aos protocolos de tratamento comumente empregados, notadamente as infecções provocadas por microorganismos do gênero *candida*, o presente estudo propôs a síntese de carreadores lipídicos incorporando o bioativo isoquercitrina, avaliando suas propriedades de estabilidade, de eficiência da encapsulação, toxicidade e avaliou-se as propriedades antifúngicas frente as cepas do gênero *candida* spp.

2.2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2.1. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas se consolidaram como um problema clínico importante, sobretudo quando atreladas a resistência perante os medicamentos tradicionalmente empregados no tratamento destas patologias (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Dentre os principais fungos patogênicos de importância médica, destacam-se as leveduras do gênero *Candida*, devido a elevada incidência de infecções provocadas por estes fungos. (BERMAN; KRYSAN, 2020).

A Organização Mundial da Saúde publicou em 2022 uma lista de patógenos fúngicos prioritários, classificando *C. albicans* no grupo crítico, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram classificados no grupo de patógenos de alta prioridade, ressaltando a necessidade de estudos direcionados para o tratamento de infecções causadas pelos agentes patógenos citados (FERREIRA et al., 2024)

Atualmente para o tratamento de infecções fúngicas três classes primárias de agentes são largamente empregadas: polienos (por exemplo, anfotericina B), azóis (por exemplo, fluconazol) e equinocandinas (por exemplo, caspofungina) (KRYSAN, 2017). Todavia o recente aumento na quantidade de fungos resistentes a mais de uma classe de bioativos antifúngicos consolidou-se como um desafio, suscitando a necessidade de alternativas para o tratamento atualmente utilizado.

A obtenção de compostos antifúngicos a partir de produtos naturais tem sido explorada ao longo dos anos. Esses produtos podem conter compostos bioativos com atividade antimicrobiana, representando uma alternativa promissora contra espécies antifúngicas resistentes (SOULAIMANI et al., 2021).

2.2.2. Carreador lipídico nanoestruturado (CLN)

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), são estruturas obtidas em dispersões coloidais que apresentam tamanhos de partícula em escala nanométrica (1-1000 nm) (DE SOUZA et al., 2024). Os CLNs consistem em uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos na proporção que pode variar de 70/30 a 99,9/0,1. Ao misturar lipídeos sólidos e líquidos em proporções diferentes, pode-se obter mais espaço para encapsulação do componente ativo, formando uma matriz lipídica desordenada. Portanto, os CLNs apresentam inúmeras

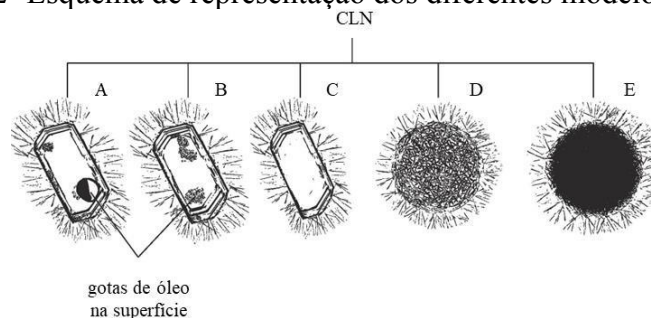
vantagens, como alta porcentagem de eficiência de encapsulamento (%EE), elevada estabilidade de armazenamento, biocompatibilidade aprimorada e biodisponibilidade melhorada em comparação com outros sistemas de nanocarreadores (PATIL et al., 2018).

Os carreadores nanoestruturados apresentam em sua composição uma matriz lipídica estabilizada com surfactante, podendo atuar como intensificadores de permeação, resultando em incremento na taxa de permeação do medicamento (BHOSALE et al., 2024). Essa matriz apresenta uma camada externa, que define as características da superfície, e uma camada interna ou núcleo, que determina as características tais como: forma, tamanho e compartimento onde está localizado o bioativo (BUNJES, 2011).

A matriz lipídica composta por lipídeos sólidos e líquidos pode apresentar um comportamento cristalino complexo, influenciado sobretudo por sua composição. O processo de cristalização começa após o resfriamento da síntese, podendo continuar durante o armazenamento dos nanossistemas, impactando inclusive nas características dos nanocarreadores, tais como: morfologia das partículas, a incorporação do bioativo e a estabilidade deste tipo de nanocarreador (RIBEIRO et al., 2015).

O processo de formação da matriz lipídica atrelada às diferentes proporções de adição dos lipídeos líquidos nos lipídeos sólidos, resultam na formação de diferentes modelos morfológicos de CLN, representados na Figura 12.

Figura 12- Esquema de representação dos diferentes modelos de CLN.



Fonte: (adaptado de GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018)

O modelo de matriz A, demonstra um formato de estruturação da partícula através da formação de múltiplas gotas de óleo fundidas, em uma gota de óleo aderente próxima à borda de uma partícula do cristal de plaquetas. O modelo B, contempla a formação de múltiplas gotículas de óleo na superfície, resultantes da separação de fases dentro do cristal das plaquetas principais, a representação C, contém estrutura homogênea devido à adição de uma pequena

quantidade de óleo em uma matriz cristalina de plaquetas com lipídeos sólidos. A estrutura D, apresenta a formação dos nanocompartimentos de óleo dentro de uma matriz sólida esférica e a representação E, possui forma esférica uniformemente dispersa (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018).

2.2.3. Cera de abelha

A cera de abelha é um produto que possui composição química rica em ésteres de ácidos graxos saturados e álcoois de cadeia longa, sobretudo: hidrocarbonetos, monoésteres, diésteres, triésteres, ácido mirístico livre e quantidades variáveis de hidroxiácidos e dióis, que conferem a cera característica sólida à temperatura ambiente, ponto de fusão igual a 65 °C, insolubilidade em água e aspecto de aparência amarelada. A natureza hidrofóbica da cera é devida aos carbonos metílenos [int-(CH₂)] da cadeia interna, que compreendem mais de 95% dos carbonos presentes e aos carbonos das extremidades CH₃ que compreendem o restante da extensão da cadeia carbônica (HOSSEINI; MOUSAVI; MCCLEMENTS, 2023).

A obtenção da cera tem sido realizada através dos favos de mel das abelhas do gênero (*Apis mellifera*) (ROSIAUX et al., 2014). Considerando sua alta disponibilidade e custo industrial relativamente baixo, novas formas de aplicação da cera de abelha tornam-se de grande interesse (SOUZA; DEFREITAS; MAIA CAMPOS, 2017). A cera de abelha tem sido largamente utilizada na indústria como espessante e umectante na fabricação de pomadas, cremes, batons.

A cera de abelha é um produto natural utilizado na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. O caráter altamente cristalino afeta negativamente a capacidade de retenção do bioativo, suscitando a necessidade da formação de blends com lipídeos em fase líquida que possam quebrar esse perfil cristalino, propiciando uma melhora na eficiência de encapsulação do sistema (ATTAMA; MÜLLER-GOYMANN, 2008).

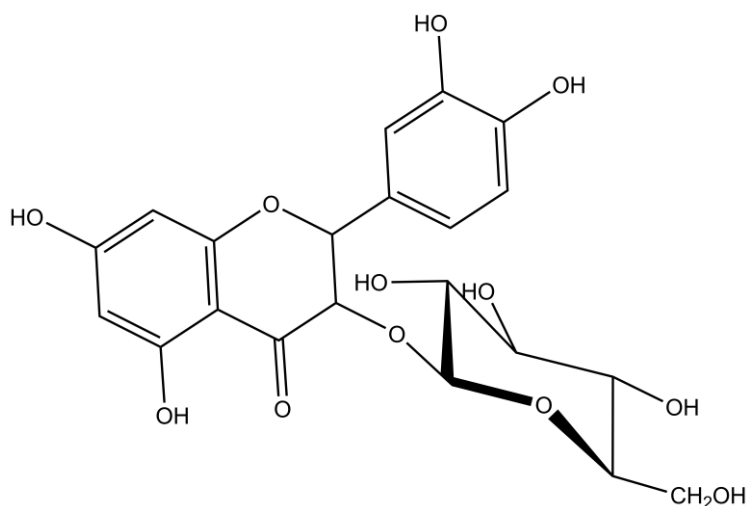
Além da característica que a cera de abelha possui em compor a síntese de nanocarreadores lipídicos, estudos acerca da substância apresentaram diversos resultados sobre as propriedades terapêuticas SOLEIMANIAN et al., (2018), CORDEIRO et al., (2024) como por exemplo, atividades cicatrizantes, antiestresse, antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana (FRATINI et al., 2016).

2.2.4. Isoquercitrina

A isoquercitrina ou quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo (Figura 13), é uma das

principais formas glicosídicas da espécie flavonóide quercetina, sendo encontrada em diversos tipos de fontes vegetal, cereal e frutífera, além de apresentar ocorrência em alimentos derivados dos mesmos como chás e vinhos (HASUMURA et al., 2004).

Figura 13- Estrutura da Isoquercitrina.



Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Dentre as propriedades físico-químicas da isoquercitrina, destaca-se o incremento na solubilidade que a mesma possui devido ao processo de glicosilação da mesma, possuindo solubilidade igual a $206 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (MAKINO et al., 2009), o ($\log P$) do bioativo descrito tem magnitude determinada entre 0.76 e 0.77. As propriedades espectrais do composto, denotam que as bandas de absorção no espectro de UV-Vis estão localizadas do início do espectro até 400 nm, em termos de coloração a isoquercitrina apresenta cor amarela.

As propriedades biológicas listadas da isoquercitrina, são baseadas em sua ação de combater radicais livres, espécies reativas de oxigênio (EROs) e redução dos níveis de prostaglandina. Baseado em estudos dos mecanismos de ação do bioativo, sua utilização em testes *in vivo*, estão direcionadas para pesquisas que avaliem: biodisponibilidade, metabolismo, segurança e posteriormente os ensaios são focados nos potenciais atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, cardioprotetoras, antidiabéticas, antialérgicas e neurofarmacológicas (VALENTOVÁ et al., 2014).

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo geral

Produzir carreadores lipídicos nanoestruturados a partir da cera de abelha e do óleo de coco catolé com potencial antifúngico.

2.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar carreadores lipídicos nanoestruturados;
- Otimizar os parâmetros da síntese, utilizando o método Taguchi;
- Analisar os parâmetros de estabilidade dos nanocarreadores;
- Analisar a morfologia das nanopartículas sintetizadas;
- Avaliar o comportamento térmico das amostras sintetizadas;
- Incorporar a isoquercitrina aos nanossistemas e determinar a eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento dos nanocarreadores;
- Investigar a toxicidade não clínica dos nanocarreadores;
- Investigar a atividade locomotora do *Zebrafish* quando submetido aos sistemas sintetizados;
- Avaliar o potencial antifúngico do bioativo e dos nanocarreadores sintetizados frente as cepas *candida* spp.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Com o objetivo de realizar a síntese otimizada de carreadores lipídicos nanoestruturados e avaliar o nanossistema na condição ótima, utilizou-se dos seguintes reagentes: OACC (óleo da amêndoa de coco catolé), cera de abelha (CA), brij 78[®] (estearil éter de polioxietileno), isoquercitrina, o ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA).

2.4. Metodologia

2.4.2.1. Síntese dos carreadores lipídicos nanoestruturados

As CLNs foram sintetizadas através da técnica de homogeneização por fusão a quente. Para este estudo, um lipídeo de matriz sólida (cera de abelha) (CA) e outro de matriz líquida (OACC) foram escolhidos juntamente com o surfactante (estearil éter de polioxietileno) Brij 78[®] e 15 g de água.

Logo após a escolha, todos os reagentes foram cuidadosamente pesados conforme as condições fornecidas no planejamento experimental contidas nas (Tabelas 9 e Tabela 10), e aquecidos até 65 °C, temperatura correspondente ao ponto de fusão da cera. Posteriormente, 10 mg de Isoquercitrina foram adicionados e dissolvidos completamente. A homogeneização do sistema foi realizada usando sonifier (Branson) utilizando 70% de amplitude com regime de pulso de 10 s *on*/10 s *off* durante 3 min. À temperatura ambiente, a dispersão final foi resfriada para solidificar nanopartículas formando CLNs.

Tabela 9 - Codificação dos fatores e seus níveis.

| Nível | Teor de Brij 78 [®] (mg) | Teor de OACC(mg) | Teor de CA(mg) |
|-------|-----------------------------------|------------------|----------------|
| 1 | 100 | 200 | 100 |
| 2 | 200 | 300 | 300 |
| 3 | 300 | 400 | 500 |

Tabela 10 – Design experimental por Taguchi para formulação de CLNs contendo óleo de coco catolé (L9 3x3).

| Experimento | Teor de brij 78[®] | Teor de OACC | Teor de CA |
|--------------------|------------------------------------|---------------------|-------------------|
| | (mg) | (mg) | (mg) |
| 1 | 100 | 200 | 100 |
| 2 | 100 | 300 | 300 |
| 3 | 100 | 400 | 500 |
| 4 | 200 | 200 | 300 |
| 5 | 200 | 300 | 500 |
| 6 | 200 | 400 | 100 |
| 7 | 300 | 200 | 500 |
| 8 | 300 | 300 | 100 |
| 9 | 300 | 400 | 300 |

Partindo-se do planejamento experimental desenvolvido, sintetizou-se nove carreadores para se avaliar a influência das massas de surfactante, cera de abelha e óleo de coco catolé na obtenção de menores resultados de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e resultados maiores de potencial zeta.

2.4.2.2. *Tamanho de partícula e índice de polidispersividade*

As análises foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern[®]). As amostras foram diluídas em água deionizada na proporção (1:1000) (CLN:H₂O) (v/v) e analisadas a um ângulo fixo de 90° à 25 °C. O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersividade dos nanocarreadores foram expressos através de uma média formada por cinco repetições. As medidas foram realizadas nos intervalos de 1, 8, 15 e 30 d após a síntese dos nanocarreadores, com os resultados dispostos na Tabela 11 .

2.4.2.3. *Potencial Zeta*

A carga de superfície das amostras foi avaliada através da determinação de potencial zeta utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern[®]). As análises foram realizadas diluindo os carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos na síntese em água deionizada na proporção (1:1000) (CLN:H₂O) (v/v) e os resultados foram expressos como médias de cinco determinações. As medidas foram realizadas nos intervalos de 1, 8, 15 e 30

dias após a síntese dos nanocarreadores, com os resultados dispostos na Tabela 11.

Tabela 11- Resultados de Tamanho de partícula, Índice de polidispersividade e Potencial zeta das nove formulações dos dias 1 ao 30.

| Tamanho de Partícula (nm) | | | | |
|-------------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Amostra | Dia 1 | Dia 8 | Dia 15 | Dia 30 |
| F1 | 258,9 | 276,5 | 253,9 | 264,2 |
| F2 | 440,4 | 532,4 | 663,6 | 872,6 |
| F3 | 976,5 | ----- | ----- | 1189 |
| F4 | 312,5 | 321 | 306,5 | 420,4 |
| F5 | 653,1 | ----- | ----- | 1375 |
| F6 | 306,9 | 337,6 | 431,9 | 449,3 |
| F7 | 381,2 | 392,2 | 601,2 | 376,7 |
| F8 | 236,8 | 249,5 | 254,8 | 230,7 |
| F9 | 308,3 | 335,4 | 371,7 | 304,2 |
| Índice de polidispersividade | | | | |
| F1 | 0,213 | 0,247 | 0,211 | 0,220 |
| F2 | 0,314 | 0,247 | 0,281 | 0,322 |
| F3 | 0,315 | ----- | ----- | 0,303 |
| F4 | 0,279 | 0,267 | 0,255 | 0,246 |
| F5 | 0,485 | ----- | ----- | 0,279 |
| F6 | 0,252 | 0,227 | 0,242 | 0,223 |
| F7 | 0,383 | 0,211 | 0,360 | 0,292 |
| F8 | 0,275 | 0,259 | 0,287 | 0,231 |
| F9 | 0,259 | 0,169 | 0,309 | 0,223 |
| Potencial Zeta (mV) | | | | |
| F1 | -33,6 | -34,3 | -30,6 | -28,3 |
| F2 | -35,5 | ----- | -32,8 | -29,4 |
| F3 | -32,1 | -31,5 | -32,5 | -30,3 |
| F4 | -32,8 | -31,5 | -32,5 | -24 |
| F5 | -34,9 | -33,2 | -33,7 | -30,9 |
| F6 | -34,7 | -31,1 | -33,7 | -29,9 |
| F7 | -32,6 | -32,2 | -32,2 | -32,7 |
| F8 | -35,7 | -32,0 | -29,1 | -29,1 |

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| F9 | -39,5 | -29,7 | -32,2 | -27,9 |
|----|-------|-------|-------|-------|

2.4.2.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR das CLN_B (carreador lipídico nanoestruturado sem bioativo), CLN_ISQC (carreador lipídico nanoestruturado com isoquercitrina), isoquercitrina, cera de abelha e OACC foram obtidos por um espectrômetro 620-IR (Varian, Inc., EUA) no modo de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de seleneto. A varredura foi realizada na faixa de 4.000 a 500 cm^{-1} (DE SOUSA ET AL., 2025).

2.4.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizada na EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária), foi empregada para analisar a morfologia de CLN_B e CLN_ISQC seguindo a metodologia de (LV et al., 2016), com adaptações. Os nanocarreadores sintetizados foram previamente diluídos em água duplamente destilada na seguinte proporção de nanocarreador/ água (1/200). Após a diluição, essa solução foi depositada nos suportes de cobre utilizados na análise, para posterior secagem no ambiente.

2.4.2.6. Calorimetria exploratória diferencial

A análise térmica foi realizada por meio de um calorímetro diferencial de varredura (Q20-V 24.9 Build 121) em atmosfera de nitrogênio (50 mL. min^{-1}). A massa das amostras foram pesadas, obtendo-se 2,6 mg de cada amostra. Os carreadores lipídicos nanoestruturados liofilizados foram aquecidos a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com faixa de temperatura de 25 a 400 $^{\circ}\text{C}$ (DE MENEZES et al., 2025).

2.4.2.7. Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

O método de eficiência de encapsulamento adotado foi estabelecido por (EL-MENSHAWE et al., 2020) com algumas modificações. A curva de calibração padrão da isoquercitrina foi obtida medindo-se a absorbância da solução de isoquercitrina na faixa de concentração preparada a partir de soluções estoque em metanol a 207 nm em triplicata. A curva de calibração foi então plotada com absorbância no eixo y e concentração de isoquercitrina no eixo x ($r^2 = 0,9998$). Para remover a dispersão de CLNs de isoquercitrina livre, foram misturadas com acetato de etila (1:1, v/v) e depois submetidas ao vórtex por alguns segundos. A mistura foi centrifugada (5738 rpm por 10 min, 25 $^{\circ}\text{C}$) e o sobrenadante, que incluía isoquercitrina livre, foi removido. A dispersão de CLNs de isoquercitrina restante foi misturada com metanol e a parte central da dispersão de CLNs de isoquercitrina foi filtrada usando um filtro de seringa

(0,45 μm) e, em seguida, determinou-se a absorvância por espectrofotômetro UV-Vis com $\lambda_{\text{max}} = 207 \text{ nm}$. A eficiência de encapsulamento e a capacidade de carregamento da isoquercitrina foram calculadas da seguinte forma:

$$\%EE = \frac{[ISQC \text{ sobrenadante}]}{[ISQC \text{ inicial}]} \times 100\%$$

$$\%CC = \frac{[ISQC \text{ encapsulado}]}{[\text{massa da formulação}]} \times 100\%$$

Onde [ISQC sobrenadante], significa concentração de isoquercitrina não encapsulada, [ISQC inicial] corresponde a massa de isoquercitrina inserida na síntese dividida pelo volume da síntese, [ISQC encapsulado] significa concentração de bioativo presente dentro da matriz lipídica.

2.4.2.8. Avaliação da segurança não clínica

2.4.2.8.1. Zebrafish

Os ensaios foram realizados no Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), através da utilização do *Zebrafish* (*Danio rerio*) em fase adulta (ZFa), selvagens, de ambos os sexos e com idade entre 60-90 d, possuindo tamanhos de $3,5 \pm 0,5 \text{ cm}$ e com peso de $0,4 \pm 0,1 \text{ g}$, obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, fornecedor local. Os grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (Spirulina®) até 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a ausência de movimentos operculares (CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 04009489/2023.

2.4.2.8.2. Protocolo geral

Os testes com zebrafish foram realizados baseando-se em metodologias propostas por (MAGALHÃES et al., 2017). No período dos experimentos, os peixes foram aleatoriamente selecionados, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras de testes ou controle, via oral (COLLYMORE; RASMUSSEN; TOLWANI, 2013). Posteriormente, os animais foram acondicionados individualmente em recipientes de vidro com capacidade de (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos através da via oral, foram utilizadas pipetas automáticas variáveis de 20 μL com ponteiros estéreis. O

comportamento dos animais no teste de campo aberto foi registrado por analisadores calibrados e cegos (MAGALHÃES et al., 2017).

2.4.2.8.3. Toxicidade aguda 96 h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente aos Zebrafish (*D. rerio*) adultos, conforme metodologias propostas pela (OECD, 2019) e (SILVA et al., 2023). Os animais (n=6/gupo) foram tratados com 20 μ L, via oral (v.o.), de ISQC ou CLN_B ou CLN-ISQC (0,00006 ou 0,0006 ou 0,006 ou 0,06 ou 0,6 mg/mL). Um grupo de animais (n=6/gupo) foi tratado com 20 μ L (v.o.) de uma solução de DMSO 3% (Controle ou Veículo). Após 96 h do início dos tratamentos, foram anotados os números de animais mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL_{50}) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR et al., 2015).

2.4.2.8.4. Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Foi realizado o teste de campo aberto (MAGALHÃES et al., 2017), para avaliar possíveis alterações na coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. No experimento 1, os animais (n=6/grupo) foram tratados com 20 μ L (v.o.) de ISQC ou CLN_B ou CLN_ISQC (0,00006 ou 0,006 ou 0,6 mg/mL). Um grupo de animais (n=6/grupo) foram tratados com 20 μ L (v.o.) de DMSO 3% (Controle ou Veículo) ou diazepam (DZP; Controle sedativo; 10 mg/mL) (CHEN et al., 2021). Um grupo de animais (n=6/grupo) sem tratamento (Naive) foram adicionados ao ensaio. Decorrido o período de uma hora dos tratamentos via oral, os animais foram individualmente adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm) com a mesma água advinda do aquário. As placas foram devidamente marcadas com quatro quadrantes para a análise da atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL) durante o intervalo de tempo entre 0-5 minutos.

Análise estatística

Os resultados do Teste de Campo Aberto foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 8.4.3. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

2.4.2.9. Ensaio Antifúngico

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado no (LABIMAN) Laboratório de Bioprospecção de moléculas antimicrobianas através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH $7,0 \pm 0,1$) tamponado com 0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA).

Para a realização dos testes, foram consideradas as concentrações de cada componente na emulsão. Experimentalmente determinou-se que a concentração de óleo de amêndoa do coco catolé (OACC) presente nas emulsões era de 21,04 mg/mL e de isoquercitrina (ISQC) era equivalente a 616,2 $\mu\text{g/mL}$. O OACC foi testado na faixa 21,04- 0,041 mg/mL e a ISQC foi testada na faixa de 616,2 - 1,20 $\mu\text{g/mL}$. As emulsões foram testadas na faixa de 10 - 0,02 % frente as cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida auris* 01256 P CDC e *Candida albicans* 1.

2.5. Resultados e discussão

2.5.1. Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

Os valores de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta (PZ) dos CLNs produzidos foram observados na faixa de 230 a 1189 nm, 0,211 a 0,485 e -24 a -39,5, correspondentemente, conforme relatado na Tabela 11. Os resultados exibidos demonstraram que grande parte das formulações de CLNs produzidas tinham tamanhos de partícula inferiores a 500 nm, podendo ser classificadas como nanocarreadores (CARVAJAL-VIDAL et al., 2019).

Quanto ao índice de polidispersidade, a maioria das emulsões estudadas apresentaram valores entre 0,1 e 0,4, por esta razão podem ser classificadas como moderadamente polidispersas. Quando o parâmetro analisado é o potencial zeta, sistemas com intervalo de resultados entre ± 20 até ± 30 mV, são classificados como moderadamente estáveis, e sistemas com resultados entre ± 30 até ± 40 mV são classificados como estáveis.

Variações nos tamanhos de partícula foram observadas em função dos dias, podendo-se inferir que o estresse causado pelo tempo de estocagem contribuiu de maneira relevante para o aumento dos tamanhos (HYUN et al., 2022). Verificou-se que os menores tamanhos de partícula obtidos ocorreram em formulações com quantidades da cera de abelha significativamente maiores, comportamento atestado pelos valores de P (ALOTAIBI et al.,

2021).

2.5.2. Determinação de parâmetros otimizados para a formulação de nanoemulsão utilizando óleo de coco catolé (*Syagrus cearensis*)

Os dados das CLNs produzidas utilizando óleo do coco catolé como componente lipídico líquido, foram analisados estatisticamente utilizando design experimental proposto por modelagem por Taguchi. Para esta análise foi utilizado programa de análise estatística Minitab®. Os fatores analisados para este experimento foram teor de surfactante, teor de óleo de coco catolé (lipídeo líquido) e teor de cera de abelha (lipídeo sólido). Todos os fatores foram avaliados em três níveis, estabelecidos em função de levantamento bibliográfico prévio para formulação de nanoemulsões (KATATA-SERU et al., 2017). Como respostas avaliadas para o sistema de emulsão nanométrica foram analisados o Tamanho de partícula, Índice de polidispersividade e o Potencial Zeta dos nanocarreadores, sendo consideradas as evoluções das respostas obtidas nos intervalos de 1, 8, 15 e 30 dias, após a síntese das formulações. A codificação dos fatores e dos níveis utilizados encontra-se na Tabela 9. O design estatístico modelado por Taguchi utilizando estes três fatores em três níveis levou a condução de nove experimentos com as condições explicitadas conforme a Tabela 10.

2.5.2.1. Resposta – Tamanho de partícula

O parâmetro de tamanho de partícula é fundamental para determina-se a estabilidade coloidal dos nanossistemas, tendo em vista que menores tamanhos resultam em maiores as possibilidades de aplicação das CLNs, como por exemplo a destinação dos nanocarreadores à administração oral, que são consideradas ideais quando seu tamanho se apresenta próximo de 300 nm (DE SOUZA et al., 2024).

A partir das amostras sintetizadas, F8 apresentou os menores tamanhos de partículas do primeiro ao trigésimo dia de análise. Estudo publicado por (DA SILVA et al., 2022) sugere que a redução da viscosidade devido à menor quantidade de cera utilizada, influencia na formação de uma fase orgânica de menor viscosidade, mais suscetível à cavitação ultrassônica, gerando partículas menores.

Para análise deste parâmetro foi escolhida como resposta do sistema “quanto menor o tamanho de partícula, melhor”, pois menores tamanhos de partícula proporcionam ao sistema maior estabilidade coloidal (KARAMI; SAGHATCHI ZANJANI; HAMIDI, 2019). A tabela de resposta para razão sinal-ruído Tabela 12 mostra que o teor de cera de abelha constitui-se como parâmetro de maior impacto na síntese para esta resposta, enquanto que os deltas encontrados para os fatores teor de surfactante e teor de óleo de coco catolé, apresentaram similaridade,

apontado portanto que esses fatores possuíram impacto semelhante na síntese para propiciar menores tamanhos de partícula, todavia o impacto realizado apresentou-se pouco expressivo quando comparado ao teor de cera de abelha.

A análise de variância (ANOVA) dos dados estatísticos corrobora com a tabela de resposta para razões sinal-ruído, com valor de P inferior a 0,05 para o teor de cera de abelha, demonstrando a relevância estatística deste parâmetro nesta resposta. Considerando que os demais parâmetros não causaram impacto estatístico significativo para esta resposta de acordo com a Tabela 13 (ANOVA com valor de P maior que 0,05), e análise conjunta de dados da figura 14, as condições que levariam à um menor tamanho de partícula dentro das condições analisadas seriam nível 1 para os teores de surfactante e óleo de coco catolé empregados na formulação dos nanocarreadores e nível 3 para o teor de cera de abelha .

Tabela 12– Resposta para razões sinal-ruído – tamanho de partícula.

| Nível | Teor Surfactante | Teor de óleo de coco catolé | Teor de cera de Abelha |
|--------------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Baixo | -54,35 | -50,59 | -49,15 |
| Médio | -52,47 | -53,00 | -51,80 |
| Alto | -50,63 | -53,87 | -56,51 |
| Delta | 3,72 | 3,28 | 7,35 |
| Posto ^a | 2 | 3 | 1 |

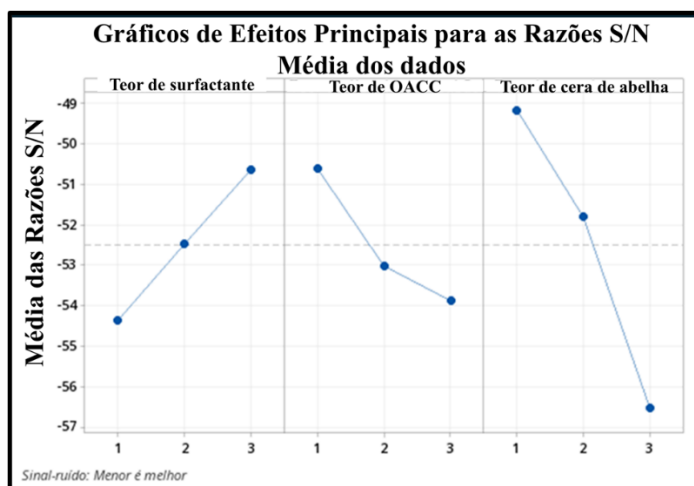
^aindica qual variável independente mais impacta na resposta estudada em ordem decrescente.

Tabela 13– Análise de variância para razões S/R para a resposta tamanho de partícula.

| Fonte | GL^a | SQ Seq^b | SQ (Aj.)^c | QM (Aj.)^d | F^e | P^f |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| Teor de surfactante | 2 | 20,740 | 20,740 | 10,370 | 7,20 | 0,122 |
| Teor de óleo de coco catolé | 2 | 17,359 | 17,359 | 8,679 | 6,03 | 0,142 |
| Teor de cera de abelha | 2 | 83,253 | 83,253 | 41,627 | 28,91 | 0,033 |
| Erro de Resíduos | 2 | 2,880 | 2,880 | 1,440 | | |
| Total | 8 | 124,231 | | | | |

^aGraus de liberdade. ^bSoma dos quadrados sequenciais. ^cAjuste da soma dos quadrados. ^dAjuste da média dos quadrados. ^eValor-F. ^fValor-P.

Figura 14- Gráfico dos efeitos principais para a razão sinal-ruído quando a resposta é o tamanho de partícula.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.5.2.2. Resposta – Índice de polidispersividade

Utilizando os mesmos experimentos, avaliou-se de que forma as variáveis analisadas influenciam o comportamento do índice de polidispersividade das CLNs ao longo de 30 dias, assim como realizado anteriormente para o tamanho de partícula. Este parâmetro é importante na avaliação da homogeneidade do sistema, haja vista que quanto menor este valor, mais homogênea a dispersão pode ser considerada (SHARMA et al., 2018). Assim como adotado para o tamanho de partícula, para análise dos dados foi escolhido como resposta para este parâmetro “menores resultados de índice de polidispersividade, melhor”.

O IPD é uma medida representativa da distribuição do tamanho da população dentro da amostra. Para aplicações de distribuição dos bioativos utilizando nanocarreadores lipídicos, valores de IPD até 0,3 são considerados aceitáveis (DANAEI et al., 2018). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os valores de IPD obtidos por (SUN et al., 2024), em que sintetizaram NLCs com resultados entre $0,32 \pm 0,01$.

De acordo com os resultados obtidos na análise, a amostra F8 apresentou menor resultado de IPD, o que pode ser atribuído à redução da viscosidade nos nanocarreadores causada pelo aumento na proporção de OACC, resultando em tamanhos mais uniformes. O diâmetro das partículas e o IPD foram reduzidos pelo aumento do OACC na proporção de (matriz lipídica líquida com relação matriz lipídica sólida). Portanto, o tipo de lipídio afetaria a formação da emulsão, o tamanho da cristalização das partículas e a uniformidade dos tamanhos (SUN et al., 2024).

Tabela 14 – Resposta para razões sinal-ruído – índice de polidispersividade.

| Nível | Teor de Surfactante | Teor de óleo de coco catolé | Teor de cera de Abelha |
|--------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 11,338 | 11,386 | 12,203 |
| 2 | 10,042 | 9,509 | 11,472 |
| 3 | 10,972 | 11,456 | 8,676 |
| Delta | 1,296 | 1,946 | 3,527 |
| Posto | 3 | 2 | 1 |

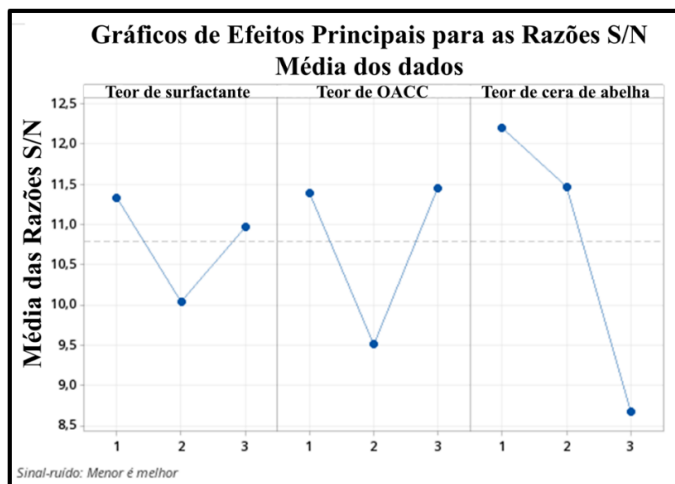
^aindica qual variável independente mais impacta na resposta estudada em ordem decrescente.

Tabela 15– Análise de variância para razões S/R para a resposta índice de polidispersividade

| Fonte | GL^a | SQ Seq^b | SQ (Aj.)^c | QM (Aj.)^d | F^e | P^f |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| Taxa surfactante | 2 | 2,6788 | 2,6788 | 1,3394 | 4,12 | 0,195 |
| Teor de óleo de coco catolé | 2 | 7,3141 | 7,3141 | 3,6570 | 11,26 | 0,082 |
| Teor de cera de abelha | 2 | 20,7920 | 20,7920 | 10,3960 | 32,01 | 0,030 |
| Erro de Resíduos | 2 | 0,6496 | 0,6496 | 0,3248 | | |
| Total | 8 | 31,4345 | | | | |

^aGraus de liberdade. ^bSoma dos quadrados sequenciais. ^cAjuste da soma dos quadrados. ^dAjuste da média dos quadrados. ^eValor-F. ^fValor-P.

Figura 15- Gráfico dos efeitos principais para a razão sinal-ruído quando resposta é a polidispersividade da nanoemulsão.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

O delta encontrado para o fator teor de cera de abelha foi o maior dentre os fatores avaliados (Tabela 14), evidenciando sua importância para obtenção de menores valores de índice de polidispersividade da formulação. Os dados de análise de variância estatística (ANOVA) reforçam a importância do teor de cera de abelha para uma polidispersividade ótima dos nanocarreadores sintetizados, com valor de P inferior a 0,05, no entanto o valor de P encontrado para o teor de óleo de coco catolé ser apenas levemente superior a este valor, sugere que este não deva ser desconsiderado totalmente na determinação das quantidades ótimas para formulação das CLNs, quando considerada o IPD como resposta. Considerando os dados que causaram impacto estatístico significativo para esta resposta de acordo com a Tabela 15 (ANOVA com valor de P maior que 0,05, ou neste caso ligeiramente maior que 0,05, como observado para o teor de óleo de coco catolé), e análise conjunta de dados da Figura 14, as condições que levariam a uma menor polidispersividade dentro das condições analisadas seriam nível 1 para o teor de surfactante, nível 1 para o teor de óleo de coco catolé (uma vez que pela Figura 15 os níveis 1 e 3 produziram resposta de polidispersividade muito semelhante) e nível 3 para o teor de cera de abelha. Os resultados obtidos estão em consonância com aqueles obtidos para a resposta tamanho de partícula.

2.5.2.3 Resposta – Potencial Zeta

Considerando a utilização do Minitab® como recurso de análise dos dados por Taguchi, não permite-se a utilização de valores negativos para o estudo, portanto aplica-se para avaliação desta resposta, os módulos dos valores de potencial zeta obtidos dos mesmos

experimentos que conduziram aos valores de tamanho de partícula e índice de polidispersividade discutidos anteriormente. Para este parâmetro, a resposta desejada é “quanto maior for o resultado de potencial zeta, melhor”, uma vez que resultados de potencial zeta superiores a ± 30 , indicam maior estabilidade para o sistema, devido a repulsão eletrostática de nanocarreadores com mesma carga (DOS SANTOS et al., 2020).

Analisando os resultados do potencial zeta, pode-se observar que as partículas sintetizadas na condição F8 apresentaram melhores resultados que as demais amostras, com valores médios de potencial zeta acima de ± 30 , mostrando que o método de síntese adotado apresentou a capacidade de proporcionar estabilidade ao material sintetizado (OTAROLA et al., 2021).

Muitos estudos demonstraram que sistemas de biodistribuição de bioativos baseados em emulsões estabilizados por surfactantes não iônicos podem ser carregados (HAN et al., 2008). A natureza das moléculas emulsificantes que cercam as gotículas lipídicas influencia fortemente a densidade de carga superficial, que por sua vez depende do pH do meio (MCCLEMENTS; GUMUS, 2016). A presença de cargas pode ser atribuída à presença de impurezas aniônicas e outros lípideos com tamanhos menores no óleo, tais como nos ácidos graxos livres ou no emulsionante, tal como ácido oleico livre. Além disso, a adsorção de íons hidroxila (OH^-) da fase aquosa também pode transmitir carga negativa à interface óleo-água (LÜDTKE et al., 2022).

Tabela 16 – Resposta para razões sinal-ruído – potencial zeta.

| Nível | Teor de surfactante | Teor de óleo de coco catolé | Teor de cera de abelha |
|--------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 30,35 | 30,22 | 30,25 |
| 2 | 30,39 | 30,45 | 30,40 |
| 3 | 30,23 | 30,30 | 30,31 |
| Delta | 0,16 | 0,22 | 0,15 |
| Posto | 2 | 1 | 3 |

^aindica qual variável independente mais impacta na resposta estudada em ordem decrescente.

Tabela 17 – Análise de variância dos resultados de potencial zeta para razões S/R.

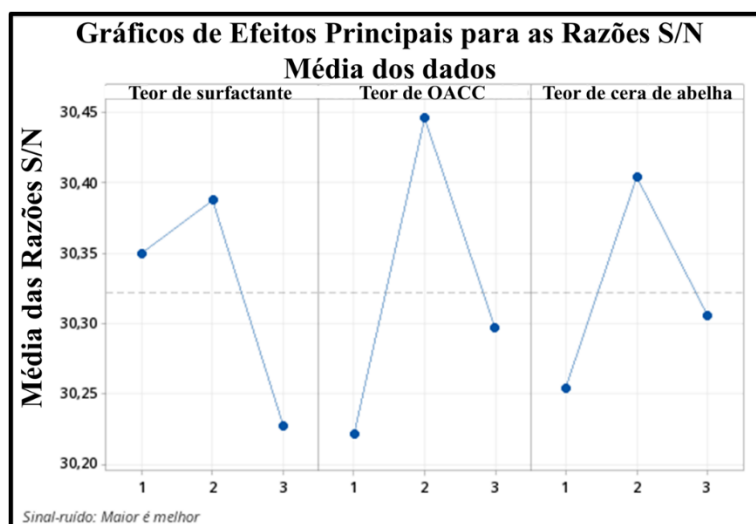
| | GL^a | SQ Seq^b | SQ (Aj.)^c | QM (Aj.)^d | F^e | P^f |
|---------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| Teor de surfactante | 2 | 0,04247 | 0,04247 | 0,02123 | 0,24 | 0,810 |

| | | | | | | |
|-----------------------------|----------|----------------|---------|---------|------|-------|
| Teor de óleo de coco catolé | 2 | 0,07811 | 0,07811 | 0,03906 | 0,43 | 0,698 |
| Teor de cera de abelha | 2 | 0,03477 | 0,03477 | 0,01739 | 0,19 | 0,838 |
| Erro de Resíduos | 2 | 0,18051 | 0,18051 | 0,09025 | | |
| Total | 8 | 0,33586 | | | | |

^aGraus de liberdade. ^bSoma dos quadrados sequenciais. ^cAjuste da soma dos quadrados. ^dAjuste da média dos quadrados. ^eValor-F. ^fValor-P.

A tabela de resposta para razão sinal-ruído considerando o potencial zeta como resposta (Tabela 16) indica que o fator mais influente para a obtenção de maiores resultados desta resposta é o teor de óleo de coco catolé empregado na formulação dos nanocarreadores. Contudo, para o conjunto de dados empregado na análise, a Tabela 17 mostra que os todos fatores analisados tiveram valor de P superior a 0,05, sugerindo que novos níveis deveriam ser empregados na análise. Ainda assim, considerando os dados estatísticos obtidos nos níveis empregados neste experimento, e os dados da Figura 16, uma vez que o teor de surfactante e de cera de abelha não impactam nesta resposta, os menores níveis podem ser adotados e para o teor de óleo de coco catolé, que foi o fator que mais impactou nesta resposta, tem-se o nível 2 como melhor resultado.

Figura 16- Gráfico dos efeitos principais para a razão sinal-ruído quando a resposta é o potencial zeta da nanoemulsão.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Assim, analisando os fatores e as respostas conjuntamente, considerando os parâmetros mais relevantes para cada resposta e sempre primando pela menor quantidade de

matéria prima possível, conforme a tabela 18, temos que:

Tabela 18 – Correlação entre sinal x ruído de maior impacto para cada resposta avaliada na obtenção da nanoemulsão usando óleo de coco catolé.

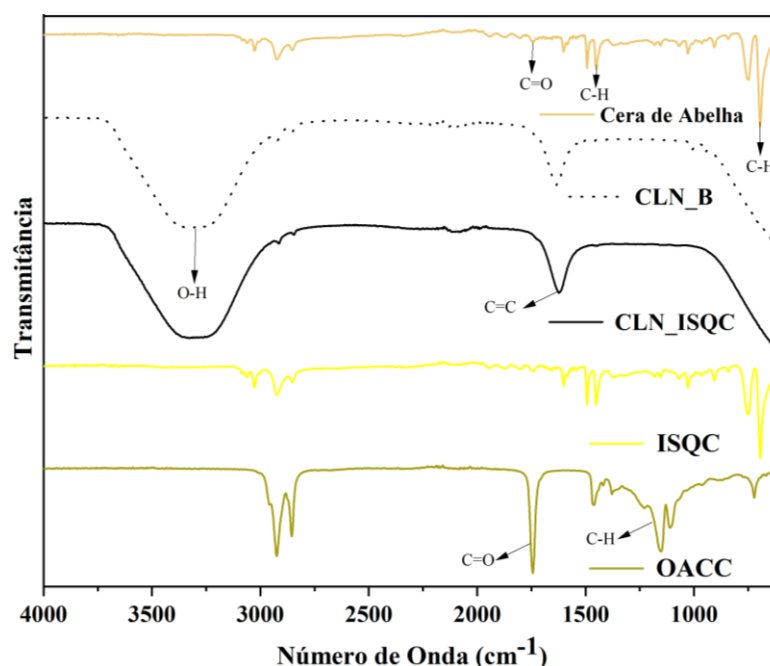
| Sinal x ruído | Teor de surfactante | Teor de óleo de coco catolé | Teor de cera de abelha |
|------------------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|
| Tamanho de partícula | - | - | Nível 3 |
| Índice de polidispersividade | - | - | Nível 3 |
| Potencial zeta | - | Nível 2 | - |

Deste modo, para formulações sintetizadas para os demais ensaios, tais como estudos biológicos bem como testes de caracterização dos nanocarreadores, empregou-se o óleo de coco catolé como fonte lipídica líquida utilizada na quantidade 300 mg, utilizou-se 100 mg de surfactante brij 78 e 500 mg de cera de abelha.

2.5.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A análise de FTIR para os componentes das CLNs e nanoformulações, foi realizada com o objetivo de fornecer a caracterização química tanto dos sistemas sintetizados quanto dos materiais de partida, bem como complementar as informações obtidas nas demais caracterizações (PRABAKARAN et al., 2025).

Figura 17- Espectro comparativo na região do Infravermelho, entre CLN_B, CLN_ISQC e seus constituintes.



Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Os espectros de infravermelho foram obtidos conforme a Figura 17 utilizando a faixa de 500–4000 cm^{-1} de número de onda. No espectro referente a cera de abelha, as bandas de absorção destacadas encontram-se em 696 cm^{-1} referentes a torção da ligação C–H; 1453 cm^{-1} dobramento da ligação C–H; 1793 cm^{-1} estiramento da ligação C=O (ZUBER et al., 2021). Destacam-se nesse contexto as bandas em 1746 referente ao grupo C=O dos ácidos graxos constituintes de OACC, 2934 cm^{-1} referente ao estiramento de ligação C–H; 1150 cm^{-1} de estiramento da ligação C–O (BAUER et al., 2020).

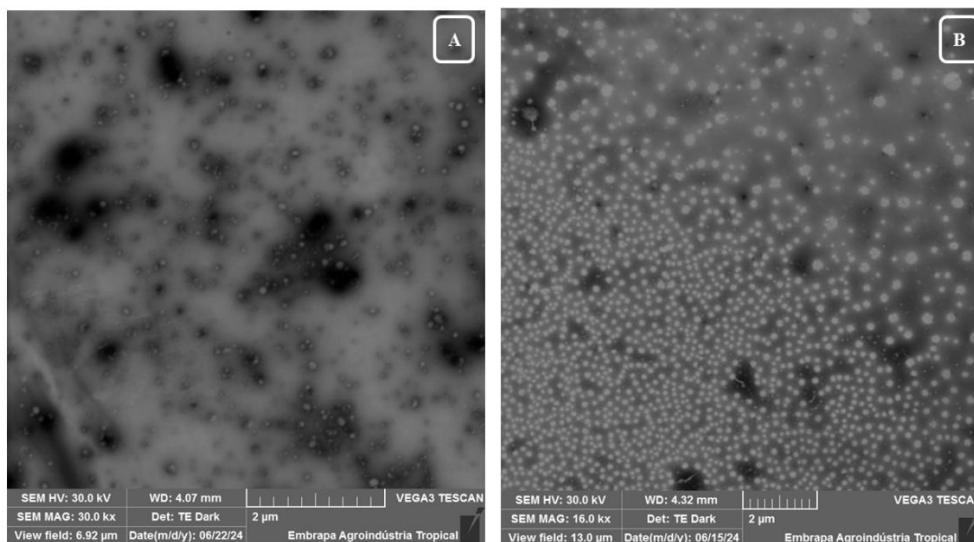
As nanoformulações CLN_B e CLN_ISQC apresentaram bandas de absorção na região de 3327 cm^{-1} relacionada aos modos vibracionais de estiramentos das ligações O–H presente nas estruturas de OACC, cera e isoquercitrina e do tensoativo que compõe a matriz; 1631 cm^{-1} relacionadas ao grupo C=C referente aos ácidos graxos insaturados presentes na cera de abelha e OACC (SUN et al., 2024). Os espectros obtidos para as CLNs demonstraram que as bandas mais relevantes para a isoquercitrina não se destacaram, confirmando indiretamente que o bioativo foi incorporado a matriz lipídica, além disso as bandas mais destacadas nos demais excipientes não foram observadas no espectro das CLNs (KHIAMI et al., 2025).

2.5.4. Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das CLNs desempenha um papel fundamental no carregamento dos

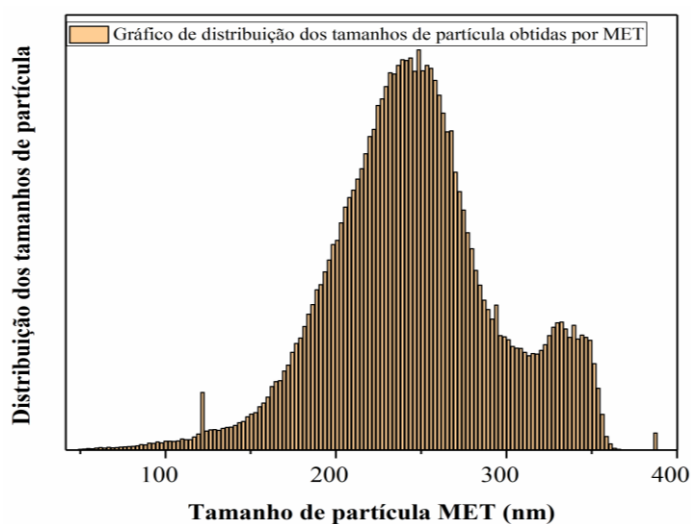
bioativos e com esse intuito de determinar as características morfológicas do material sintetizado bem como estimar-se os tamanhos de partículas dos nanossistemas produzidos, realizou-se os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados das imagens estão dispostos na Figuras 18 e Figura 19.

Figura 18- Imagens da CLN_B (A) e CLN_ISQC (B) obtidas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

Figura 19- Gráfico de distribuição dos tamanhos de partícula obtidas a partir de imagens extraídas da medida de microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

As imagens oriundas do teste bem como o resultado demonstrado no gráfico de distribuição dos tamanhos de partícula obtidos por MET, atestaram que as CLNs produzidas

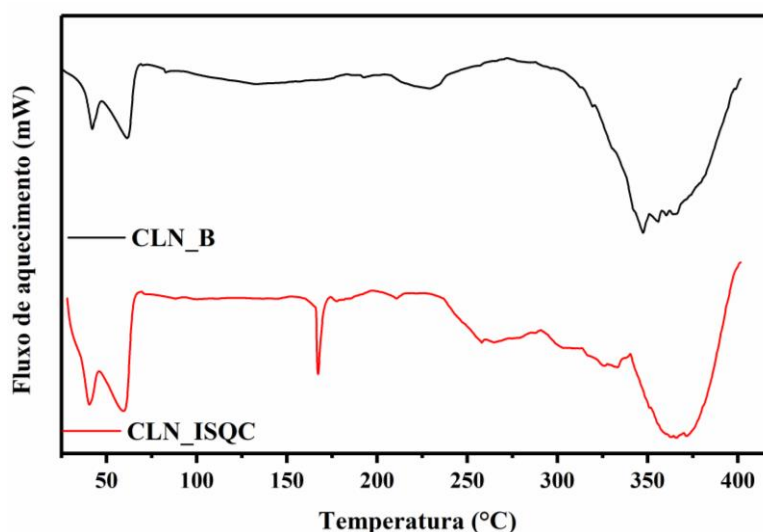
apresentam moderada polidispersividade na distribuição dos tamanhos das partículas, corroborando com resultados do ensaio de IPD. Além disso, os tamanhos de partículas obtidos da amostragem de uma imagem apresentaram valores médios entre 200 e 300 nm, resultados compatíveis aos obtidos no ensaio de tamanho de partícula. Estudos realizados com CLNs conjugadas a ácido hialurônico publicados por (GARG; GARG, 2024) mostraram que os nanocarreadores sintetizados apresentaram tamanho entre 176 e 340 nm, faixa de tamanhos de partícula encontrada no presente estudo.

As CLNs produzidas apresentaram formato esférico que está atrelado à quebra do perfil cristalino da cera de abelha após a inserção do óleo de coco catolé. A utilização de diferentes surfactantes, diferentes proporções de lipídeos sólidos e líquidos, bem como a natureza desses lipídeos impactam na obtenção dos mais variados tamanhos de partícula e das mais diversas morfologias (ABDULLAH et al., 2024).

2.5.4. Calorimetria exploratória diferencial

Em formulações com vários componentes, tais como as CLNs, a utilização de técnicas como a análise térmica através da calorimetria exploratória diferencial, tornam-se fundamentais para os estudos de interação entre os excipientes presentes na formulação e como essa interação impacta nas propriedades de absorção ou emissão térmica durante o aquecimento ou cristalização da amostra analisada. As técnicas de análise térmica contribuem para os estudos dos impactos que os métodos de síntese das partículas baseadas no estresse mecânico e térmico podem proporcionar aos carreadores sintetizados (ROCHA-MENESES et al., 2023).

Figura 20- Curvas de calorimetria exploratória diferencial das amostras CLN_B e CLN_ISQC.



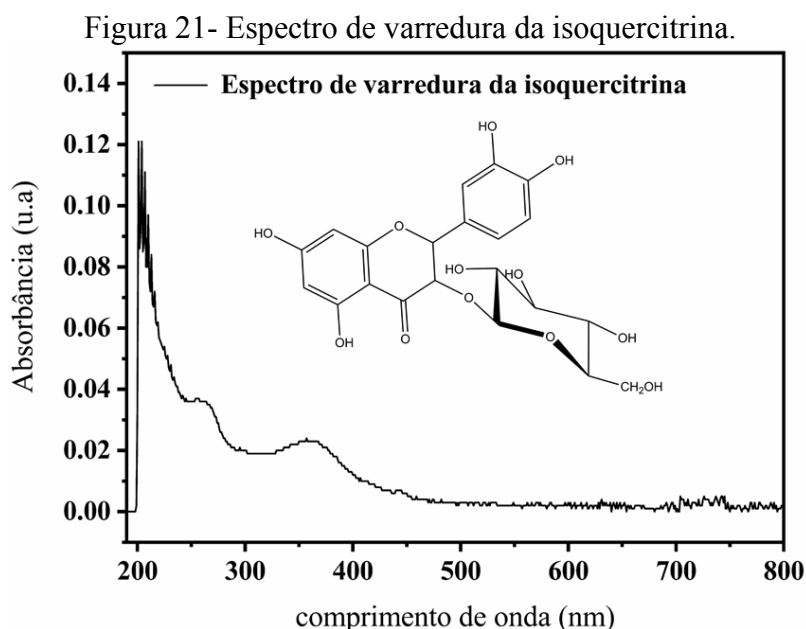
Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

A partir dos resultados demonstrados na figura 20, as CLNs apresentaram picos de caráter endotérmico com temperatura correspondente 40 °C e 60 °C, correspondentes ao processo de fusão da cera de abelha empregada na formulação.

A presença de vários picos endotérmicos mostra que os nanossistemas sintetizados possuem certa heterogeneidade e possível desordem nas matrizes lipídicas que compõe o sistema. A desordem gerada pela utilização de diversas matrizes lipídicas sólidas e líquidas contribuem para que os nanocarreadores obtenham morfologia esférica, corroborando com os resultados verificados no MET. Os fatores supracitados contribuem para que as CLNs apresentem maior capacidade de carreamento do medicamento quando utilizado em formulações farmacêuticas (SOLEIMANIAN et al., 2018).

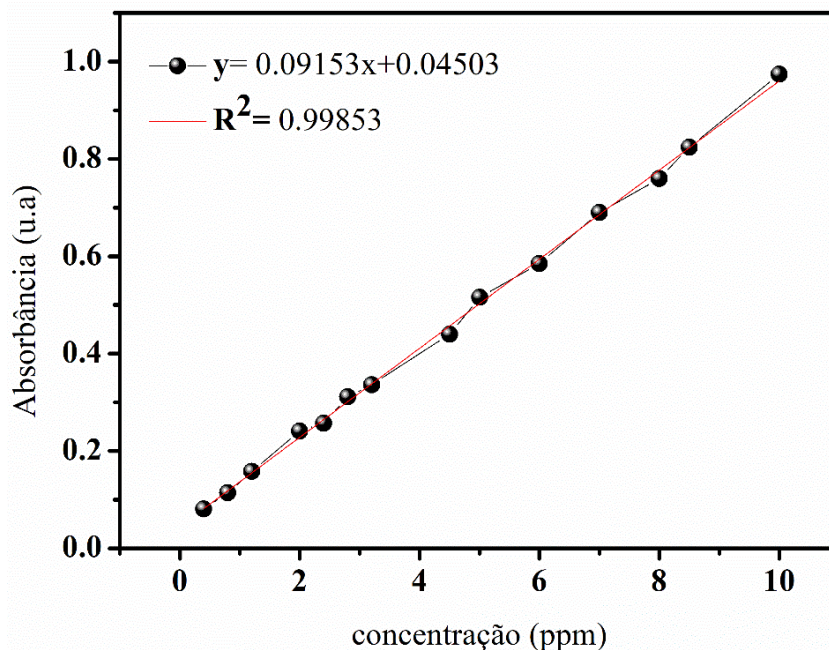
2.5.5. Eficiência de encapsulamento e capacidade de carreamento da isoquercitrina

A realização de uma varredura no espectrofotômetro de UV-vis é primordial para descobrir-se o valor de λ max do bioativo isoquercitrina, mostrada na Figura 21, pois a partir desse resultado obtido foi possível construir uma curva de calibração em metanol conforme demonstrada na Figura 22, capaz de gerar uma equação da reta essencial para os cálculos de eficiência de encapsulamento %EE e capacidade de carreamento %CC.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 22- Curva de Calibração da Isoquercitrina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A curva de calibração obtida revelou que o comprimento de onda máximo da amostra é de 207 nm. Após essa medida construiu-se uma curva de calibração com 14 concentrações diferentes variando-se de 1–14 ppm, gerando a seguinte expressão: $[Abs]=0.09153x[concentração]+0.04503$, com $r^2=0.99853$.

Com base na curva de calibração e comprimento de onda máximo obtidos chegou-se ao valor de 93.99% de eficiência de encapsulamento e 1.16% de capacidade de carregamento. Esses valores de %EE e %CC podem ser atrelados a interação lipofílica entre a matriz lipídica formada e o bioativo. Os resultados obtidos estão em consonância com os obtidos por (GU et al., 2022), que utilizaram a plataforma CLN para encapsular aphloretin obtendo resultado de eficiência similar aos encontrados no presente estudo.

O sistema sintetizado em questão apresentou elevada eficiência de encapsulamento, quando comparado com os trabalhos publicados por (ALOTAIBI et al., 2021), onde foram obtidos resultados de %EE igual a 68–87%, empregando a mesma plataforma para encapsulação de bioativo.

Estudos demonstram como a composição de CLNs influencia a carga de isoquercitrina, relatando que CLNs preparados com Compritol® 888 ATO e MCT a 0,75% p/p de isoquercitrina na fase lipídica tiveram um EE de $88,34 \pm 2,84\%$ e LC de $2,22 \pm 0,01\%$. Em outro estudo, CLNs preparados com Compritol® 888 ATO ou Precirol® ATO5 como lipídeo sólido e Labrasol® como lipídeo líquido mostraram %EE variando entre 79,70 e 96,89% e CC entre 2,63 e 3,26% para 0,5% p/p concentração de isoquercitrina para lipídeos utilizada; tanto %EE

como %CC foram encontrados dependendo do tipo de surfactante usado (Tween® 80 ou Poloxamer 407) (SAKELLARI et al., 2021).

2.5.6. Avaliação da segurança não clínica

2.5.6.1. Toxicidade 96 h

Para todas as concentrações de ISQC ou CLN_B ou CLN_ISQC (0,00006 ou 0,0006 ou 0,006 ou 0,06 ou 0,6 mg/mL), conforme determinado pelo método de Spearman-Kärber, sugere-se que a CL₅₀ para todas as amostras é superior a 0,6 mg/mL. As amostras sintetizadas no trabalho e posteriormente testadas se mostraram seguras, pois não foram tóxicas frente ao zebrafish no intervalo de 96 h da análise (Tabela 19).

Tabela 19- Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras testes frente ao *Zebrafish* adulto.

| Amostra | Mortalidades do <i>Zebrafish</i> Adulto (n=6/grupo) | | | | | | 96 h de Análise CL ₅₀ (mg/mL) / IV |
|----------|---|----|----|----|----|----|--|
| | Controle | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | |
| ISQC | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | > 0,6 |
| CLN_B | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | > 0,6 |
| CLN-ISQC | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | > 0,6 |

Administração – 20 µL, *via* oral (v.o.); C- concentração; C1- 0,00006 mg/mL; C2- 0,0006 mg/mL; C3 - 0,006 mg/mL; C4 - 0,06 mg/mL; C5- 0,6 mg/mL; ISQC; CLN_B; CLN_ISQC; Controle – Veículo (DMSO 3%). CL50-concentração letal para matar 50% dos zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança

2.5.6.2. Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental utilizados para avaliar a ação de drogas que podem atuar no sistema nervoso central do *Zebrafish* (*Danio rerio*) adulto podendo causar comprometimento locomotor (KURTA; PALESTIS, 2010), (GEBAUER et al., 2011) e (TAYLOR et al., 2017). O comportamento natural do *Zebrafish* no teste de campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante incluindo o cruzamento das linhas, portanto manifestações de imobilidade são pouco observadas em condições naturais do zebrafish (CACHAT et al., 2011).

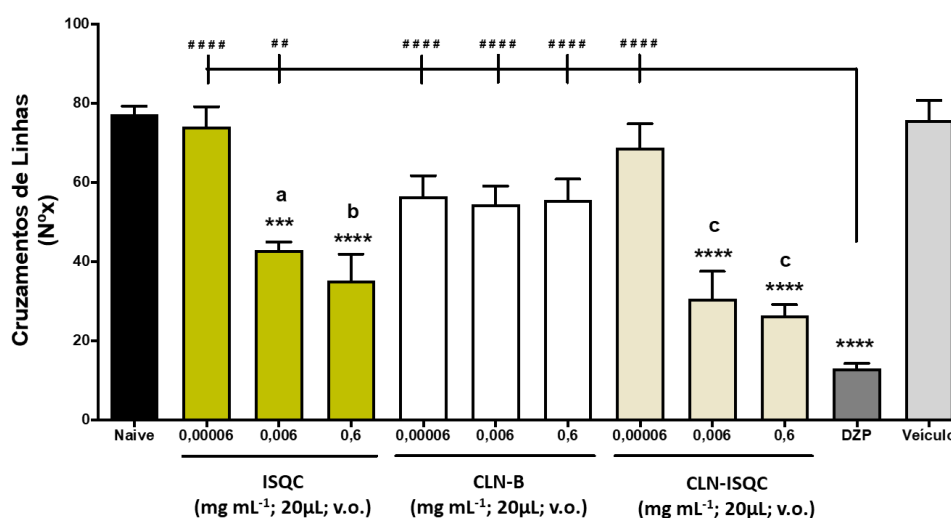
O tratamento do *Zebrafish* com bioativos ansiolíticos, como benzodiazepínicos, pode causar efeito sedativo e diminuir atividade locomotora (GUPTA et al., 2014), (BENNEH et al., 2017), (CHEN et al., 2021) e (SILVA et al., 2023).

Analisando as amostras testadas, somente uma concentração da ISQC e de sua nanoformulação, CLN_ISQC, não causaram efeito sedativo no *Zebrafish*, pois os animais tratados com ISQC ou CLN_ISQC na concentração (0,00006 mg/mL; 20 µL; v.o.) apresentaram efeito significativamente semelhante ao Naive (animais não tratados), (ISQC: $q = 0,6642$, $p > 0,05$; CLN_ISQC: $q = 1,748$, $p > 0,05$) que apresentaram padrão de comportamento significativamente semelhante ao Veículo (Controle Negativo), (ISQC: $q = 0,3496$, $p > 0,05$; CLN_ISQC: $q = 1,433$, $p > 0,05$), todavia com efeito significativamente diferente do efeito dos animais tratados com diazepam (DZP; 10 mg/mL; 20 µL; v.o.), (ISQC: $q = 12,79$, $p < 0,0001$; CLN_ISQC: $q = 11,71$, $p < 0,0001$) aos quais foram utilizados como controle sedativo (DZP: $q = 13,46$, $p < 0,0001$ vs. Naive ou: $q = 13,14$, $p < 0,0001$ vs. Veículo).

O carreador lipídico nanoestruturado (CLN_B), também não apresentou efeito sedativo frente ao zebrafish, pois os animais tratados com CLN_B (0,00006; 0,006 ou 0,6 mg/mL; 20 µL; v.o.) apresentaram efeito significativamente semelhante ao efeito dos Naive (animais não tratados), que foram significativamente semelhantes ao Veículo (Controle Negativo), bem como efeito significativamente diferente do efeito dos animais tratados com diazepam (DZP; 10 mg/mL; 20 µL; v.o.).

No presente estudo, somente uma concentração da ISQC e sua nanoformulação, CLN_ISQC, não resultou em diminuição atividade locomotora do ZFa, sugerindo-se, assim, um possível efeito não sedativo e/ou relaxante molecular das mesmas. Os resultados da atividade locomotora são mostrados na Figura 23 ($F_{11,60} = 19,94$).

Figura 23- Efeito da ISQC ou CLN_B ou CLN_ISQC sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min).



Naive - animais não tratados. v.o. – administração *via* oral. ISQC; CLN_B; CLN_ISQC; DZP – Diazepam (10

mg/mL; 20 µL; v.o.). Veículo – DMSO 3% (20 µL; v.o.). Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**p<0,001; ***p<0,0001 vs. Naive ou Veículo; ap<0,01; bp<0,0001 vs. ISQC 0,00006 mg/mL; cp<0,0001 vs. CLN_ISQC 0,00006 mg/mL; # #p<0,01; # # # #p<0,0001 vs. DZP).

2.5.7. Análise antifúngica

Com o intuito de verificar a sensibilidade das cepas *Candida* spp frente a ISQC, bem como aos nanocarreadores, foram realizados testes de sensibilidade objetivando a análise das respostas produzidas pelos nanocarreadores frente as cepas. Os resultados das amostras OACC, ISQC, CLN_B e CLN_ISQC estão apresentados na Tabela 20 e foram expressos através da concentração inibitória mínima (CIM50).

Tabela 20- Avaliação do efeito antifúngico da isoquercitrina e dos nanocarreadores sintetizados frente a isolados de *Candida* spp.

| | | CIM 50 | | | |
|--------------------------------------|-----------------|----------------|---------------------------------|---|----------|
| | | OACC | ISQC | CLN_B | CLN_ISQC |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | >21,04 mg/ml | 308,1 µg/ml | 0,029% (0,615 µg/ml de OACC) | 0,029% (0,615 µg/ml de OACC e 0,18 µg/ml de ISQC) | |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258 | >21,04 mg/ml | 102,8 µg/ml | 0,019% (0,41 µg/ml de OACC) | 0,03% (0,615 µg/ml de OACC e 0,18 µg/ml de ISQC) | |
| <i>C. auris</i> 01256 P CDC | >21,04 mg/ml | 462,1 µg/ml | 0,312% (6,57 µg/ml de OACC) | 0,625% (13,15 µg/ml de OACC e 3,85 µg/ml de ISQC) | |
| <i>C. albicans</i> 1 | >21,04 mg/ml | 462,1 µg/ml | 0,234% (4,92 µg/ml de OACC) | 0,468% (9,86 µg/ml de OACC e 2,88 µg/ml de ISQC) | |

Através dos resultados demonstrados na Tabela 20, pode-se inferir que isoquercitrina isolada e as emulsões CLN_B e CLN_ISQC apresentaram atividade antifúngica dentro da faixa de concentração utilizada frente aos isolados testados. Além disso a

isoquercitrina associada aos nanocarreadores, proporcionou melhores resultados de atividade antifúngica em comparação com os resultados obtidos pelo bioativo de maneira isolada, sugerindo que possa haver uma ação sinérgica entre sistema e bioativo. Quando compara-se com os trabalhos publicados por (JANECZKO et al., 2022) e (ALIZADEH; EBRAHIMZADEH, 2022), nota-se diferenças relevantes entre os resultados, pois a atividade antifúngica dos derivados de quercetina aumenta conforme o aumento da hidrofobicidade, justificando portanto o motivo pelo qual encontra-se diferenças entre os resultados obtidos nesse trabalho.

O óleo de amêndoa do coco catolé não apresentou atividade antifúngica na faixa de concentração testada. O resultado obtido diverge do trabalho publicado por (DAYRIT, 2015), que catalogou resultados de atividade antifúngica do ácido láurico, composto majoritário do OACC frente a cepa *Candida albicans*. Essa divergência pode ser justificada pela menor presença de ácido laurico no OACC quando comparado ao ácido graxo isolado.

2.6. Conclusões

A síntese de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir do óleo de coco catolé e da cera de abelha, dois produtos abundantes da nossa biodiversidade, mostrou-se viável, pois resultou na formação de nanocarreadores com tamanho de partícula e potencial zeta que conferem aos sistemas estabilidade coloidal. Esses resultados foram viabilizados devido a otimização da síntese. Nesse contexto, o método de Taguchi adotado nessa síntese foi fundamental para gerar uma condição otimizada, a partir do estudo das variáveis de massa do surfactante, da cera e do OACC, analisando-se posteriormente como respostas, tamanho de partícula, IPD e potencial zeta.

Posteriormente a esse processo procedeu-se com as análises morfológicas que confirmaram formato esférico das partículas bem como sua escala em tamanho nanométrico. Através do cálculo de %EE e CC% pôde-se atestar que os nanocarreadores produzidos incorporaram o bioativo isoquercitrina com eficiência de encapsulamento de 93.99% e capacidade de carregamento de 1,66%, denota-se portanto a elevada capacidade destes sistemas na incorporação de bioativos com caráter lipofílico. Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que a ISQC e sua nanoformulação (CLN_ISQC) testadas são consideradas seguras, pois não foram tóxicas frente a *Zebrafish* adulto até 96 h de análise. Acerca da atividade locomotora do *Zebrafish*, as CLNs produzidas apresentaram efeito não sedativo e/ou relaxante muscular frente ao *Zebrafish* adulto. Por fim, os sistemas sintetizados apresentaram resultados de atividade antifúngica, que tornam à esses nanocarreadores, materiais promissores para tratamento de doenças causadas por cepas *Candida spp.*

A partir dos resultados obtidos acerca da síntese das CLNs e da incorporação da ISQC obteve-se a possibilidade de depósito da patente no Instituto nacional da propriedade industrial.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A; PATLE, D. S; SHAHADAT, M; AHMAD, Z; ATHAR, M; ASLAM, M; VO, D.V. N. Feedstocks, catalysators, process variables and techniques for biodiesel production by one-pot extraction-transesterification: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Pulau Pinang, v. 20, n. 1, p. 335–378, 2022.
- ABDULLAH, G. Y; SONG, Z; CAO, Y; XIAO, J. Impact of cocoa butter and medium chain triglycerides ratios on processing stability, supersaturation, and digestive properties of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. **LWT**, Guangzhou, v. 197, p. 115895, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643824001749>.
- AHMED, M; AZUMAH, S; APANYIN, S; NOVICK, B. D; WUBAH, D. The quality and infrared determination of trans-fatty acid contents in some edible vegetable oils. **Journal of Food Science and Technology**, Cape Coast, v. 3, p. 142–148, 2012.
- ALIY, G. J; KUMAR, G; SUPPIAH, S. Optimization of Atterberg limits of treated expansive soils with Taguchi method. **Materials Today: Proceedings**, Tamil Nadu, v.43, p. 2127–2133, 2021.
- ALIZADEH, S. R; EBRAHIMZADEH, M. A. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Sari, v. 229, p. 114068, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S022352342100917X>.
- ALOTAIBI, B. S; PERVAIZ, F; BUABEID, M; ASHAMES, A; FAHELELBOM, K.M; SIDDIQUE, S; SHOUKAT, H; REHMAN, S; NOREEN, S; MURTAZA, G. Nanostructured lipid carriers based suppository for enhanced rectal absorption of ondansetron: In vitro and in vivo evaluations. **Arabian Journal of Chemistry**, Riyadh, v.14, n. 12, p. 103426, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853522100441X>.
- ALVES, J. L. F; SILVA, J. C. G; MUMBACH, G. D; SENA, R. F; MACHADO, R. A. F; MARANGONI, C. Prospection of catole coconut (*Syagrus cearensis*) as a new bioenergy feedstock: Insights from physicochemical characterization, pyrolysis kinetics, and thermodynamics parameters. **Renewable Energy**, Florianópolis, v. 181, p. 207–218, 2022.
- AMBAT, I; SRIVASTAVA, V; SILLANPÄÄ, M. Recent advancement in biodiesel production methodologies using various feedstock: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Mikkeli, v. 90, p. 356–369, 2018.
- ATHAR, M; ZAIDI, S. A review of the feedstocks, catalisadors, and intensification techniques for sustainable biodiesel production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Aligarh, v. 8, n. 6, p. 104523, 2020.
- ATTAMA, A. A; MÜLLER G. C. C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Brunsvique, v. 315, n. 1, p. 189–195, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775707007546>.

BARUA, P; HOSSAIN, N; CHOWDHURY, T; CHOWDHURY, H. Commercial diesel application scenario and potential of alternative biodiesel from waste chicken skin in Bangladesh. **Environmental Technology and Innovation**, Chittagong, v. 20, p. 101139, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186420314395>.

BAUER, L. C; SANTOS, L. S; SAMPAIO, K. A; FERRÃO, S. P. B; FONTAN, R. C. I; MINIM, L. A; VELOSO, C. M; BONOMO, R. C. F. Physicochemical and thermal characterization of babassu oils (*Orbignya phalerata* Mart.) obtained by different extraction methods. **Food Research International**, Itapetinga, v. 137, p. 109474, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920304993>.

BERMAN, J; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, Tel Aviv, p. 319–331, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>.

BENNEH, C. K; BINEY, R. P; MANTE, P. K; TANDOH, A; ADONGO, D. W; WOODE, E. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, Ho, v. 207, p. 129–145, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874116318311>.

BHOSALE, A; JYOTHI, V. G. S. S; DEVANGAN, P; BAJAD, G; SINGH, H; PATRA, B; GURU, S. K; MADAN, J. Emu oil enriched nanostructured lipid carriers of lornoxicam burdened polymeric gel augmented drug delivery and assisted cartilage repairing in knee osteoarthritis: In-vitro and in-vivo studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Hyderabad, v. 98, p. 105914, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224724005835>.

BOKHARI, A; YUSUP, S; ASIF, S; CHUAH, L. F; MICHELLE, L. Z. Y. Chapter 3 - Process intensification for the production of canola-based methyl ester via ultrasonic batch reactor: optimization and kinetic study. Seri Iskandar, **Elsevier**. p. 27–42, 2020.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Brunsvique, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029411000835>.

CACHAT, J; STEWART, A; UTTERBACK, E; HART, P; GAIKWAD, S; WONG, K; KYZAR, E; WU, N; KALUEFF, A. V. Three-Dimensional Neurophenotyping of Adult Zebrafish Behavior. **PLOS ONE**, Nova Orleans, v. 6, n. 3, p. 1–14, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017597>.

CHEN, W. H; CARRERA U. M; KWON, E. E; LIN, K.Y. A; PARK, Y.K; DING, L; SAW, L. H. A comprehensive review of thermoelectric generation optimization by statistical approach: Taguchi method, analysis of variance (ANOVA), and response surface methodology (RSM). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Tainan, v. 169, p. 112917, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032122007985>.

CHOWDHURY, A; CHAKRABORTY, R; MITRA, D; BISWAS, D. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, Kolkata, v. 52, p. 783–789, 2014.

COLA, D. F; PASQUOTO, T; GUILGER, M; LIMA, R; SILVA, C. M. G. D; FRACETO, L. F. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, Sorocaba, v. 39, n. 9, p. 1034–1043, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160123>.

COLLYMORE, C; RASMUSSEN, S; TOLWANI, R. J. Gavaging Adult Zebrafish. **JoVE**, Nova Iorque, n. 78, p. 50691, 2013. Disponível em: <https://www.jove.com/t/50691>.

CORDEIRO, A. P; FEUSER, P. E; ARAÚJO, P. H. H; SANTOS, D. C; OURIQUE, F; HÜBNER, L. J; PEDROSA, R. C; SAYER, C. Doxorubicin and 4-nitrochalcone loaded in beeswax-based nanostructured lipid carriers: In vitro antitumoral screening and evaluation of synergistic effect on HepG-2 cells. **International Journal of Pharmaceutics**, Florianópolis, v.666, p.124788, 2024. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124788>.

COSTA, C. L; ALMEIDA, F. N. C; SOUZA, G. K; ASANOME, I. Y; PEREIRA, N. C. Synthesis and optimization of ethyl esters from fish oil waste for biodiesel production. **Renewable Energy**, Maringá, v. 133, p. 743–748, 2019.

CORZO, L. D. E; MUNRO, C. A; MACCALLUM, D. M. An ex vivo human skin model to study superficial fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, Aberdeen, v. 10, p. 1–17, 2019.

DANAEI, M; DEGHANKHOLD, M; ATAEL, S; HASANZADEH, D. F; JAVANMARD, R; DOKHANI, A; KHORASANI, S; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, Melbourne, v. 10, n. 2, 2018.

DAYRIT, F. M. The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 1, p. 1–15, 2015.

DOBLE, M; KRUTHIVENTI, A. K; MUKESH, D; KEN, R; ANIL, K. Green Chemistry and Engineering: Chapter 1- Introduction. In: Green Chemistry and Engineering. **Elsevier Inc**, San Diego, v. 3, p. 1–23, 2007.

EKAMBARAM, S. P; PERUMAL, S. S; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, Tiruchirappalli, v. 25, n. 1, p. 147–158, 2017.

EL-MENSHAWE, S. F; SAYED, O. M; ABOU, T. H. A; SAWERIS, M. A; ZAHER, D. M; OMAR, H. A. The use of new quinazolinone derivative and doxorubicin loaded solid lipid nanoparticles in reversing drug resistance in experimental cancer cell lines: A systematic study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Beni-Suef, v. 56, p. 101569, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101569>.

ESAN, A. O; OLALERE, O. A; GAN, C. Y; SMITH, S. M; GANESAN, S. Synthesis of biodiesel from waste palm fatty acid distillate (PFAD) and dimethyl carbonate (DMC) via Taguchi optimisation method. **Biomass and Bioenergy**, Penang, v.154, p. 106262, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096195342100297X>.

FALOWO, O. A; BETIKU, E. A novel heterogeneous catalisador synthesis from agrowastes mixture and application in transesterification of yellow oleander-rubber oil: Optimization by Taguchi approach. **Fuel**, Omu-Aran, v. 312, p. 122999, 2022.

FERREIRA, E. N; ARRUDA, T. B. M. G; RODRIGUES, F. E. A; ARRUDA, D. T. D; SILVA, J. J. H; PORTO, D. L; RICARDO, N. M. P. S. Investigation of the thermal degradation of the biolubricant through TG-FTIR and characterization of the biodiesel – Pequi (*Caryocar brasiliensis*) as energetic raw material. **Fuel**, Fortaleza, v.245, p. 398–405, 2019.

FERREIRA, T. L; LEITÃO, A. C; SILVA, L. J; AMARAL, V. S. L. G; FARIAS, C. V. P; RODRIGUES, D. S; BARBOSA, S. A; ANDRADE, N. J. B; BARBOSA, A. D; ALMEIDA, M. L. E; FRANÇA, R. M. E; CAVALCANTI, B. C; MORAES, M. O; NOBRE, J. H. V; SILVA, C. R. Mangiferin potentiates the activity of antifungal agents against fluconazole-resistant *Candida* spp. **Future Microbiology**, Fortaleza, v.13, 1157–1170, 2024. <https://doi.org/10.1080/17460913.2024.2366627>.

FOCKE, W. W; WESTHUIZEN, V.D. I; GROBLER, A. B. L; NSHOANE, K. T; REDDY, J. K; LUYT, A. S. The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Fuel**, Pretória, v. 94, p. 227–233, 2012.

FRATINI, F; CILIA, G; TURCHI, B; FELICIONI, A. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Pisa, v. 9, n. 9, p. 839–843, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764516301407>.

GARG, R; GARG, A. Development and evaluation of hyaluronic acid conjugated tacrolimus-loaded nanostructured lipid carriers using moringa oleifera seed oil as liquid lipid. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Chaumuhan, v. 95, p. 105591, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224724002600>.

GEBAUER, D. L; PAGNUSSAT, N; PIATO, Â. L; SCHAEFER, I. C; BONAN, C. D; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Porto Alegre, v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305711001316>.

GO, A. W; SUTANTO, S; ONG, L. K; TRAN, N. P. L; ISMADJI, S; JU, Y. H. Developments in *in-situ* (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Taipei, v. 60, p. 284–305, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116001003>.

GORDILLO, G. A; MORA, H. C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Bogotá, v. 133, p.285–308, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641118310610>.

GU, L; SUN, R; WANG, W; XIA, Q. Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: preparation and in vitro characterization studies. **Chemistry and Physics of Lipids**,

Nanjing, v. 242, p. 105150, 2022. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308421001031>.

HAO, H; CHANG, T; CUI, L; SUN, R; GAO, R. Theoretical study on the mechanism of hydrogen donation and transfer for hydrogen-donor solvents during direct coal liquefaction.

Catalisadors, Hohhot, v. 8, n. 12, 2018.

HAN, F; LI, S; YIN, R; LIU, H; XU, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Chenianguo, v. 315, n. 1, p. 210–216, 2008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775707007741>.

HASUMURA, M; YASUHARA, K; TAMURA, T; IMAI, T; MITSUMORI, K; HIROSE, M. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats.

Food and Chemical Toxicology, Tokyo, v.42, n. 3, p. 439–444, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691503003053>.

HESHMATI, M. K; DADASHI, S; PEZESHKI, A; GHANBARZADEH, B. The application of nanostructured lipid carrier for encapsulation of Rosa canina and Heracleum persicum extracts and production of mayonnaise enriched with encapsulated extracts.

Journal of Agriculture and Food Research, Tabriz, v.19, p.101742, 2025.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101742>.

HOEKMAN, S. K; BROCH, A; ROBBINS, C; CENICEROS, E; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, Reno, v. 16, n. 1, p. 143–169, 2012.

HOSSEINI, S. F; MOUSAVI, Z; MCCLEMENTS, D. J. Beeswax: A review on the recent progress in the development of superhydrophobic films/coatings and their applications in fruits preservation.

Food Chemistry, Nur, v. 424, p. 136404, 2023. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814623010221>.

HYUN, J. E; YI, H. Y; HONG, G. P; CHUN, J. Y. Digestion stability of curcumin-loaded nanostructured lipid carrier.

LWT, Jeju, v. 162, p. 113474, 2022. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643822004091>.

JAIN, A. S; DHAWAN, V. V; SARMENTO, B; NAGARSENKER, M. S. In Vitro and Ex Vivo Evaluations of Lipid Anti-Cancer Nanoformulations: Insights and Assessment of Bioavailability Enhancement.

AAPS PharmSciTech, Mumbai, v. 17, n. 3, p. 553–571, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0522-2>.

JAIN, S; SHARMA, M. P. Application of thermogravimetric analysis for thermal stability of Jatropha curcas biodiesel.

Fuel, Roorkee, v. 93, p. 252–257, 2012.

JANECZKO, M; GMUR, D; KOCHANOWICZ, E; GÓRKA, K; SKRZYPEK, T. Inhibitory effect of a combination of baicalein and quercetin flavonoids against Candida albicans strains isolated from the female reproductive system.

Fungal Biology, Lublin, v. 126, n. 6, p. 407–420, 2022. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614622000502>.

KARAMI, Z; KOVITWANICHKANONT, T; CHONG, A. Superficial fungal infections. **Australian Journal for General Practitioners**, Melbourne v. 48, p. 706–711, 2019. Disponível em: <https://www1.racgp.org.au/ajgp/2019/october/superficial-fungal-infections>.

KASIM, F. H; HARVEY, A. P; ZAKARIA, R. Biodiesel production by *in situ* transesterification. **Biofuels**, Perlis, v. 1, n. 2, p. 355–365, 2010.

KATATA, S. L; LEBEPE, T. C; AREMU, O. S; BAHADUR, I. Application of Taguchi method to optimize garlic essential oil nanoemulsions. **Journal of Molecular Liquids**, Mmabatho, v. 244, p. 279–284, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732217334293>.

KIM, T. H; SUH, W. I; YOO, G; MISHRA, S. K; FAROOQ, W; MOON, M; SHRIVASTAV, A; PARK, M. S; YANG, J. W. Development of direct conversion method for microalgal biodiesel production using wet biomass of *Nannochloropsis salina*. **Bioresource Technology**, Daejeon, v. 191, p. 438–444, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415003636>.

KIRUBAKARAN, M; ARUL, M. S. V. A comprehensive review of low cost biodiesel production from waste chicken fat. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Tiruchirapalli, v. 82, p. 390–401, 2018.

KOK, M. V. Thermal behavior and kinetics of crude oils at low heating rates by differential scanning calorimeter. **Fuel Processing Technology**, Ankara, v. 96, p. 123–127, 2012.

KOSURU, S. M. Y; DELHIWALA, Y; KOORLA, P. B; MEKALA, M. A review on the biodiesel production: Selection of catalyst, Pre-treatment, Post treatment methods. **Green Technologies and Sustainability**, Hyderabad, p.100061, 2024. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.grets.2023.100061>.

KRYSAN, D. J. The unmet clinical need of novel antifungal drugs. **Virulence**, Rochester, v.8, p.135–137, 2017. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1276692>.

LAKSHMINARAYANAN, P. A; AGHAV, Y. V. Ignition Delay in a Diesel Engine. In: Modelling Diesel Combustion. **Springer Netherlands**, Dordrecht, p. 59–78, 2010.

LEMÕES, J. S; ALVES, S. R. C. M; FARIAS, S. P; MOURA, R. R; PRIMEL, E. G; ABREU, P. C; MARTINS, A. F; MONTES D'OCA, M. G. Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, Porto Alegre, v. 3, p. 33–38, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554116300018>.

LEE, K. Y; JANG, G. H; BYUN, C. H; JEUN, M; SEARSON, P. C; LEE, K. H. Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. **Bioscience Reports**, Seoul, v. 37, n. 3, p.199, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20170199>.

LEMMENS, M; DORSHEIMER, L; ZELLER, A; DIETZ, B. Y. Non-clinical safety assessment of novel drug modalities: Genome safety perspectives on viral-, nuclease- and

nucleotide-based gene therapies. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Basel, v. 896, p. 503767, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571824000433>.

LÜDTKE, F. L.; STAHL, M. A.; GRIMALDI, R.; CARDOSO, L. P.; GIGANTE, M. L.; RIBEIRO, A. P. B. High oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil nanostructured lipid carriers: Development and characterization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Campinas, v. 654, p. 130039, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775722017940>.

LU, V. W.; ZHAO, S.; YU, H.; LI, N.; GARAMUS, V. M.; CHEN, Y.; YIN, P.; ZHANG, R.; GONG, Y.; ZOU, A. Brucea javanica oil-loaded nanostructure lipid carriers (BJO NLCs): Preparation, characterization and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Shanghai, v. 504, p. 312–319, 2016.

LUGO, M. H.; SÁNCHEZ, D. M.; SALES, C. M.; OLIVARES, H. R.; LUGO, L. R.; TORRES, A. A. Synthesis of biodiesel from coconut oil and characterization of its blends. **Fuel**, Cuajimalpa, v.295, p. 120595, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236121004713>.

MAGALHÃES, F. E. A.; SOUSA, C. Á. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, Â. O.; OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R. S.; CAMPOS, A. R. Adult Zebrafish (Danio rerio): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, Fortaleza, v. 14, n. 5, p. 422–429, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1436>.

MAKINO, T.; SHIMIZU, R.; KANEMARU, M.; SUZUKI, Y.; MORIWAKI, M.; MIZUKAMI, H. Enzymatically Modified Isoquercitrin, ALPHA.-Oligoglucosyl Quercetin 3-O-Glucoside, Is Absorbed More Easily than Other Quercetin Glycosides or Aglycone after Oral Administration in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Nagoya, v. 32, n. 12, p. 2034–2040, 2009. Disponível em: http://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/32/12/32_12_2034/_article.

MCCLEMENTS, D. J.; GUMUS, C. E. Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amherst, v. 234, p. 3–26, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868616300380>.

MEIRELES, B. R. L. A.; ALCÂNTARA, M. A.; POLARI, I. L. B.; SOUZA, A. G.; SANTOS, N. A.; GRISI, C. V. B.; CORDEIRO, A. M. T. de M. Catole coconut (*Syagrus cearensis*) oil: physicochemical characterization and thermo-oxidative stability by TG/DTG/DTA and Rancimat. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, João Pessoa, v.147, p. 3591–3598, 2021.

MENEZES, C. S. V.; SOUSA, A. C. C.; SILVA, L. M. A.; RODRIGUES, T. H. S.; BRITO, E. S.; RICARDO, N. M. P. S. Extraction of cell wall pectins and hemicellulose from agro-industrial wastes: A sustainable alternative source. **Carbohydrate Polymers**, Fortaleza v.347, p.122769, 2025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122769>.

MOHAMADZADEH, S. H.; KARIMI, S. J.; GHOTBI, C. Biodiesel production from Spirulina

microalgae feedstock using direct transesterification near supercritical methanol condition. **Bioresource Technology**, Teerã, v. 239, p. 378–386, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417305771>.

MOHIDDIN, M. N. B; TAN, Y. H; SEOW, Y. X; KANSEDO, J; MUBARAK, N. M; ABDULLAH, M. O; CHAN, Y. S; KHALID, M. Evaluation on feedstock, technologies, catalisador and reactor for sustainable biodiesel production: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Miri, v. 98, p. 60–81, 2021.

MOREIRA, F. B. F; BEZERRA, R. C. F; RODRIGUES, F. E. A; ASSUNÇÃO, J. C. C; ARRUDA, T. B. M. G. *In situ* transesterification of babassu for production of biodiesel as sustainable energy option for Aratuba community in state of Ceará, Brazil. *Orbital*, Aratuba, v. 10, n. 2, p. 95–112, 2018.

MÜLLER, R. H; RADTKE, M; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, Berlin, v. 242, n. 1, p. 121–128, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302001801>.

NAYAK, M. G; VYAS, A. P. Parametric study and optimization of microwave assisted biodiesel synthesis from Argemone Mexicana oil using response surface methodology. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, Ahmedabad, v. 170, p.108665, 2022.

NENE, S; OTAROLA, J; MOLINA, P. G; GARRIDO, M; CORREA, N. M. Spectroscopic characterization and general features of piroxicam encapsulated in nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Córdoba, v. 616, p. 126340, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775721002090>.

NIU, S; NING, Y; LU, C; HAN, K; YU, H; ZHOU, Y. Esterification of oleic acid to produce biodiesel catalyzed by sulfonated activated carbon from bamboo. **Energy Conversion and Management**, Shenzhen, v. 163, p. 59–65, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890418301651>.

OLIVEIRA, A. L. L; COSTA, A. J. C; PASCOAL, C. V. P; BEZERRA, M. L. S; SILVA, A. C. S; SOUZA, B. V; RODRIGUES, F. E. A; RICARDO, N. M. P. S; ARRUDA, T. B. M. G. Waste of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to biodiesel production by enzymatic catalysis optimization using factorial experimental design. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Fortaleza, v. 60, n. 9, p. 3554–3560, 2021.

OZAWA, T. A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tóquio, v. 38, n. 11, p. 1881–1886, 1965.

PARTHIBAN, K. S; PANDIAN, S; SUBRAMANIAN, D. Conventional and in-situ transesterification of Annona squamosa seed oil for biodiesel production: Performance and emission analysis. **Environmental Technology and Innovation**, Tiruchirappalli, v. 23, p.101593, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186421002418>.

PASCOAL, C. V. P; OLIVEIRA, A. L. L; FIGUEIREDO, D. D; ASSUNÇÃO, J. C.C. Optimization and kinetic study of ultrasonic-mediated *in situ* transesterification for biodiesel production from the almonds of *Syagrus cearensis*. **Renewable Energy**, Maracanaú, v. 147, p. 1815–1824, 2020.

PATIL, T. S; DESHPANDE, A. S. Nanostructured lipid carriers-based drug delivery for treating various lung diseases: A State-of-the-Art Review. **International Journal of Pharmaceutics**, Shirpur, v. 547, n. 1, p. 209–225, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517318303843>

PENSADO, L. A; FERNÁNDEZ, R. J; REIMUNDE, P; CRECENTE, C. J; SÁNCHEZ, L; TORRES, A. F. Zebrafish Models for the Safety and Therapeutic Testing of Nanoparticles with a Focus on Macrophages. **Nanomaterials**, Lugo, v. 11, n. 7, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/7/1784>.

PERLIN, D. S; RAUTEMAA, R. R; ALASTRUEY, I. A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, Newark, v.17, n.12, p.383–392, 2017. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X).

POPESCU, C. Integral method to analyze the kinetics of heterogeneous reactions under non-isothermal conditions A variant on the Ozawa-Flynn-Wall method. **Thermochimica Acta**, Bucareste, v.285, n.2, 309–323, 1996. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-6031\(96\)02916-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-6031(96)02916-4).

PRABAKARAN, A; RAKSHIT, D; PATEL, I; SUSANNA, K. J; MISHRA, A; RADHAKRISHNANAND, P; SARMA, P; ALEXANDER, A. Chitosan-coated nanostructured lipid carriers for intranasal delivery of sinapic acid in A β 1–42 induced C57BL/6 mice for Alzheimer’s disease treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guwahati, v.305, p.141136, 2025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.141136>.

PUHAN, S; SARAVANAN, N; NAGARAJAN, G; VEDARAMAN, N. Effect of biodiesel unsaturated fatty acid on combustion characteristics of a DI compression ignition engine. **Biomass and Bioenergy**, Chennai, v. 34, n. 8, p. 1079–1088, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953410000838>.

RAJAMOCHAN, S; HARI, G. A; MURALIDHARAN, K. R; HUANG, Z; PARAMASIVAM, B; AYYASAMY, T; NGUYEN, X. P; LE, A. T; HOANG, A. T. Evaluation of oxidation stability and engine behaviors operated by Prosopis juliflora biodiesel/diesel fuel blends with presence of synthetic antioxidant. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, Coimbatore, v. 52, p. 102086, 2022.

RAO, S; SAMANT, P; KADAMPATTA, A; SHENOY, R. An Overview of Taguchi Method: Evolution, Concept and Interdisciplinary Applications. **International Journal of Scientific and Engineering Research**, Bombaim, v. 4, n. 10, p. 621–626, 2013.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. São Paulo, Editora Blucher, 2021.

RIBEIRO, A. P. B; MASUCHI, M. H; MIYASAKI, E. K; DOMINGUES, M. A. F; STROPPA, V. L. Z; OLIVEIRA, G. M; KIECKBUSCH, T. G. Crystallization modifiers in lipid systems. **Journal of Food Science and Technology**, Campinas, v. 52, n.7, p. 3925–3946, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1587-0>.

ROCHA, M. L; HARI, A; INAYAT, A; SHANABLEH, A; ABDALLAH, M; GHENAI, C; SHANMUGAM, S; KIKAS, T. Application of nanomaterials in anaerobic digestion processes: A new strategy towards sustainable methane production. **Biochemical Engineering Journal**, Sharjah, v.188, p.108694, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108694>.

ROCHA, J. L; PIRES, F. Q; GRATIERI, T; GELFUSO, G. M; SA, B. L. L; CUNHA, F. M. Thermal analysis applied to the development of nanostructured lipid carriers loading propranolol using quality-by-design strategies. **Thermochimica Acta**, Brasília, v. 708, p. 179143, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603121002835>.

ROSIAUX, Y; JANNIN, V; HUGHES, S; MARCHAUD, D. Solid lipid excipients —Matrix agents for sustained drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Lyon, v. 188, p. 18–30, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914003915>.

ROCÍO, M. L. C; SANTOS M. C. A. M. O Emprego da Termogravimetria para Determinar a Energia de Ativação do Processo de Combustão de Óleos Combustíveis. **Química Nova**, São Carlos, v. 29, n. 5, 2006.

SAGHATCHI, Z. M. R; HAMIDI, M. Nanoemulsions in CNS drug delivery: recent developments, impacts and challenges. **Drug Discovery Today**, Zanzan, v. 24, n. 5, p. 1104–1115, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644618302678>.

SALA, M; DIAB, R; ELAISSARI, A; FESSI, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Lyon, v. 535, n. 1, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317310268>.

SANTOS, S. B. F; PEREIRA, S. A; RODRIGUES, F. A. M; SILVA, A. C. C; ALMEIDA, R. R; SOUSA, A. C. C; FECHINE, L. M. U. D; DENARDIN, J. C; ARANEDA, F; SÁ, L. G. A. V; SILVA, C. R; NOBRE, H. V. J; RICARDO, N. M. P. S. Antibacterial activity of fluoxetine-loaded starch nanocapsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, Fortaleza, v. 164, p. 2813–2817, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020342756>.

SHAH, S; RANGARAJ, N; MEHRA, N. K; SINGH, P. K; SRIVASTAVA, S. Lipid based nanocarriers: A novel paradigm for topical antifungal therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Hyderabad, v. 62, p. 102397, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224721000770>.

SHAN, R; LU, L; SHI, Y; YUAN, H; SHI, J. Catalysts from renewable resources for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, Guangzhou, v. 178, p. 277–289, 2018.

SHARMA, S. K; VERMA, D. S; KHAN, L. U; KUMAR, S; KHAN, S. B. **Handbook of Materials Characterization**. Bathinda, Springer ed, 2018.

SIA, C. B; KANSEDO, J; TAN, Y. H; LEE, K. T. Evaluation on biodiesel cold flow properties, oxidative stability and enhancement strategies: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Miri, v. 24, p. 101514, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119309363>.

SIDDESHWARE, G; KHICHADE, V; LOKAVARAPU, B. R. Optimization of the parameters influencing the fuel efficiency of SI engine using Taguchi method. **Materials Today: Proceedings**, Chennai, v. 50, p. 2152–2159, 2022.

SILVA, M. G; GODOI, K. R. R; GIGANTE, M. L; CARDOSO, L. P; RIBEIRO, A. P. B. Nanostructured lipid carriers for delivery of free phytosterols: Effect of lipid composition and chemical interesterification on physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Campinas, v. 640, p. 128425, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775722001790>.

SINGH, N; KUMAR, K; GOYAL, A; MOHOLKAR, V. S. Ultrasound-assisted biodiesel synthesis by in-situ transesterification of microalgal biomass: Optimization and kinetic analysis. **Algal Research**, Assam, v. 61, p. 102582, 2022.

SOLEIMANIAN, Y; GOLI, S. A. H; VARSHOSAZ, J; SAHAFI, S. M. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. **Food Chemistry**, Isfahan, v. 244, p. 83–92, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617316394>.

SOULAIMANI, B; VARONI, E; IRITI, M; MEZRIOUI, N. E; HASSANI, L; ABBAD, A. Synergistic Anticandidal Effects of Six Essential Oils in Combination with Fluconazole or Amphotericin B against Four Clinically Isolated *Candida* Strains. **Antibiotics**, Marrakesh, v.10, n.9, 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091049>.

SOUSA, G. D; KISHISHITA, J; AQUINO, K. A. S; PRESGRAVE, O. A. F; LEAL, L. B; SANTANA, D. P. Biopharmaceutical Assessment and Irritation Potential of Microemulsions and Conventional Systems Containing Oil from *Syagrus cearensis* for Topical Delivery of Amphotericin B Using Alternative Methods. **AAPS PharmSciTech**, Recife, v. 18, n. 5, p. 1833–1842, 2017.

SOUSA, A. L. N; REBOUÇAS, L. M; LEMOS, F. M. F; RIBEIRO, A. C. B; CUNHA, F. E. T; PESSOA, C; SALES, S. L. A; SILVA, L. M. R; RICARDO, N. M. P. S. Nanoemulsion based on *Calotropis procera* seed oil to delivery of betulinic acid: In vitro release kinetics, in vivo toxicity and MTT assay in PC3 cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Fortaleza, v.106, p.106746, 2025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106746>.

SOUZA, C; FREITAS, L. A. P; MAIA, C. P. M. B. G. Topical Formulation Containing Beeswax-Based Nanoparticles Improved In Vivo Skin Barrier Function. **AAPS PharmSciTech**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 7, p. 2505–2516, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0737-x>.

SOUZA, M. L; ALBUQUERQUE W. S. V; SANTOS S, S. G; SALES, J. P. A; PEREIRA, V. R. A; FRANÇA, E. J; ARAÚJO R. L; ROLIM, N. P. J. Nanostructured Lipid Carriers for oral treatment of leishmaniasis: Design and preclinical evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Recife, v. 694, p. 134140, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777572401001X>.

SUN, Z; HUAI, Q; LI, D; WU, X; LI, Y; ZHENG, H. Investigation on the structure and properties of nanostructured lipid carriers loaded with different contents of phytosterols and their impact on lipid oxidation. **Food Bioscience**, Harbin, v. 62, p. 105033, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429224014639>
[direct.com/science/article/pii/S0196890418311324](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890418311324).

TAN, S. X; LIM, S; ONG, H. C; PANG, Y. L. State of the art review on development of ultrasound-assisted catalytic transesterification process for biodiesel production. **Fuel**, Kuala Lumpur, v. 235, p. 886–907, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236118313802>.

TARIQ, M; ALI, S; AHMAD, F; AHMAD, M; ZAFAR, M; KHALID, N; KHAN, M. A. Identification, FT-IR, RMN (¹H and ¹³C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil. **Fuel Processing Technology**, Islamabad, v.92, n. 3, p. 336–341, 2011.

TIEN, T. N; MOSTAPHA, M; LAM, M. K; ISHAK, S; KANNA, D. Y; LIM, J. W; TAN, I. S; LAU, S. Y; CHIN, B. L. F; HADIBARATA, T. Fundamental understanding of in-situ transesterification of microalgae biomass to biodiesel: A critical review. **Energy Conversion and Management**, Seri Iskandar, v. 270, p. 116212, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019689042200989X>

VALENTOVÁ, K; VRBA, J; BANCÍŘOVÁ, M; ULRICHOVÁ, J; KŘEN, V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, Olomouc, v. 68, p. 267–282, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691514001471>.

VARGHESE, G; SAEED, K; LU, X; RUTT, K. J. Effects of biodiesel degree of unsaturation, chain length and physical properties on tailpipe oxides of nitrogen (NO_x). **Journal of the Energy Institute**, Basildon, v. 105, p. 355–366, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743967122001623>.

VOLLI, V; PURKAIT, M. K. Physico-chemical properties and thermal degradation studies of commercial oils in nitrogen atmosphere. **Fuel**, Assam, v. 117, p. 1010–1019, 2014.

TAYLOR, J. C; DEWBERRY, L. S; TOTSCH, S. K; YESSICK, L. R; DEBERRY, J. J; WATTS, S. A; SORGE, R. E. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology and Behavior**, Birmingham, v. 174, p. 83–88, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938417300677>.

YAAKOB, Z; NARAYANAN, B. N; PADIKKAPARAMBIL, S; UNNI K; S; AKBAR, P. M. A review on the oxidation stability of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Bangi, v. 35, p. 136–153, 2014.

YESILYURT, M. K.; CESUR, C. A statistical optimization attempt by applying the Taguchi technique for the optimum transesterification process parameters in the production of biodiesel from *Papaver somniferum* L. seed oil. **Fuel**, Yozgat, v. 329, p.125406, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236122022402>.

ZEB, A; ARIF, S. T; MALIK, M; SHAH, F. A; DIN, F. U; QURESHI, O. S; LEE, E. S; LEE, G.Y; KIM, J.K. Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, Ansan, v. 49, n. 5, p. 485–517, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40005-018-00418-8>.

ZHANG, J; CHUESIANG, P; KIM, J. T; SHIN, G. H. The role of nanostructured lipid carriers and type of biopolymers on the lipid digestion and release rate of curcumin from curcumin-loaded oleogels. **Food Chemistry**, Gunsan, v. 392, p. 133306, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622012687>.

ZUBER, B; CERSOY, S; HERBIN, M; SABLIER, M; ROUCHON, V. Beeswax-rosin mixtures in historical wet collection sealants: Qualitative analysis of their composition by DSC and ATR-FTIR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Paris, v. 117, p. 103310, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203121001053>.

ZULQARNAIN, Y. M. H. M; AYOUB, M; HAMZA, N. M; ZAHID, I; AMEEN, M; ABBAS, W; SHOPARWE, N. F; ABBAS, N. **Comprehensive Review on Biodiesel Production from Palm Oil Mill Effluent**. *ChemBioEng Reviews*, Seri Iskandar, v.8, n. 5, p. 439–462, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cben.202100007>.