

FORMAÇÃO DE NANOEMULSÕES DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE ROMÃ¹

FORMATION OF OIL-IN-WATER NANOEMULSIONS CONTAINING POMEGRANATE SEED OIL

**Elvandi da Silva Junior², Gentil Barbieri Zanon Junior², Ivana Zanella³, Renata Raffin³,
Virginia Cielo³, Jussane Rossato³ e Luis Otavio Souza Bulhões^{3,4}**

RESUMO

A estabilidade de nanoemulsões depende da interação interfacial entre as suas fases imiscíveis. Para o desenvolvimento de sistemas emulsionados estáveis, é importante conhecer o valor do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) da fase oleosa. Devido à importância do óleo de semente de romã como um agente antioxidante e sua potencialidade como ingrediente para cosméticos, foi investigada a estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água, determinado o EHL do óleo utilizando medidas de tamanho de gotículas e de viscosidade. As nanoemulsões foram preparadas utilizando misturas de tensoativos variando o valor do EHL. O menor tamanho de gotas foi obtido para a nanoemulsão com 1,5% w / w de óleo de semente de romã e uma mistura de surfactantes com um HLB igual a 7,51.

Palavras-chave: viscosidade, nanoemulsões, óleo de semente de romã, EHL.

ABSTRACT

The stability of nanoemulsions depends on the interfacial interaction between its immiscible phases. For the development of stable emulsion systems it is important to know the amount of hydrophile-lipophile balance (HLB) of the oil phase. Given the importance of pomegranate seed oil as an antioxidant and its potential as an ingredient for cosmetics stability, it was investigated some nanoemulsions of oil-in-water. The determination of the EHL of the oil was made using droplet measures and viscosity. The nanoemulsions were prepared using blends of surfactants. The HLB value changed. The smallest droplet size was obtained for the nanoemulsion with 1.5% w / w of pomegranate seed oil and a mixture of surfactants with an HLB equal to 7.51.

Keywords: viscosity, nanoemulsions, pomegranate seed oil, EHL.

INTRODUÇÃO

A utilização de óleos vegetais em formulações para uso dermatológico e cosmético tem sido cada vez mais notória, pois repõe as frações lipídicas, bem como promovem a hidratação (TADROS; KESSELL, 2004). Os óleos vegetais são comumente incorporados em formulações cosméticas emulsionados, ou seja, como dispersões de duas fases líquidas imiscíveis entre si, que com um

¹ Trabalho de Mestrado - Centro Universitário Franciscano.

² Alunos do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

³ Docentes do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

⁴ Orientador - Centro Universitário Franciscano. E-mail: losbulhoes@gmail.com

tensoativo tornam-se estáveis (FERNANDEZ et al., 2004). As nanoemulsões com o diâmetro de gotículas variando entre 20 e 300 nm são mais vantajosas em relação às demais nanoemulsões por apresentarem maior estabilidade frente à cremeação e sedimentação, utilizarem baixa concentração de tensoativos, serem transparentes e fluídas e aumentarem a molhabilidade, espalhabilidade e penetração devido à baixa tensão interfacial (SOLANS et al., 2005). O uso de tensoativos é o fator responsável pela estabilidade das nanoemulsões e esses compostos anfífilos posicionam-se entre as duas fases da emulsão (aquosa e oleosa), originando uma película interfacial que estabiliza o sistema (FERNANDEZ et al., 2004). O balanço entre as duas porções moleculares com características opostas dessas substâncias é o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) (GRIFFIN, 1949).

A *Punica granatum L. Punicaceae* ou romã é uma fruta oriunda do continente asiático, com um histórico milenar do uso de suas propriedades para fins medicinais (OGUZHAN; BAYAZIT, 2012). A parte comestível e o seu suco possuem mais substâncias antioxidantes do que o suco de uva e o vinho (OGUZHAN; BAYAZIT, 2012). Os flavonoides e polifenóis presentes inibem a oxidação celular (OGUZHAN; BAYAZIT, 2012) e protegem o óxido nítrico (NO) da destruição oxidativa atuando na melhoria de suas funções biológicas (IGNARRO et al., 2006). A presença de NO inibe as doenças coronárias e a disfunção erétil, diminuindo a pressão arterial através do endotélio, fina camada de células internas dos vasos sanguíneos, que o utiliza para relaxar os músculos da parede do vaso e assim proporcionar a dilatação e o aumento do fluxo sanguíneo (IGNARRO et al., 2006). Outra função do óxido nítrico é de ser neurotransmissor entre as células nervosas (DUSSE et al., 2003). A casca e o extrato da romã possuem compostos anti-inflamatórios e anti-infecciosos, o que auxilia na prevenção e tratamento de inflamações e do câncer (NEWMAN et al., 2007).

As sementes de romã são geralmente descartadas pela indústria alimentícia e podem ser utilizadas para a extração do seu óleo (GOULA; ADAMOPOULOS, 2012).

Devido às propriedades descritas acima, o óleo de semente de romã é um composto com potencial para o uso na indústria de cosméticos como hidratante e/ou antioxidante, o que motiva a determinação do EHL que é desconhecido para esse óleo, que é uma propriedade importante para a estabilização de suas nanoemulsões. O EHL pode ser determinado a partir da preparação de nanoemulsões, medindo o tamanho das gotículas e a viscosidade da dispersão, contendo as nano gotículas. O objetivo deste trabalho foi o de obter o EHL para o óleo de semente de romã pela análise das medidas de viscosidade e do tamanho das gotículas.

METODOLOGIA

REAGENTES

Foram utilizados, sem qualquer purificação adicional, os seguintes produtos químicos: água tratada pelo processo de osmose reversa, óleo de semente de romã (De Wit Speciality Oils - distribuído

pela Viafarma - SP). A densidade do óleo de semente de romã a 25 °C é da ordem de 0,873 g cm⁻³. Como tensoativos, foram utilizados o monooleato de sorbitano (Span 80, EHL = 4,7) e o polissorbato 80 (Tween 80, EHL = 15). Com o objetivo de manter a estabilidade microbiológica das nanoemulsões por um grande período, necessário para a realização dos testes de estabilidade sem colocá-las sob refrigeração, foram incluídos nas formulações dois conservantes: o metilparabeno e propilparabeno, ambos com 0,15 % m/m.

PREPARO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação por inversão de fases (EIF), conforme a metodologia descrita na literatura (FERNANDEZ et al., 2004). O EHL do óleo de semente de romã foi determinado a partir de cinco nanoemulsões preparadas com 1,5 % m/m de óleo e com uma mistura de tensoativos variando o EHL.

O EHL do óleo foi associado com o EHL requerido da mistura de tensoativos que resultaram nas nanoemulsões com gotículas com o menor diâmetro e o menor valor da viscosidade da dispersão (SCHMIDTS et al., 2010). Foi utilizada uma mistura de tensoativos Span 80 e Tween 80 a diversas proporções descritas na tabela 1. A quantidade total de tensoativos foi mantida em 5,0% m/m. A mistura de tensoativos foi solubilizada na fase oleosa e os conservantes, o metilparabeno e o propilparabeno, foram solubilizados na fase aquosa. As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente à temperatura de 75±1°C, em um banho termostaticado Nova Ética, em seguida a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a oleosa sob agitação variável de 2.000 a 10.000 rpm com o auxílio de um homogenizador Ultra Turrax T50 da IKA até o resfriamento a temperatura ambiente (25±5°C). Durante o resfriamento, foi mantida por 5 min a agitação de 10000 rpm e posteriormente mantida a 2000 rpm.

As nanoemulsões foram obtidas em triplicata, produzindo 150mL de cada solução, com a concentração de óleo fixa em 1,5% m/m. A quantidade de tensoativos foi mantida constante em 5,0 %, porém variando sua composição para obter os diferentes valores de EHL de 6,44 até 10,72, conforme a tabela 1. Para o cálculo das quantidades de tensoativo hidrofílico o Tween 80 e do tensoativo lipofílico, o Span 80 necessários para a obtenção de cada valor do EHL da nanoemulsão, foi utilizada a equação (1).

$$EHL_{\text{final}} = (EHL_A \times 0,01 \times A + EHL_B \times 0,01 \times B) \quad (1)$$

onde EHL_{final} é o valor de EHL resultante das misturas de tensoativos, A é a porcentagem do tensoativo hidrofílico e B a porcentagem do tensoativo lipofílico. Onde A+ B=100, EHL_A e EHL_B correspondem ao EHL do Tween 80 e Span 80 respectivamente.

Na tabela 1, estão descritas as composições das nanoemulsões preparadas com óleo de semente de romã.

Tabela 1 - Composição das nanoemulsões do tipo o/a preparadas com o óleo de semente de romã.

Nanoemulsões AMOSTRAS	óleo % m/m	Span80 % m/m	Tween 80 % m/m	EHL	água % m/m
1	1,5	4,0	1,0	6,44	93,5
2	1,5	3,5	1,5	7,51	93,5
3	1,5	3,0	2,0	8,58	93,5
4	1,5	2,5	2,5	9,65	93,5
5	1,5	2,0	3,0	10,72	93,5

AVALIAÇÃO DO PH

Para as medidas de pH, foi utilizado um pHmetro digital de bancada Hanna modelo HI 223, equipado com um eletrodo de vidro combinado. O sistema foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. As amostras foram analisadas à temperatura de $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com imersão direta do eletrodo na amostra que foi diluída em água na proporção de 1:10 (nanoemulsão:água).

MEDIDAS DE DENSIDADE E VISCOSIDADE

As densidades das nanoemulsões foram determinadas utilizando-se um picnômetro limpo, seco cuja massa foi determinada previamente. A massa do volume de água purificada e com a temperatura ajustada para 25°C , utilizada no preenchimento total do picnômetro também foi determinada. Esta operação permitiu calibrar com exatidão o volume do picnômetro. Para as medidas de densidades das nanoemulsões, o picnômetro foi preenchido com a nanoemulsão a ser caracterizada com a temperatura do sistema ajustada para 25°C , eliminando o excesso de solução. Foi medida a massa do picnômetro obtendo-se a massa da nanoemulsão subtraindo-se da massa total, o valor da tara do picnômetro. A densidade da emulsão foi obtida pelo cálculo da razão entre a massa e o volume do picnômetro.

Para as medidas das viscosidades, utilizou-se um micro viscosímetro AMVn da Anton Paar. As medidas foram realizadas a 25°C . O viscosímetro mede a viscosidade pelo tempo de deslocamento de uma microesfera em um tubo capilar contendo a nanoemulsão. A viscosidade é calculada utilizando a equação (2).

$$\eta = K d t \quad (2)$$

onde η é a viscosidade em cP, K a constante do viscosímetro, d a densidade da nanoemulsão e t o tempo de escoamento em s. Os valores apresentados são a média de três medidas independentes.

MEDIDAS E TAMANHO, POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE

O diâmetro das partículas, índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta (ζ) foram medidos utilizando o sistema da Malvern Zetasizer NanoZS.

Todas as medidas foram obtidas em triplicata e os valores apresentados são os valores médios.

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES

A avaliação da estabilidade das amostras foi realizada com o auxílio de uma centrífuga refrigerada da Nova Técnica modelo 815. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm, equivalente a 863 g durante 30 min a 25 °C. Após a centrifugação as amostras eram colocadas em repouso durante 30 min e era feita a avaliação. Também foram realizadas medidas de tamanho médio após 30, 45 e 90 dias, que pode ser um teste efetivo para avaliar a estabilidade das nanoemulsões.

Todas as medidas experimentais foram realizadas em triplicata e os resultados experimentais são os valores médios das medidas com os respectivos desvio padrão. A variação em todos os dados experimentais foi menor do que 3%.

RESULTADOS

Não foram observadas qualquer separação de fase nas cinco amostras após o teste na centrífuga durante 30 min, o que indica que as emulsões recém-preparadas com 1,5% m:m de óleo são estáveis, independente da quantidade de tensoativos.

O pH das nanoemulsões foi 6,5 para todas as dispersões. Este resultado indica que as gotículas de óleo estão estabilizadas, pois o pH é o do componente majoritário na nanoemulsão a água, uma vez que o óleo tem pH menor que 6, devido a presença de ácidos graxos.

As densidades das nanoemulsões, medidas a 25 °C estão apresentadas na tabela 2 onde os valores são próximos do componente majoritário, a água.

Os valores da viscosidade variaram com o EHL da mistura de tensoativos e estão apresentados na tabela 2, e, na figura 1, pode ser observado um valor mínimo para EHL igual a 7,5. O decréscimo da viscosidade com a variação do EHL pode ser associado, segundo o modelo de Einstein (DUAN, et al., 2011), a diminuição do tamanho da gotícula da nanoemulsão. A presença de um filme de tensoativos na interface óleo/água decresce a tensão interfacial, diminuindo o tamanho da gotícula quando o EHL da mistura de tensoativos está próximo ao EHL do óleo.

As medidas de diâmetro médio das partículas (d), ξ e IPD são apresentadas na tabela 2. Observa-se, na figura 2, que o mínimo de tamanho coincide com o mínimo de viscosidade e representa o valor de EHL próximo ao do óleo de semente de romã. Observa-se, nos resultados, uma concordância entre os dados de tamanho e a viscosidade devido a correlação entre aumento da viscosidade e o tamanho de gotículas. Os valores do IPD estão próximos de 0,2 indicando uma distribuição monomodal e estreita de tamanho de gotículas (IZQUIERDO et al., 2005).

Tabela 2 - Caracterização das nanoemulsões o/a preparadas segundo a tabela 1.

Amostra	d/ g cm ⁻³	h/ cP	d/ nm	IPD	-ξ/ mV
1	1,001	1,70±0,04	298,0±1,32	0,21	15,2±0,4
2	1,001	1,43±0,03	211,0±1,14	0,22	18,5±0,4
3	1,002	1,51±0,03	271,7±1,62	0,22	15,0±0,3
4	1,004	1,67±0,04	295,3±2,21	0,25	10,0±0,3
5	0,995	1,63±0,04	309,0±2,51	0,18	12,2±0,4

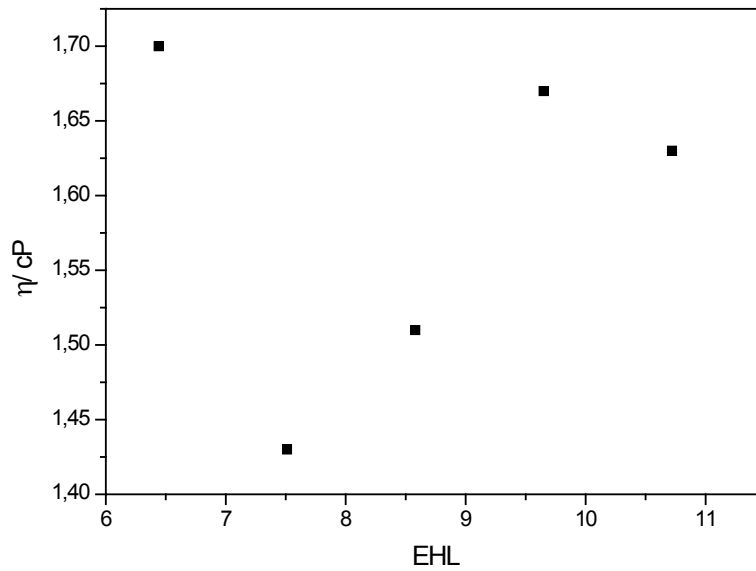


Figura 1 - Viscosidade das nanoemulsões o/a de óleo de semente de romã a diferentes valores de EHL a 25 °C.

O valor de ξ foi mais negativo para a menor partícula, ficando em torno de -18 mV, característico de nanoemulsões do tipo o/a.

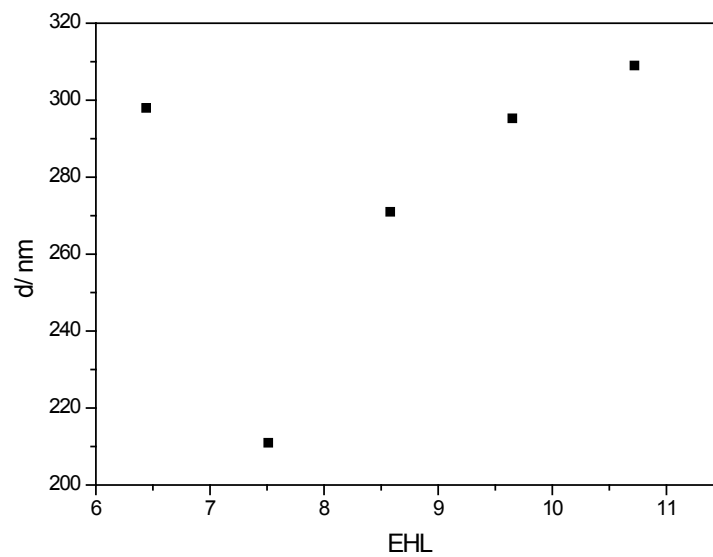


Figura 2 - Diâmetro médio das gotículas da emulsão de óleo de semente de romã em função do EHL.

O controle do pH é um parâmetro fundamental para determinar a estabilidade das nanoemulsões, porque variações do pH indicam a ocorrência de reações que degradam o óleo. As emulsões preparadas com óleos vegetais podem exibir um decréscimo do pH devido a hidrólise dos ésteres de ácidos graxos em ácidos graxos livres que é o produto majoritário de degradação (MASMOUDI et al., 2005). As nanoemulsões com óleo de semente de romã exibiram valores de pH estáveis até 90 dias.

Outro indicador da estabilidade das nanoemulsões é a variação do tamanho das nanoemulsões com o tempo. Os resultados dessa análise estão na tabela 3.

Tabela 3 - Variação do tamanho das gotículas das nanoemulsões o/a o tempo.

Amostra	d/ nm (t=0)	d/ nm (t=30 dias)	d/ nm (t=45 dias)	d/ nm (t=60 dias)	d/ nm (t=90 dias)
1	298,0±1,32	298,2±1,37	298,6±1,41	298,6±1,41	298,6±0,27
2	211,0±1,14	210,7±1,02	211,5±1,24	211,6±0,98	211,6±1,17
3	271,7±1,62	272,4±1,24	273,1±1,44	275,5±1,38	277,6±1,73
4	295,3±2,21	295,8±1,74	298,9±1,44	299,0±1,50	295,3±2,23
5	309,0±2,51	318,6±1,92	326,6±1,29	352,3±1,43	368,6±1,81

Na tabela 3, é possível observar que a nanoemulsão da amostra 2, preparada com EHL 7,51, não apresenta aumento de diâmetro. A nanoemulsão 5, preparada com EHL 10,72, aumenta o diâmetro médio cerca de 20%. Este aumento pode ser atribuído a instabilidade do filme de tensoativos que propicia a difusão do óleo das gotículas menores para as maiores pelo efeito conhecido como *Ostwald ripening* (TAYLOR, 1995).

CONCLUSÕES

Foi possível preparar sistemas nanoestruturados na forma de nanoemulsões com óleo de semente de romã. Foram obtidas nanoemulsões estáveis contendo 1,5 % m/m de óleo de semente de romã e 5% m/m de uma mistura de tensoativos variando o EHL .

O tamanho mínimo obtido para as gotículas de óleo foi de 211 nm para a emulsão com 1,5 % m/m de óleo de semente de romã e 5% m/m da mistura de tensoativos com EHL igual a 7,51. Este valor pode ser associado ao valor do EHL do óleo e é o primeiro resultado reportado na literatura. A associação das medidas de tamanho de gotículas e da viscosidade mostrou ser uma ferramenta precisa para determinar o EHL de óleos. As nanoemulsões são estáveis por um período de 90 dias, onde a nanoemulsão preparada com EHL igual a 7,51 não apresentou alteração de tamanho indicando que este EHL é o adequado a esse óleo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- DUAN, F.; KWEK, D.; CRIVOI, A. Viscosity affected by nanoparticles aggregation in Al₂O₃ - water nanofluids. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 6, p. 248-252, 2011.
- DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre Óxido Nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 4. p. 343-350, 2003.
- FERNANDEZ, P. et al. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n. 251, p. 53-58, 2004.
- GOULA, M.; ADAMOPOULOS, K.G. **A method for pomegranate seed application in food industries**: Seed oil encapsulation, food and bioproducts processing. n. 90, p. 639-652, 2012.
- GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-active agents by HLB. **J. of Society of Cosmetic Chemists**, n. 1, p. 311-326, 1949.
- IGNARRO, L. J. et al. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. **Nitric Oxide**, n. 15, p. 93-102, 2006.
- IZQUIERDO P. et al. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 285, p. 388-394, 2005.
- MASMOUDI, H. et al. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR , **Int. J. of Pharm.**, n. 289, p. 117-131, 2005.
- NEWMAN, R. A.; LANSKY, E. P.; BLOCK, M. L. *The Ultimate Health Food*, New York, Basic Health Publications, Inc., Aug 15, 2007.
- OGUZHAN, C., BAYAZIT, S., Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkis pomegranates, **Scientia Horticulturae**, n. 147, p. 81-88, 2012.
- SCHMIDTS, T. et al. Multiple W/O/W emulsions - using the required HLB for emulsifier evaluation, **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, n. 372, p. 48-54, 2010.
- SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opnion in Colloid & Interface Science**, n. 10, p. 102-110, 2005.
- TADROS, T.; KESSELL, L. Stabilizing nanodispersions in personal care and cosmetic applications, **Cosmetics and Toiletries**, n. 119, p. 41-46, 2004.
- TAYLOR, P., Ostwald ripening in emulsions. **Colloids and Surfaces .A: Physicochem. Eng. Aspects**, n. 99, p. 175-185, 1995.