

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES ESTÁVEIS DE DIFERENTES FASES OLEOSAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Larissa Sousa Cardeal de Miranda<sup>1</sup>; Danielle Devequi Gomes Nunes<sup>2</sup>; Larissa Moraes dos Santos Fonseca<sup>3</sup>; Fabricia Oliveira Oliveira<sup>4</sup>; Katharine Valéria Saraiva Hodel<sup>5</sup>; Gabriele de Abreu Barreto<sup>6</sup>; Bruna Aparecida Souza Machado<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Bolsista; Iniciação científica – PIBIC; lariissacardeal@gmail.com

<sup>2</sup> Mestre em Patologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; danielle.nunes@fbter.org.br

<sup>3</sup> Mestre em Microbiologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; larissa.fonseca@fbter.org.br

<sup>4</sup> Mestre em Biotecnologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; fabricia.oliveira@fbter.org.br

<sup>5</sup> Mestranda em Farmácia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; katharine.hodel@fbter.org.br

<sup>6</sup> Mestre em Alimentos; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; gabriele.barreto@fieb.org.br

<sup>7</sup> Doutora em Biotecnologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fieb.org.br

## RESUMO

As emulsões estáveis são compostas por dois líquidos imiscíveis como água e óleo, estabilizados um surfactante adequado e co-surfactante para formar uma fase única, podendo ser do tipo óleo em água ou do tipo água em óleo. Assim, o objetivo deste projeto foi desenvolver nanoemulsões estáveis com diferentes composições e caracterizá-las quanto a sua estabilidade, medindo o pH, tamanho de partícula e índice de polidispersão. As nanoemulsões foram produzidas através da técnica de microfluidização. Foram utilizados diferentes óleos, óleo de abacate e oliva, encapsulando o princípio ativo, ácido p-cumárico. A formulação NE1 composta por óleo de abacate, demonstrou maior estabilidade em comparação às demais formulações avaliadas em relação ao diâmetro de partículas tendo a faixa de 110 a 125 nm, ao índice de polidispersão entre 0,04 - 0,16 e pH na faixa de 5 - 6, indicando melhores resultados em estabilidade para possível incorporação em adjuvantes e utilização em vacinas.

**PALAVRAS-CHAVE:** nanoemulsão; ácido p-cumárico; óleo de Abacate; óleo de oliva.

## 1. INTRODUÇÃO

As nanoemulsões são sistemas bifásicos, de dois líquidos imiscíveis nos quais a parte oleosa na presença de um surfactante é dispersa em outra fase, a aquosa.<sup>1</sup> As nanoemulsões do tipo O/A, são aquelas que possuem núcleo oleoso e oferecem várias vantagens em relação a outras formulações, tais como: aumento da taxa de absorção ou permeação dos fármacos e redução da variabilidade na absorção, proteção contra oxidação e hidrólise das nanoemulsões, aumento da eficácia dos sistemas de administração e redução da dose total e efeitos colaterais, além de serem os sistemas mais indicados para o carreamento de fármacos hidrofílicos e lipofílicos simultaneamente.<sup>2</sup> Os óleos que compõem a fase oleosa das nanoemulsões, possuem uma função importante de permitir a solubilização de fármacos lipofílicos, além de ajudar a manter a integridade das emulsões.<sup>3</sup> Fármacos hidrofílicos podem ser encapsulados e transportados na fase aquosa das nanoemulsões, assim como fármacos lipofílicos na fase oleosa. O emprego de óleos vegetais como parte lipídica das nanoemulsões, podem agregar possíveis vantagens, uma vez que os óleos possuem atividade antioxidante, que podem contribuir no processo de proteção contra os radicais livres.<sup>4</sup>

A técnica de microfluidização, utiliza altas pressões que influenciam na energia de ruptura das partículas, e tem se mostrado eficiente na formação de nanoemulsões, produzindo nanopartículas de alta energia, como resultado de forças de ruptura, as quais diminuem o diâmetro das nanoemulsões, produzindo gotículas com tamanho reduzido e uniforme.<sup>5</sup> O ácido p-cumárico, isolado da própolis vermelha, é um composto bioativo importante, com propriedades já descritas na literatura, como: atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana. É da classe dos compostos fenólicos e tem sido bem avaliado em diversas áreas, tendo uma segurança e eficácia comprovadas.<sup>6</sup>

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade de nanoemulsões, constituídas de diferentes óleos (abacate e oliva), encapsulando um princípio ativo, o ácido p-cumárico. Com isso, as formulações desenvolvidas foram avaliadas em função do tamanho de partícula, Índice de polidispersão (PDI) e pH.

## 2. METODOLOGIA

Todas as formulações foram elaboradas misturando-se uma fase aquosa tamponada e uma fase oleosa. A fase aquosa tamponada foi preparada com fosfato de amônio, Poloxamer 188, glicerol e água ultrapura. A fase oleosa foi preparada com a fosfatidilcolina de soja e o ácido p-cumárico de acordo com a Tabela 1. A fase oleosa foi sonicada num banho de água sonora a ~ 60 °C por 30 min. Por fim, utilizando um Homogeneizador (OMNI – modelo GLH850) a 10.000 rpm por 15 minutos, combinou-se a fase aquosa tamponada a 90% (v/v) com a fase oleosa. Em seguida, a mistura foi submetida a homogeneização a alta pressão em um microfluidizador (Microfluidics M110-EH Newton, MA) por 10 passagens a ~ 30.000 psi. Por fim, as formulações obtidas foram filtradas com o filtro de seringa 0,22 µm (filtro PVDF Millipore®).

**Tabela 1.** Identificação das nanoemulsões (NE)

Formulação	Óleo	Princípio Ativo (PA)	Fosfatidilcolina (PC)
NE 1	Abacate	Ácido p-cumárico	SOJA
NE 2	Oliva		
NE 3	Abacate		
NE 4	Oliva		

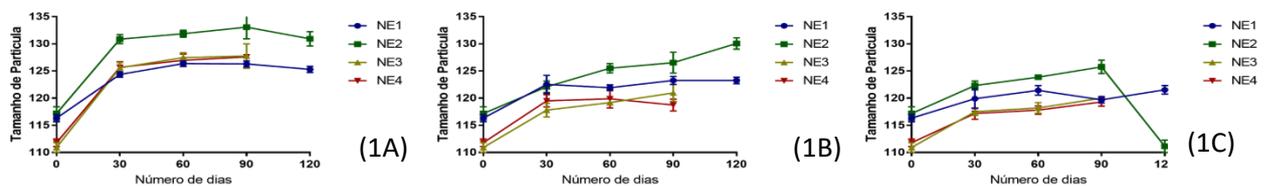
As nanoemulsões foram armazenadas nas temperaturas de 4° C, 25°C, 40°C e depois analisada em triplicata nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 em relação ao tamanho de partícula, PDI e pH. Estes parâmetros foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS). O pH foi obtido pela análise com o pHmetro.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As partículas podem sofrer diversas alterações que podem ser físicas, químicas e/ou biológicas. Fisicamente, elas podem sofrer agregação, fusão ou ruptura e essas ações dependem da constituição lipídica (a exemplo do óleo utilizado), bem como do meio envolvente.<sup>7</sup> Para avaliar essas alterações, as 4 nanoemulsões produzidas foram analisadas quanto às suas estabilidades pelo período de 120 dias quanto ao tamanho de partícula, PDI, pH e análise visual (dados não mostrados) a cada 30 dias, nas diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 40 °C), de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

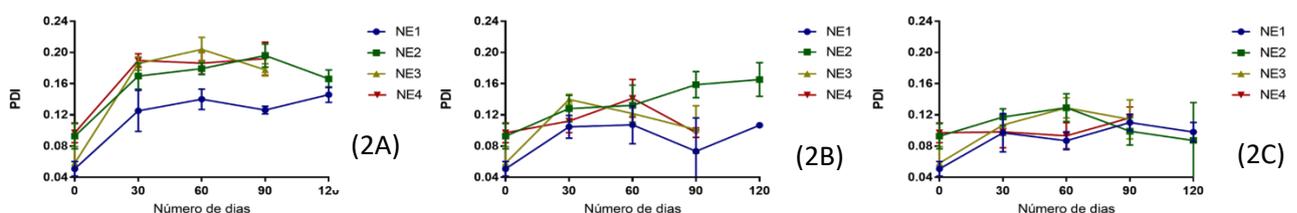
Sabe-se, que nanoemulsões contendo os menores diâmetros (100-200 nm) evitam a agregação de partículas, que podem causar os fenômenos de floculação e coalescência. Nanoemulsões menores tendem a ser cineticamente mais estáveis.<sup>8</sup> A Figura 1, demonstra os resultados obtidos em relação ao diâmetro médio (d.m) das partículas das nanoemulsões, que em geral, apresentaram aumento de seus diâmetros com o passar do tempo, especialmente nos primeiros 30 dias, nas três temperaturas avaliadas. Os tamanhos de partículas das formulações avaliadas, apresentaram em média um tamanho de partícula entre 110 e 135 nm. A formulação NE1 aparentou ser a formulação mais estável. A temperatura de 4°C apresentou menores variações, sendo considerada a temperatura mais adequada.

**Figura 1.** Distribuição média dos tamanhos de partículas das nanoemulsões durante o período de estabilidade a temperatura 4° C (1A), 25° (1B) e 40° C (1C).



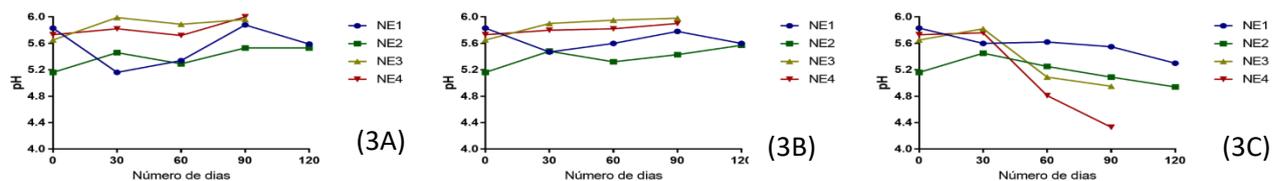
Segundo Gaumet et al. (2008)<sup>9</sup> o índice de polidispersão indica a distribuição de tamanho da partícula, um bom índice de polidispersão é aquele que apresenta valor inferior a 0,2 indicando partículas com elevada homogeneidade, um índice elevado sugere uma ampla distribuição do tamanho ou mesmo a existência de várias populações. Os índices de polidispersão (Figura 2) encontrados, apresentaram resultados inferiores a 0,2, uma média de 0,04 a 0,22, o que indica uma elevada homogeneidade dos tamanhos de partículas. Somente a formulação NE3 no dia 60, na temperatura de 4 °C obteve resultado superior a faixa. A formulação NE1, apresentou os melhores resultados em todas as temperaturas tendo uma faixa de 0,04 - 0,16.

**Figura 2.** Índice de polidispersão médio das nanoemulsões durante o período de estabilidade a temperatura 4° C (2A), 25° (2B) e 40° C (2C).



A determinação do pH da formulação é um dos indicativos de estabilidade do sistema, pois a sua redução pode apontar a presença de ácidos graxos livres provenientes de hidrólise do tensoativo.<sup>10</sup> Os pHs encontrados nas formulações armazenadas na temperatura de 4 °C e 25 °C (Figura 3) obtiveram resultados próximos ao pH da fase aquosa de pH 5,7 entre os pHs 5 e 6. Com o aumento da temperatura pode-se ocorrer a separação de fases do sistema, acarretando na redução do pH. Assim, na temperatura de 40°C houve uma alta redução, podendo apontar a presença de ácidos graxos

**Figura 3.** Valores de pH das nanoemulsões durante o período de estabilidade a temperatura 4° C (3A), 25° (3B) e 40° C (3C).



A formulação NE1 contendo ácido p-cumárico e óleo de abacate, se mostrou a melhor formulação, apresentando resultados em relação ao diâmetro de partículas média de 110 nm a 125 nm; índice de polidispersão, entre 0,04 - 0,16; e pH na faixa de 5 – 6. Demonstrando ser a formulação com melhor estabilidade em comparação com as demais apresentando bons resultados nos parâmetros avaliados.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formulações, apresentaram boa estabilidade nos parâmetros avaliados, para todas as temperaturas utilizadas. A formulação NE1, constituída por óleo de abacate e ácido p-cumárico apresentou valores de diâmetros de partículas e índice de polidispersão de acordo com o encontrado na literatura, se comportando de maneira mais uniforme no decorrer dos 120 dias. O diâmetro médio de suas partículas não foi maior que 125 nm, concluindo que a formulação NE1 obteve melhores diâmetros de gotículas em relação às estudadas. Pode-se perceber também que as formulações com princípio ativo acarretaram em formulações mais estáveis e uniformes do que as formulações sem o ácido p-cumárico. Além disso, observou-se a sensibilidade das nanoemulsões a temperaturas críticas, 40 °C, ocorrendo uma tendência do sistema a escurecer e leve separação da fase oleosa da fase aquosa, o óleo de abacate por enquanto forneceu a formação de nanoemulsões com diâmetros de partículas estáveis. Além disso, pretende-se avaliar o comportamento antioxidante, antibacteriano e antitumoral da nanoemulsão com melhor desempenho e estabilidade.

### Agradecimentos

O autor agradece ao SENAI CIMATEC pela estrutura laboratorial e a FAPESB pelo apoio a pesquisa.

### 5. REFERÊNCIAS

- SINGH, Yuvraj et al. Nanoemulsão: Conceitos, desenvolvimento e aplicações na administração de medicamentos. *Jornal de liberação controlada*, v. 252, p. 28-49, 2017.
- GURPREET, K.; SINGH, S.K. Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 80, n. 5, p. 781-789, jul. 2018.
- KALE, S. N., DEORE, S. L. - Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 8,1 (2017) 39-47.
- ALI, A., ANSARI, V. A., AHMAD, U., AKHTAR, J., JAHAN, A. - Nanoemulsion: an advanced vehicle for efficient drug delivery. *Drug Research*. (2017).
- LOREVICE, Marcos Vinicius et al. Nanoemulsões de óleos essenciais: mecanismos de estabilidade e interação com pectina em bionanocompósitos para aplicação em embalagens ativas. 2019.
- RAMOS, Wagner Soares. Estudo de segurança e eficácia in vitro do ácido p-Cumárico e sua incorporação em emulsão cosmética óleo em água (O/A). 2019
- HARWANSH, R.K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, Md. A. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 51, p. 224-233, mar. 2019.
- MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.
- ALVES, Marta Palma. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro. 2006
- GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.
- BRUXEL, F. et al. Nanoemulsions as parenteral drug delivery systems. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.