UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

KAREN CRISTINE SANTOS GALVÃO

**Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos
e uso tópico**

Pirassununga

2015

KAREN CRISTINE SANTOS GALVÃO

**Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos
e uso tópico**

“Versão Corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral
Sobral

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

G182d Galvão, Karen Cristine Santos
Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos
e uso tópico / Karen Cristine Santos Galvão. --
Pirassununga, 2015.
213 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral.

1. Nanoemulsões 2. Estabilidade 3. Antioxidante
4. Antimicrobiano 5. Homogeneização de alta pressão.
I. Título.

Trabalho realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil e no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal no âmbito do programa Ciências sem Fronteiras – Doutorado Sanduíche.

Apoio Financeiro

Ciência Sem Fronteiras, Capes, FAPESP Projeto CEPID-
Forc (13/07914-8)

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus amados pais, *Aparecida* e *Laerte*, ao amor incondicional e suporte incomensurável, pelas oportunidades e a força necessária para seguir em frente, por todos os momentos em que o amor deles me fez ver que tudo vale à pena.

Agradecimentos

Acima de tudo, gostaria de agradecer a Deus pela vida, pelas oportunidades e pela chance de ter sonhos e realizá-los, agradeço por cada adversidade que me ajudou a me fortalecer, por cada momento de “insight”, por perceber como Ele é maravilhoso e que nada é impossível quando sentimos Sua presença tão viva em nossos corações, Pai eu te agradeço por ter chegado até aqui e por todos os caminhos que ainda virão...

À Universidade de São Paulo e Universidade do Minho – Portugal pelo apoio financeiro e estrutura física.

Ao programa Ciências Sem Fronteiras e a Capes pela bolsa de estudos.

Aos meus pais, que mesmo nas piores tempestades me ajudaram a progredir, fizeram com que seu amor ultrapassasse as barreiras da distância, que mesmo em outro continente eu me sentisse beijada e abraçada todos os dias.

Agradeço ao meu orientador Prof. Paulo José do Amaral Sobral por ter aceitado me conduzir neste percurso, por todos os momentos de paciência e compreensão, pelas críticas que me ajudaram a crescer profissionalmente e pelas oportunidades únicas que me proporcionou na vida acadêmica e por sua amizade, obrigada.

Ao Prof. António Vicente por fazer com que eu me sentisse acolhida na amada terrinha lusitana, que levarei sempre em meu coração, à sua amizade e humildade únicas que levarei sempre como exemplos.

À Profa. Nádia Bou-Chacra, não apenas pelo empréstimo do homogeneizador e sua estrutura física, mas, pela doação de seu tempo e carinho em todos os momentos em que estive em seu laboratório, pela ética e gentileza, amizade e exemplo de ser humano, que fizeram com que eu me sentisse acolhida, mesmo tendo que me deslocar a todo o momento pela estressante São Paulo, agradeço a ela e seu marido Orlando por me levarem em segurança ao alojamento todos os fins de semana em que estive na cidade universitária e por todo cuidado e sensação de família.

À professora Izabel Cristina Freitas Moraes pelas análises reológicas.

Aos funcionários do LTA Ana Mônica e Rodrigo e aos técnicos dos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos pelos momentos compartilhados e aos meus colegas do Laboratório de Instalações Piloto que me integraram ao grupo desde o momento da minha chegada em Braga.

Aos professores da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, em especial, ao Prof. Edison e à Profa. Andrezza por terem aceitado me supervisionar no estágio de docência.

À minha ex-orientadora, amiga e segunda mãe Silvana por continuar a fazer parte da minha vida e me apoiar sempre.

À Hamyne pela revisão do Abstract e por sua amizade.

Ao Wallison pela ajuda com as análises antioxidantes.

À Sílvia Seraphin pela amizade e apoio com as análises microbiológicas.

À Roberta Yoneko por ter sido minha estagiária e amiga.

Aos meus amigos pela compreensão e amizade em todos os momentos.

A todos aqueles que encontrei pelo caminho e que me estenderam a mão em algum momento ou me ofereceram um sorriso sincero, o meu muito obrigada !

“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver a vida, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz não é uma fatalidade do destino, mas, uma conquista de quem sabe viajar para dentro do seu próprio ser. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas, ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida”

Augusto Cury

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Nemo Nox

Resumo

Galvão, K. C. S. **Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos e uso tópico**. 2015. 213f. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O uso de princípios ativos a base de plantas em alimentos pode ser interessante devido à sua atividade (ex.: antioxidante, antimicrobiana, dentre outros), entretanto, alguns desses aditivos são hidrofóbicos, sendo, portanto, de difícil dispersão na formulação do alimento, que é geralmente rico em água. Do mesmo modo, a diminuição da concentração utilizada de antisépticos é um desafio atual. Uma alternativa é a utilização desses princípios ativos na forma de nanoemulsões com baixas concentrações de princípios ativos. O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de nanoemulsões a base de eugenol e extrato de pimenta dedo-de-moça para uso em alimentos, e a base de triclosan, para uso tópico, como alternativa para higienização de mãos de manipuladores de alimentos. O desenvolvimento das nanoemulsões foi realizado com o auxílio de um homogeneizador de alta velocidade seguido de um homogeneizador de alta pressão. Foram estudados os seguintes parâmetros, em vários experimentos: tipo e concentração de tensoativos, valor ideal de HLB, relação fase lipídica/fase aquosa, relação tensoativo/óleo, e composição e processo. As nanoemulsões foram otimizadas por desenho experimental, avaliadas quanto à estabilidade por estresse térmico e força centrífuga e estabilidade ao armazenamento por 90 dias, caracterizadas por diferentes análises, incluindo a determinação do potencial antioxidante e antibacteriano. Foram desenvolvidas nanoemulsões com tamanho médio de gota menor que 200 nm, sendo que, a estabilidade frente ao estresse térmico e força centrífuga variaram para cada sistema, mas, todas nanoemulsões foram estáveis pelo período de 90 dias em temperatura ambiente. A nanoemulsão de eugenol demonstrou bom potencial antioxidante e a nanoemulsão de triclosan demonstrou alta atividade bacteriostática na concentração de 3% e atividade bactericida em concentração menor que 40µg/mL pelo período de 90 dias. As nanoemulsões desenvolvidas têm potencial de aplicação nas indústrias de alimentos e sanitária.

Palavras-chaves: nanoemulsões, estabilidade, antioxidante, antimicrobiano, homogeneização de alta pressão.

Abstract

Galvão, K. C. S. **Development of nanoemulsions for food and topical applications.** 2015. 213p. PHD Thesis. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The utilization of plant bioactives in food can be interesting because of its activity (eg.: antioxidant, antimicrobial, among others) and to minimize the use of their high concentration of antiseptics. However, some of these additives are hydrophobic, and, therefore, are more difficult to be dispersed in food, which are generally water-based. A good alternative is the use of low concentration of these actives as nanoemulsions. The aim of this thesis was the development of nanoemulsions with eugenol, “dedo-de-moça” pepper extract for food applications, and of triclosan for topical application as hand’s cleaner. The studies for development of these nanoemulsions were carried out with a high speed homogenizer followed by a high pressure homogenizer. The following parameters were tested: type and concentration of surfactants, ideal HLB value, lipid phase/aqueous phase relation, surfactant/oil relation, and composition and processing conditions. Nanoemulsions were optimized by experimental design, evaluated by preliminary and storage stability, characterized by different analysis, including antioxidant and antimicrobial activities. Nanoemulsions with mean droplet size lower than 200 nm were developed; the thermal stress and centrifuge stabilities were different for each system, but, all nanoemulsions were stable over 90 days on ambient temperature. The eugenol nanoemulsion had good antioxidant activity and triclosan nanoemulsion had high antimicrobial activity in the concentration of 3% and a bactericidal activity at concentration lower than 40µg/mL over 90 days period. The nanoemulsions developed have potential for applications in food and sanitary industries.

Key-words: nanoemulsions, stability, antioxidant, antimicrobial, high pressure homogenization.

Lista de Figuras

Figura 1: Diferença entre microemulsão e nanoemulsão.	25
Figura 2: Áreas de aplicação de nanoemulsões	27
Figura 3: Esquemas de funcionamento de equipamentos utilizados para emulsificação por métodos de alta energia.	29
Figura 4: Configurações básicas do homogeneizador de alta pressão NanoDeBEE®	32
Figura 5: Comparação entre os métodos de alta energia usuais e a tecnologia patenteada BEE Systems.	33
Figura 6: Mecanismos de instabilidade em emulsões	34
Figura 7: Representação de maturação de Ostwald	35
Figura 8: Pimenta dedo-de-moça.	40
Figura 9: Estrutura molecular da capsaicina.	41
Figura 10: Estrutura molecular do eugenol.	43
Figura 11: Estrutura molecular do triclosan.	47
Figura 12: Fluxograma de processo de produção das nanoemulsões	53, 54 e 55
Figura 13: Estrutura molecular do tensoativo Tween 20®.	57
Figura 14: Estrutura molecular do tensoativo Tween 40®.	58
Figura 15: Estrutura molecular do tensoativo Tween 60®.	58
Figura 16: Estrutura molecular do tensoativo Tween 80®.	59
Figura 17: Estrutura molecular do tensoativo Span 20®.	60
Figura 18: Estrutura molecular do tensoativo Span 40®.	60
Figura 19: Estrutura molecular do tensoativo Span 60®.	61
Figura 20: Estrutura molecular do tensoativo Span 80®.	61
Figura 21: Estrutura molecular de PEG.	62
Figura 22: Estrutura molecular de glicerol.	62
Figura 23: Estrutura molecular do radical DPPH•.	63
Figura 24: Estrutura molecular do radical ABTS•+.	64
Figura 25: Estrutura molecular do Trolox®.	64
Figura 26: Estrutura molecular do corante celular I8377®.	65
Figura 27: Emulsões com diferentes valores de HLB, a esquerda uma emulsão que sofreu separação de fases e a direita uma emulsão estável após 24h.	89
Figura 28: Representação da orientação de moléculas de Tween 40 e span 80 na interface óleo-água	93

Figura 29: Formação de grumos na tentativa de homogeneização prévia em temperatura ambiente.	101
Figura 30: Diferentes tubos utilizados para a pré-mistura em homogeneizador de alta velocidade.	103
Figura 31: Efeito do número de ciclos em triplicatas da nanoemulsão de eugenol produzida na pressão de trabalho de 1000 psi.	106
Figura 32: Dispersão do tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol obtidas pelas seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos	111
Figura 33: Efeitos principais no tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol com diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.	112
Figura 34: Interação entre variáveis no tamanho médio de gota (nm) para as nanoemulsões de eugenol obtidas por diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.	113
Figura 35: Resíduos de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol com as seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos.	116
Figura 36: Superfície de resposta relativa ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.	117
Figura 37: Contorno relativo ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.	118
Figura 38: Dispersão do tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan obtidas pelas seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos.	119
Figura 39: Efeitos principais no tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan com diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.	120
Figura 40: Interação entre variáveis no tamanho médio de gota (nm) para as nanoemulsões de triclosan obtidas por diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.	121
Figura 41: Resíduos de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan com as seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos.	124
Figura 42: Superfície de resposta relativa ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.	125
Figura 43: Contorno relativo ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.	125

Figura 44: Dispersão do tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça obtidas pelas seguintes variáveis: pressão de trabalho e ciclos.	126
Figura 45: Resíduos de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça com as seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos.	129
Figura 46: Superfície de resposta relativa ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.	130
Figura 47: Contorno relativo ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.	131
Figura 43: Desestabilização da nanoemulsão de eugenol (A), nanoemulsão de triclosan (B e D) e nanoemulsão de extrato de pimenta (C e E).	141
Figura 49: Nanoemulsão de eugenol (E), Nanoemulsão de triclosan (T) e Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) após 1 ciclo de congelamento/descongelamento.	142
Figura 50: Análise de regressão e valores de coeficientes de regressão (r^2) para avaliar a influência do mecanismo de maturação de Ostwald na nanoemulsão de eugenol (37 °C) e ao longo do período de estocagem.	146
Figura 51: Análise de regressão e valores de coeficientes de regressão (r^2) para avaliar a influência do mecanismo de maturação de Ostwald na nanoemulsão de triclosan (4 °C) e ao longo do período de estocagem.	148
Figura 52: Distribuição de tamanhos de gota (nm) da nanoemulsão de triclosan (T) no tempo de 60 dias armazenadas em 4 e 25 °C.	149
Figura 53: Distribuição de tamanhos de gota (nm) ao longo do tempo para nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) armazenada a 37 °C.	150
Figura 54: Micrografias de microscopia de força atômica da nanoemulsão de eugenol.	155
Figura 55: Micrografias de microscopia de força atômica da nanoemulsão de triclosan.	157
Figura 56: Micrografias de microscopia de força atômica da nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça.	159
Figura 57: Microscopias de Crio-MEV para confirmação de tamanho médio de gota.	161
Figura 58: Orientação da água em cristais e das gotas de fase dispersa entre os mesmos em imagem obtida em Crio-MEV da nanoemulsão de eugenol.	162
Figura 59: Microscopias de Crio-MEV em diferentes áreas das emulsões.	164
Figura 60: Perfil das nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) analisadas em FTIR.	168

Figura 61: Análise de calorimetria diferencial de varredura das nanoemulsões.	169
Figura 62: Análise de calorimetria diferencial de varredura do triclosan puro.	170
Figura 63: Análise de calorimetria diferencial de varredura do eugenol puro.	171
Figura 64: Análise de calorimetria diferencial de varredura do extrato de pimenta dedo-de-moça.	172
Figura 65: Reogramas das nanoemulsões indicando comportamento Newtoniano.	174
Figura 66: Regressão linear para cálculo de EC50 pelo método de seqüestro do radical livre DPPH.	177
Figura 67: Curva de calibração para cálculo de Trolox equivalente.	179
Figura 68: Teste de susceptibilidade de <i>S. aureus</i> ao extrato de pimenta dedo-de-moça.	182
Figura 69: Teste de susceptibilidade de <i>S. aureus</i> ao eugenol em água e em óleo mineral 0,25% (m/m).	184
Figura 70: Halos de inibição da nanoemulsão de triclosan (T), onde: A – <i>S. aureus</i> , B – halo referente a 6% contra <i>S. aureus</i> , C – <i>E. coli</i> , D – <i>S. enteritidis</i> .	188
Figura 71: Comparação entre a atividade inibitória da nanoemulsão de triclosan (T) (A) e do triclosan diluído não emulsionado (B).	189
Figura 72: Avaliação visual de crescimento pela técnica de microdiluição seriada, onde poços de coloração roxa indicam crescimento bacteriano.	191
Figura 73: Visualização de crescimento dos poços de concentração inibitória mínima para determinar concentração mínima bactericida.	193

Lista de Tabelas

Tabela 1: Cálculos de valor de balanço hidrofílico-lipofílico de misturas de tensoativos, onde massa total corresponde a 5% (m/m) do volume final da emulsão.	69
Tabela 2: Condições testadas em desenho experimental para a nanoemulsão de eugenol.	73
Tabela 3: Condições testadas em desenho experimental para as nanoemulsões de triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça.	73
Tabela 4: Tamanho médio de gota das nanoemulsões de óleo mineral com diferentes valores de HLB.	90
Tabela 5: Influência da velocidade e tempo de agitação em homogeneizador de alta velocidade no tamanho médio de gota e polidispersidade na formação de emulsões.	96
Tabela 6: Efeito da concentração de óleo no tamanho médio de gota e polidispersidade da emulsão.	99
Tabela 7: Efeitos da relação óleo/tensoativo no tamanho médio de gota e polidispersidade da emulsão.	99
Tabela 8: Emulsões produzidas após pré-mistura em homogeneizador de alta velocidade.	100
Tabela 9: Características das emulsões escolhidas na primeira etapa de desenvolvimento.	107
Tabela 10: Limites superiores e inferiores das variáveis utilizadas no desenho experimental.	110
Tabela 11: Teste de significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliar tamanho médio de gota das nanoemulsões de eugenol obtidas por homogeneizador de alta pressão.	114
Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do tamanho médio de gota pelas variáveis pressão de trabalho e número de ciclos.	115
Tabela 13: Teste de significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliar tamanho médio de gota das nanoemulsões de triclosan obtidas por homogeneizador de alta pressão.	122
Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do tamanho médio de gota pelas variáveis pressão de trabalho e número de ciclos.	123

Tabela 15: Teste de significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliar tamanho médio de gota das nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça obtidas por homogeneizador de alta pressão.	127
Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do tamanho médio de gota pelas variáveis pressão de trabalho e número de ciclos.	128
Tabela 17: Densidade das fases aquosa e oleosa.	133
Tabela 18: Valores de cor e índice de brancura (IB) das emulsões preparadas na primeira etapa por resfriamento e na segunda etapa por desenho experimental sem resfriamento.	135
Tabela 19: Tamanho médio de gota após testes de estresse térmico e força centrífuga das nanoemulsões escolhidas por superfície de resposta.	137
Tabela 20: Tamanho médio de gota após testes de estresse térmico e força centrífuga das nanoemulsões escolhidas na primeira etapa com resfriamento.	139
Tabela 21: Teste de Tukey (95% de confiança) das diferenças no tamanho médio de gota ao longo do tempo no teste de estabilidade ao longo do tempo de armazenamento das nanoemulsões preparadas na primeira etapa de desenvolvimento.	144
Tabela 22: Teste de Tukey (95% de confiança) das diferenças no tamanho médio de gota ao longo do tempo no teste de estabilidade ao longo do tempo de armazenamento das nanoemulsões preparadas na segunda etapa por superfície de resposta.	145
Tabela 23: Porcentagens de inibição do radical DPPH.	176

Sumário

1. Introdução	19
2. Revisão de Literatura	24
2.1. Nanoemulsões	24
2.2. Métodos de obtenção de nanoemulsões	27
2.3. Homogeneização de alta pressão	28
2.4. Homogeneizador de alta pressão NanoDeBEE (BEE International, Reino Unido)	31
2.5. Estabilidade de nanoemulsões	33
2.6. Aplicações de nanoemulsões	37
2.6.1. Atividade antimicrobiana	37
2.6.2. Atividade antioxidante	38
2.7. Pimenta dedo-de-moça	38
2.8. Eugenol	43
2.9. Triclosan	45
3. Objetivos	49
4. Material e Métodos	52
4.1. Material	55
4.1.1. Material utilizado no desenvolvimento das nanoemulsões	55
4.1.1.1. Princípios ativos	55
4.1.1.2. Fases oleosas	56
4.1.1.3. Tensoativos não iônicos	57
4.1.1.3.1. Tensoativos hidrofílicos	57
4.1.1.3.2. Tensoativos lipofílicos	59
4.1.1.4. Aditivos	61
4.1.2. Atividade antioxidante	62
4.1.3. Atividade antibacteriana	65
4.2. Métodos	66
4.2.1. Produção de extrato de pimenta dedo-de-moça	66
4.2.2. Produção das nanoemulsões	66
4.2.2.1. Método de emulsificação	66
4.2.3. Estudos preliminares	67
4.2.3.1. Determinação do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)	67
4.2.3.2. Influência das variáveis de processo	70

4.2.3.2.1. Influência da ordem de adição dos tensoativos e das fases aquosa e oleosa	70
4.2.3.2.2. Influência da velocidade e tempo de agitação	70
4.2.3.2.3. Influência das características dos materiais utilizados	71
4.2.3.2.4. Influência da temperatura de pré-emulsificação	71
4.2.3.2.5. Influência da adição de glicerol e polietilenoglicol (PEG) e alteração de fase oleosa	71
4.2.3.2.6. Influência da relação tensoativo/óleo e da relação fase aquosa/fase oleosa	72
4.3. Otimização por Desenho Experimental	72
4.4. Testes de estabilidade por estresse térmico e por força centrífuga	74
4.4.1. Estresse térmico	74
4.4.1.1. Aquecimento em banho-maria	74
4.4.1.2. Rampa de temperatura (gradiente de temperatura)	74
4.4.1.3. Ciclos de aquecimento/resfriamento	75
4.4.1.4. Congelamento/Descongelamento (Freeze-thaw)	75
4.4.2. Estresse de força centrífuga	75
4.5. Testes de estabilidade ao armazenamento ao longo do tempo	76
4.6. Índice de maturação de Ostwald	76
4.7. Microscopia de força atômica	77
4.8. Crio-Microscopia Eletrônica de Varredura	77
5. Caracterização das nanoemulsões	78
5.1. Determinação do tamanho de gota, polidispersidade e do potencial zeta	78
5.2. Cor	78
5.3. Análise do comportamento reológico por curvas de escoamento	79
5.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	79
5.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	80
5.6. Medida de Tensão Superficial e Tensão Interfacial	80
5.7. pH	81
6. Testes de atividades de interesse das nanoemulsões	81
6.1. Avaliação da atividade antioxidante	81
6.1.1. Capacidade de seqüestro do radical DPPH•	81
6.1.2. Capacidade de seqüestro do radical ABTS•+	83
6.2. Atividade antibacteriana	83

6.2.1. Teste de susceptibilidade pelo método de poço-difusão	84
6.2.2. Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)	85
6.3. Análises estatísticas	86
7. Resultados e Discussão	87
7.1. Experimentos preliminares	88
7.1.1. Desenvolvimento das nanoemulsões	88
7.1.1.1. Determinação do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)	88
7.1.1.2. Escolha da mistura de tensoativos	90
7.1.1.3. Influência da temperatura de pré-emulsificação	94
7.1.1.4. Influência da velocidade e tempo de agitação	95
7.1.1.5. Influência da relação tensoativo/óleo e da relação fase aquosa/fase oleosa	98
7.1.1.6. Influência da ordem de adição dos tensoativos e das fases aquosa e oleosa	100
7.1.1.7. Influência das características dos materiais utilizados	102
7.1.1.8. Homogeneização por alta pressão	103
7.1.1.9. Uso de aditivos e mudança de fase oleosa	107
7.1.1.9.1. Adição de glicerol e PEG	108
7.1.1.10. Otimização por desenho experimental	110
7.1.1.10.1. Nanoemulsão de eugenol	110
7.1.1.10.2. Nanoemulsão de triclosan	118
7.1.1.10.3. Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça	126
7.2. Caracterização das nanoemulsões contendo eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça	132
7.2.1. Tensão interfacial	132
7.2.2. Cor	134
7.3. Testes de estabilidade ao estresse térmico e a força centrífuga	135
7.3.1. Congelamento/descongelamento	140
7.4. Testes de estabilidade ao longo do tempo de armazenamento	143
7.4.1. Cryo-Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica	152
7.5. Escolha das formulações ideais para os testes de atividade antioxidante e antibacteriana	165

7.6. Caracterizações específicas das formulações ideais	166
7.6.1. Tensão superficial	166
7.6.2. pH	166
7.6.3. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier	167
7.6.4. Calorimetria Diferencial de Varredura	168
7.6.5. Comportamento reológico por curvas de escoamento	172
7.7. Testes de atividade antioxidante e antibacteriana das formulações ideais	174
7.7.1. Atividade antioxidante	174
7.7.1.1. Capacidade de seqüestro do radical DPPH•	175
7.7.1.2. Capacidade de seqüestro do radical ABTS•+	178
7.7.2. Atividade antibacteriana	179
7.7.2.1. Teste de susceptibilidade por poço-difusão	179
7.7.2.2. Teste de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida	190
8. Conclusão	194
9. Sugestões para estudos futuros	198
10. Referências Bibliográficas	199

Introdução

1. Introdução

O interesse por alimentos seguros, livres de contaminantes e mais saudáveis, é crescente no mercado atual. Neste contexto, a indústria alimentícia precisa se adaptar, buscando inovações tecnológicas que supram a produção de alimentos com vida de prateleira longa, resistentes à oxidação e, que mantenham inocuidade microbiana. Além disso, é preciso considerar que o mercado de alimentos minimamente processados ou livres de aditivos químicos é um nicho em potencial (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2007). Para tal efeito, é necessário ter controle sobre as alterações às quais o alimento está susceptível e as possíveis fontes de contaminação microbiana, ou seja, utilizando de boas práticas, e, sobre as alterações químicas que possam ocorrer.

Naturalmente os alimentos estão em constantes modificações, representadas por alterações físicas, enzimáticas, microbiológicas e químicas, como as reações de oxidação de lipídios e outros nutrientes susceptíveis à ação do oxigênio e radicais livres, provocando por sua vez o aparecimento de sabores e odores desagradáveis, modificações do valor nutricional e a diminuição da vida de prateleira dos alimentos. Para retardar tais processos, a indústria faz uso de aditivos químicos constantemente questionados pelos consumidores quanto aos seus possíveis efeitos negativos à saúde. Como alternativa econômica e tecnológica, há grande interesse em encontrar nas plantas, em especial nas condimentares, princípios ativos que possuam ação antioxidante e antimicrobiana que possam contribuir para a conservação de alimentos, sendo estes produzidos sem danos ao meio ambiente e à saúde humana (COSTA et al., 2009).

O uso de princípios ativos a base de óleos essenciais, frações ou extratos de plantas em alimentos pode ser interessante devido à sua atividade (ex.: antioxidante, antimicrobiano, filtro UV, dentre outros) (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004). Entretanto, alguns desses aditivos

têm caráter apolar, sendo, portanto, de difícil dispersão na formulação do alimento, que é geralmente rica em água.

Da mesma forma, a prevenção da contaminação microbiana em alimentos é a melhor barreira contra microrganismos deterioradores e patógenos. O uso de antisépticos eficazes para higienização de mãos é dificultado, pois, em sua maioria, estes possuem caráter hidrofóbico que inviabiliza a diluição em níveis seguros que garantam a permanência do composto na pele, limitando assim, sua atividade. A possibilidade de potencializar o efeito de antisépticos (com uso de baixas concentrações) considerados seguros pela legislação é muito interessante, pois, prevenir a contaminação de alimentos por intermédio de manipuladores é uma alternativa à adição de antimicrobianos diretamente nos alimentos, e, uma barreira no caso de alimentos que não podem conter aditivos, como, carnes frescas ou vegetais.

Uma alternativa inovadora e viável seria a utilização desses princípios ativos na forma de nanoemulsões, isto é, os princípios ativos seriam nanoemulsionados antes de adicionados na formulação. Assim, além de possibilitar uma melhor dispersão do princípio ativo na matriz do alimento ou na pele, no caso de uso tópico, essa tecnologia permitiria também uma liberação controlada do princípio ativo quando aplicado numa matriz biopolimérica (WEISS et al., 2006), o que é muito interessante na tecnologia de embalagens ativas com liberação controlada, mantendo o alimento livre de microrganismos patogênicos e contaminantes por um período superior ao usual.

O diferencial do uso de nanoemulsões se dá pelo fato de que são emulsões (normalmente óleo em água, O/A) com tamanho das gotas de óleo da fase dispersa muito pequenos, 300 nanômetros ou menos, cineticamente estáveis, onde, a separação de fases é dificultada pelo alto movimento Browniano do sistema que supera a taxa de segregação induzida pela gravidade (ANTON e VANDAMME, 2011). O tamanho médio de gota obtido nas nanoemulsões influencia diretamente o efeito pretendido, permitindo o uso de baixas

concentrações de princípios ativos e aumentando sua interação com as matrizes, visando liberação controlada e atividade máxima (CHOI et al., 2009; HUANG, YU e RU, 2010; WEISS et al., 2006).

Alguns componentes funcionais podem ser incorporados dentro das gotas, ou mesmo na região interfacial, formando uma espécie de nanoencapsulamento em fase líquida (CHEONG et al., 2008). Esses sistemas nanoestruturados compreendem matrizes sofisticadas de encapsulamento que fornecem estabilidade física máxima, protegem os ingredientes de degradação química, e permitem o controle da liberação dos componentes encapsulados. Pode-se ainda considerar que a nanoemulsificação de princípios ativos pode conduzir a modificação de características do produto nanoemulsificado (HUANG, YU e RU, 2010), podendo-se mascarar alguns atributos indesejáveis.

A escolha do princípio ativo é primordial para o resultado pretendido, pois atividades biológicas já conhecidas podem ser potencializadas ou alteradas quando emulsionadas em escala nanométrica. Desta forma, a pimenta dedo-de-moça, o eugenol e o triclosan tem tido destaque nas indústrias alimentar, farmacêutica e sanitária.

Pode-se considerar que esta tese tem relevância tanto do ponto de vista científico, quanto tecnológico. Do ponto de vista científico, pela geração de novos conhecimentos sobre nanoemulsões alimentícias e para a área de sanitizantes, já que, a área da nanotecnologia é emergente na Engenharia de Alimentos. Do ponto de vista tecnológico, destaca-se o enorme potencial de aplicação na indústria de alimentos, particularmente para proporcionar o aumento da inocuidade de alimentos.

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1. Nanoemulsões

Os avanços recentes em nanociência e nanotecnologia têm oferecido diversas oportunidades para inovação na indústria alimentar e afins. A principal aplicação em alimentos e nutrição é o projeto e desenvolvimento de novos ingredientes alimentares funcionais com características aprimoradas, como alta solubilidade em água, estabilidade térmica, biodisponibilidade, boas características sensoriais e alto desempenho fisiológico (SHANTILAL e BHATTACHARYA, 2014).

Emulsões são sistemas constituídos de dois ou mais líquidos imiscíveis, sendo, um deles disperso na forma de gotas ou glóbulos (fase dispersa) no outro (fase contínua). Emulsões contêm um agente ativo de superfície, como tensoativos, com duas funções principais: 1-diminuir a tensão interfacial entre as fases, de forma a facilitar a formação da emulsão, e, 2- estabilizar a fase dispersa contra coalescência após sua formação. Podem ser classificadas em dois grupos: emulsões simples e múltiplas (BRÖSEL e SCHUBERTO, 1999; PAL, 2011).

Emulsões simples podem ser de dois tipos: água-em-óleo (A/O) onde gotas de água estão dispersas numa fase contínua de óleo, ou óleo-água (O/A) onde ocorre o inverso, gotas de óleo estão dispersas em uma fase contínua aquosa (PAL, 2011).

Nanoemulsões fazem parte de uma ampla classe de sistemas coloidais, mas, algumas fases líquidas cristalinas liotrópicas, também conhecidas como “fase micelar”, “mesofase” e “microemulsões” podem ser facilmente confundidas com nanoemulsões em relação à composição e estrutura em nano escala (Figura 1). O erro de conceitos é encontrado na literatura ao longo dos últimos 30 anos, em função de características similares como

morfologia (formato esférico das gotas) ou faixa de tamanhos de gota em nanômetros, pela terminologia, 10^{-6} indica micro e 10^{-9} nano, mas, na história do desenvolvimento de colóides, a primeira visualização de gotas recebeu o nome de microemulsões, o termo nanoemulsão foi introduzido mais recentemente e é sinônimo de emulsões ultra-finas ou mini-emulsões. A possibilidade de produção de nanoemulsões por métodos de baixa energia e emulsificação espontânea resultando em tamanho de gota abaixo de 100 nm também causa de confusão com as microemulsões, contudo, estes sistemas são totalmente diferentes (ANTON e VANDAMME, 2011; McCLEMENTS, 2012).

Figura 1: Diferença entr microemulsão e nanoemulsão (Fonte: McCLEMENTS, 2011).

Microemulsões são líquidos isotrópicos de duas ou mais fases, termodinamicamente estáveis, produzidos por emulsificação espontânea de misturas de água, óleo e altas

concentrações de tensoativo, são sensíveis à alterações de temperatura e diluições e possuem tamanhos de gota abaixo de 100nm, são translúcidas quando o raio da gota está abaixo de 30 nm e por serem micelas não são na realidade emulsões verdadeiras. Nanoemulsões, por outro lado, são emulsões convencionais contendo gotas esféricas muito pequenas que somadas ao uso ideal de tensoativos pode prevenir coalescência e floculação, sendo a maturação de Ostwald o principal mecanismo de desestabilização, são termodinamicamente instáveis, porém, como a cinética de desestabilização de nanoemulsões costuma ser lenta, são consideradas cineticamente estáveis e normalmente produzidas por processos de alta energia que causam ruptura das gotas e diminuição do tamanho das mesmas. (ANTON e VANDAMME, 2011; KLANG et al., 2012; MASON et al., 2006; McCLEMENTS, 2012; RAO e McCLEMENTS, 2012; SILVA, CERQUEIRA e VICENTE, 2012; SIVAKUMAR et al., 2014).

Nanoemulsões costumam ter aspecto leitoso, baixa viscosidade e as moléculas ativas estão preferencialmente dissolvidas no núcleo oleoso da nanoestrutura (DIAS et al., 2014), são ideais como carreadores de óleos essenciais, ou seus compostos, devido à alta afinidade criada na formação das gotas, gerando compatibilidade com diversos alimentos ricos em água e atravessando membranas biológicas com facilidade, além da simplicidade de obtenção em escala industrial (DONSI et al., 2014). As áreas de aplicação são diversas, destacando a área farmacêutica como a que mais investe na obtenção de sistemas de liberação de drogas mais eficientes e, nos últimos anos, o interesse da indústria alimentícia é crescente devido à dificuldade de incorporar bioativos apolares em matrizes polares e à necessidade de diminuir e, se possível, substituir os aditivos artificiais (Figura 2).

Figura 2: Áreas de aplicação de nanoemulsões (Adaptado de SIVAKUMAR et al., 2014).

2.2. Métodos de produção de nanoemulsões

Os métodos de obtenção de nanoemulsões se dividem em baixa energia e alta energia. Dentre os métodos de baixa energia estão emulsificação espontânea (ou efeito Ouzo), emulsificação por inversão de fases e emulsificação por temperatura de inversão de fases (PIT) (LANDRY et al., 2014). Os métodos de alta energia são capazes de gerar forças de ruptura de alta intensidade nas fases óleo e água, conduzindo à formação de gotas nanométricas da fase dispersa (LEE e McCLEMENTS, 2010). As técnicas mais utilizadas são homogeneização de alta pressão, microfluidização de alta pressão, homogeneização-evaporação e ultra-som (ANARJAN et al., 2010; CHEONG et al., 2008; HUANG, YU e RU, 2010; KENTISH et al., 2008; SILVA et al., 2011; WEISS et al., 2006).

2.3. Homogeneização por alta pressão

A classificação dos sistemas de alta pressão se baseia na geometria e design do *nozzle* e sua orientação de fluxo, sendo mais usual que a classificação pelo tipo de construção, já que o *nozzle* é decisivo para a eficiência na ruptura das gotas com o uso de equipamentos de alta pressão, que podem ser sub-divididos em difusores radiais (padrões), dispersores de jato, microfluidizadores e válvulas de orifício (Figura 3). Os padrões são frequentemente utilizados para escala industrial e geram fluxo radial assim que a emulsão primária passa pela válvula, sofre uma mistura de cisalhamento, cavitação e escoamento turbulento, e a pressão é determinada pela força atuante entre a válvula (*nozzle*) e a lacuna resultante, os orifícios criam escoamento laminar elongacional (JAFARI, ASSADPOOR e BHANDARI, 2008). O processo de formação da emulsão em equipamentos de alta energia é controlado basicamente pelo tipo de tensoativo e a taxa na qual o mesmo cobre as gotas recém-formadas no homogeneizador/microfluidizador. Tal taxa por sua vez, depende das condições hidrodinâmicas dentro da zona de ruptura, taxa de dissipação de energia, viscosidade das fases e tempo de permanência na zona de ruptura.

Figura 3: Esquemas de funcionamento de equipamentos utilizados para emulsificação por métodos de alta energia (McCLEMENTS, 2011).

Em geral, o processo de microfluidização ocorre sob cisalhamento ou turbulência para redução do tamanho da gota em duas câmaras de pressão que fornecem dois estágios de ruptura com jatos em direções opostas, causando colisão das gotas em fluxo laminar, já, em homogeneizadores de alta pressão há um único estágio, no qual, um pistão-bomba com um *gap* estreito e pressão acima de 150 MPa quebra as gotas na lacuna da válvula de saída com o jato se localizando após esta lacuna, o segundo processo tem a vantagem de ser o único viável em escala industrial (LEE e NORTON, 2013).

Assim, o tamanho médio de gota, mínimo possível pretendido, utilizando métodos de alta energia depende do tipo de homogeneizador, suas condições de operação (intensidade de energia, tempo e temperatura) e a composição da amostra (tipo de óleo e tensoativo e suas respectivas concentrações), além de suas propriedades físico-químicas (viscosidade e tensão interfacial) (LEE e NORTON, 2013; QIAN e McCLEMENTS, 2011). A baixa concentração

da fase oleosa também evita que as gotas recém-formadas colidam antes de serem totalmente cobertas pelo tensoativo, o que poderia levar à coalescência imediatamente após a formação de gotas e ao aumento de tamanho das mesmas.

Lee e Norton (2013) observaram que em microfluidizador, com uma pressão de trabalho de 150 MPa, apenas um ciclo foi necessário para obtenção do tamanho de gota desejado, sem reduções adicionais com o aumento do número de ciclos, já em homogeneizador de alta pressão para a mesma formulação o mesmo resultado foi alcançado somente após 5 ciclos. A vantagem do homogeneizador foi o uso de pressões mais baixas, como 50 MPa, isto ocorre porque é possível criar uma larga distribuição das forças de cisalhamento. Apesar dos tamanhos médios de gota serem próximos, Lee e Norton (2013) notaram que no homogeneizador de alta pressão ocorria menor distribuição de tamanhos de gota com uso de poucos ciclos e que o microfluidizador apresentava um segundo pico de tamanho em análise por espalhamento de luz dinâmico (DSL) que só diminuía com o aumento do número de ciclos. Qian e McClements (2011) também observaram que o aumento do número de ciclos no homogeneizador de alta pressão eliminou a presença de outros picos, portanto, apesar de não ocorrer reduções adicionais, a distribuição de tamanhos de gota melhora com o aumento do número de ciclos, sendo interessante para estabilidade.

A escolha do tensoativo pode influenciar diretamente quando se utiliza um homogeneizador de alta pressão, a diminuição de tamanho de gota em função do aumento da pressão de trabalho não é contínua em todas as circunstâncias, pois, o tensoativo pode mudar suas características dentro do homogeneizador, portanto, o tamanho final da gota de uma emulsão homogeneizada é uma complexa ação combinada entre condições de cisalhamento na eficiência de ruptura da gota e química do tensoativo, que se alteram com o equipamento utilizado, portanto, algumas variáveis devem ser fixadas (JAFARI, ASSADPOOR e BHANDARI, 2008; WOOSTER et al., 2008).

Wang et al. (2008) prepararam nanoemulsões para encapsular a curcumina, obtendo formulações com vários diâmetros de gotas em função da pressão de homogeneização. Yuan et al. (2008) produziram nanoemulsões contendo β -caroteno na fase dispersa com homogeneizador de alta pressão, e, observaram que o tamanho médio das gotas e a distribuição de tamanho das mesmas foram influenciados pelos tensoativos e por suas concentrações, bem como pela temperatura, pressão e número de ciclos de homogeneização.

Anarjan et al. (2010) estudaram a influência das condições de processamento, incluindo a temperatura da evaporação, número de ciclos e pressão de trabalho nas propriedades físico-químicas de nanoemulsões de astaxantina produzidas com uma técnica combinada envolvendo homogeneização e evaporação, e observaram grande efeito de todos os parâmetros estudados quando alterados individualmente. Segundo Choi et al. (2009), diferentes agentes tensoativos (Tween® 20, 40, 60 e 80, mono estearato de sacarose e polipropileno glicol) utilizados na nanoemulsificação da capsaicina (princípio ativo de pimentas picantes) determinaram diferentes características de nanoemulsões, as melhores foram obtidas com o uso de Tween® 80 com tamanhos de gota entre 65 e 92 nm.

2.4. Homogeneizador de alta pressão NanoDeBEE (BEE International, Reino Unido)

O homogeneizador Nano DeBEE (BEE International) possui um sistema de bombeamento de alta pressão de até 45000 psi, mantida constante para ocasionar melhor redução do tamanho médio de gota, enquanto elimina a contaminação do produto em apenas um ciclo. Os intensificadores DeBEE são acionados hidraulicamente e fornecem pressão consistente e fluxo através de uma tecnologia de célula de homogeneização patenteada. É um processo constante em velocidade elevada por meio de jato de produto a ser homogeneizado através da célula de homogeneização, este fator é fundamental para aumentar a escala linear

de unidades de laboratório para sistemas comerciais de grande porte. São divididos em duas configurações básicas: fluxo único paralelo e fluxo reverso (Figura 4) (BEE INTERNATIONAL).

Figura 4: Configurações básicas do homogeneizador de alta pressão NanoDeBEE® (Fonte: <http://www.beei.com/technology-a>).

O princípio de funcionamento dos homogeneizadores de alta pressão convencionais se baseia em uma única força mecânica para homogeneizar um produto e diminuir o tamanho médio de gota. Já o Nano DeBEE se concentra na quebra de partículas separadas por todas as forças mecânicas disponíveis para alcançar os melhores resultados, como, por exemplo:

- Turbulência (como agitadores mecânicos e magnéticos);
- Cavitação (como ultrassom);

- Taxas de cisalhamento mais elevadas que os agitadores por cisalhamento;
- Alto impacto - como moinhos de esferas.

A intensidade do processo é ajustável de 2.000 - 45.000 psi (150-3100 bar) e é modular, permitindo o uso de todas as forças acima para produzir os melhores resultados para um determinado produto em comparação aos demais homogeneizadores (Figura 5) (Bee International em <http://www.beei.com/technology-a>).

Figura 5: Comparação entre os métodos de alta energia usuais e a tecnologia patenteada BEE Systems (Fonte: <http://www.beei.com/technology-a>).

2.5. Estabilidade de nanoemulsões

Nanoemulsões e macroemulsões estão sujeitas a coalescência, amadurecimento ou maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*) e inversão de fases, além dos processos de floculação e cremação. Estes fenômenos ocorrem simultaneamente e independentes uns dos

outros, sendo menores quando há movimento Browniano maior que a força gravitacional. Em nanoemulsões os mecanismos de instabilidade mais comuns são o maturação de Ostwald e a floculação (Figura 6) (WOOSTER et al., 2008).

Figura 6: Mecanismos de instabilidade em emulsões (Fonte: Technical Brief Particle Sciences – Drug Development Services, 2011).

A coalescência é o resultado da colisão das gotas da fase dispersa e ocorre quando o filme protetor entre gotas se rompe com a colisão e, estas se unem para formar uma única gota maior, este processo pode acontecer quando as gotas são pobres em cobertura de tensoativo, por falta deste ou pela formação de um número elevado de gotas na nanoemulsão. Por outro lado, o maturação de Ostwald está relacionado à solubilidade da fase oleosa na fase contínua, permitindo que o óleo presente no interior das gotas menores migre através da fase contínua para uma gota maior, alimentando-a e resultando em uma gota menor e outra maior (Figura 7) (NAZARZADEH et al., 2013).

Figura 7: Representação de maturação de Ostwald (Fonte: VINCENT et al., 2011).

Sakai et al. (2003) correlacionaram os dados de tamanho médio de gota por espalhamento de luz dinâmico (DLS) com coalescência passo a passo, e estabeleceram que as gotas primárias se agregam em cachos, ou seja, floculam, e então se fundem formando uma gota secundária que se funde a uma outra gota e o processo se repete gerando coalescência, e posteriormente, separação de fases.

O processo de floculação em uma nanoemulsão nem sempre significa o início da desestabilização do sistema, pois, pode ser reversível em função do potencial eletrostático das partículas na interface ou quando o potencial zeta está mais longe de zero, a reversão também pode ser efeito de forças de Van der Waals. A maior resistência das nanoemulsões à desestabilização é resultado direto do tamanho médio das gotas, pois, gotas grandes estão sujeitas a deformação durante a floculação, isto se deve em parte à distribuição e adsorção do tensoativo na interface, que determina as propriedades interfaciais e altera o mecanismo natural de coalescência (RALM-CHIQUÉ et al., 2012).

O maturação de Ostwald pode ocorrer em dois intervalos distintos: em regime transiente e regime assintótico (limitante). O regime transiente pode ser composto de variações aleatórias no tamanho médio de gota ou variações sistemáticas, já, no regime assintótico o crescimento das gotas é linear com o tempo. Ambos os regimes podem estar presentes numa mesma emulsão, como quedas no tamanho médio de gota por um curto espaço de tempo (regime transiente) seguido de aumento linear ao longo do tempo (regime

assintótico). Se o mecanismo de envelhecimento estiver apenas no regime assintótico, ou seja, com crescimento linear das gotas, podemos atribuir este comportamento não apenas ao maturação de Ostwald, mas, também, coalescência induzida por movimento Browniano, mais provável quando as concentrações de tensoativo são muito baixas para cobrir completamente as gotas recém-formadas, causando ampliação da curva/histograma por espalhamento de luz dinâmico com o tempo. A principal diferença da ampliação da curva ou histograma causada por este mecanismo e por maturação de Ostwald, é que o primeiro causa assimetria positiva no diagrama devido à formação de gotas grandes, já o segundo, causa uma ampliação em ambas as extremidades, com pequenas e grandes gotas surgindo com o tempo devido à difusão do óleo através da fase aquosa, ressaltando que, se o tempo for longo, o equipamento detecta apenas as gotas grandes podendo levar à interpretações errôneas (NAZARZADEH et al., 2013).

Quando o mecanismo de maturação de Ostwald ocorre, as gotas menores se tornam cada vez menores por alimentar gotas grandes, de forma que estas gotas remanescentes ainda menores podem coalescer por movimento Browniano, pois, a cobertura de tensoativo fica abaixo do necessário para impedir que estas pequenas gotas se fundam. Este fenômeno conhecido como “coalescência induzida por maturação de Ostwald” pode produzir distribuição de tamanho de gotas de queda acentuada com o tempo, sendo este processo uma parte integral do processo de coalescência como um todo, sendo impossível desacoplá-lo e analisá-lo separadamente, mas, pode-se presumir que a coalescência é de principal importância quando a cobertura do tensoativo é insuficiente, já o maturação de Ostwald está presente quando a concentração de tensoativo é alta ou em excesso formando micelas (NAZARZADEH et al., 2013).

2.6. Aplicações de nanoemulsões

2.6.1. Atividade antimicrobiana

O uso de sistemas de liberação em nano escala pode potencialmente aumentar os mecanismos de absorção celular passiva, reduzindo as resistências à transferência de massa e aumentando a atividade antimicrobiana (DONSI et al., 2012), apesar de muitos autores relatarem este fenômeno, o uso de nanoemulsões como antimicrobianos ainda é uma área nova e não completamente elucidada, mas, acredita-se que quanto menor o tamanho médio de gota maior sua biodisponibilidade (DONSI et al., 2014).

Pequenas gotas com alta tensão superficial podem fundir-se com células de membranas eucarióticas e procarióticas rompendo-as, um efeito de sinergismo pode ser alcançado com a adição de detergentes ou substâncias com forte atividade antimicrobiana, diminuindo assim, a quantidade necessária de princípio ativo levando à diminuição dos custos e menor irritação cutânea (BURANASUKSOMBAT et al., 2011).

A escolha do tensoativo em nanomulsões antimicrobianas é de extrema importância, pois, alguns tensoativos como proteínas podem servir de nutriente para os microrganismos, promovendo seu crescimento e anulando a atividade antimicrobiana do composto ativo e tensoativos com alta afinidade pela fase oleosa possibilitam altas concentrações de princípio ativo na fase aquosa agindo como bactericida, já, tensoativos com afinidade intermediária pela fase oleosa liberam poucas quantidades de princípio ativo na fase aquosa por períodos extensos de tempo, agindo como bacteriostático (DONSI et al., 2012).

O interesse em nanoemulsões para uso tópico também é crescente, pois, atuam como nanocarreadores, e, quando são fluidos Newtonianos possibilitam seu uso como spray ou roll-on, e, se desejado, como sistema de liberação transdermal para evitar transtornos ocasionados

pelo composto puro, como irritação cutânea ou desencadeamento de uma resposta imune, são menos nocivas porque o pH da pele atua como tampão quando as concentrações do princípio ativo são baixas, ou seja, nanoemulsionados (CLARES et al., 2014).

Contudo, é necessário cuidado na escolha de tamanho médio de gota da nanoemulsão quando o objetivo é o uso tópico, pois, a largura média da via trans-dérmica hidrofílica é de até 100 nm, semelhante a espaços inter corneócitos, portanto, gotas com tamanho menor que 100 nm podem ser capazes de atravessar essa barreira da pele até camadas mais profundas causando danos (ZHOU et al., 2010).

Zhou et al. (2010) testaram nanoemulsões de lecitina de soja com tamanho médio de gota entre 50 e 310 nm e observaram que quanto menor o tamanho maior a penetração na pele aumentando a hidratação, contudo, nanoemulsões com cerca 68 nm causaram alterações nas propriedades de barreira da pele e maior grau de particionamento dos princípios ativos podendo causar um efeito tóxico.

Clares et al. (2014) testaram nano-partículas sólidas, nanoemulsões e lipossomas de retinol com tamanho médio de gota menor que 275 nm e potencial zeta de -40 mV e observaram que em nanoemulsões a taxa de permeação cutânea foi maior que os demais sistemas, contudo, em todos os sistemas foi possível observar danos em camadas da derme, como perda de textura do colágeno. As nanoemulsões causaram maiores danos como perda de flexibilidade da pele, pois, por ser um sistema mais fluido penetra com maior facilidade até as camadas mais profundas da pele.

2.6.2. Atividade antioxidante

A potencialização de atividade antioxidante de compostos é de grande interesse, pois, diminui os custos aumentando a eficácia e a eficiência. O desempenho de um composto

antioxidante em uma emulsão depende de muitas variáveis, incluindo o coeficiente de partição dos compostos entre fase aquosa e fase oleosa, natureza do tensoativo e seus efeitos interfaciais, tipo e concentração do princípio ativo, e, propriedades de sequestro de radicais. Todos estes fatores podem afetar de forma imprevisível e em discordância de teorias bem aceitas (ASNAASHARI et al., 2014).

Um fenômeno descrito pela primeira vez, em 1993, como paradoxo polar, prediz que antioxidantes hidrofílicos são mais efetivos em um sistema emulsionado que antioxidantes lipofílicos devido à sua tendência de se posicionarem na interface óleo-água e formarem uma barreira protetora ao redor das gotas. Esta teoria é bem aceita até os dias atuais, porém, estudos recentes demonstram que nem todos os sistemas de nanoemulsão seguem este preceito (ASNAASHARI et al., 2014).

Além dos fatores já citados, a escolha do princípio ativo é primordial para o resultado pretendido, pois, atividades já conhecidas podem ser potencializadas ou alteradas quando emulsionadas em escala nanométrica.

2.7. Pimenta dedo-de-moça

Plantas condimentares, tais como, as pimentas e pimentões do gênero *Capsicum*, sempre foram aproveitadas pelos índios e civilizações antigas para tornar os alimentos mais agradáveis ao paladar, além de serem utilizadas como conservantes em alimentos, são fontes de antioxidantes naturais como a vitamina E, vitamina C e diversos carotenóides e fenóis (COSTA et al., 2009).

As pimentas vermelhas, muito consumidas como tempero, têm sido bastante investigadas, as pimentas do gênero *Capsicum*, como a pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*) (Figura 8), possuem propriedades antioxidantes devido à presença de compostos

como a capsaicina, princípio ativo de grande interesse na indústria alimentar (COSTA et al., 2009). No caso de um extrato dos frutos, Bortolin et al. (2014) elucidaram que mesmo com a diminuição da concentração da capsaicina, a atividade antioxidante total não diminui, indicando que o composto não é o maior contribuinte para a atividade, mas sim, um complexo de componentes distintos que se alteram dependendo do tipo de extração. A utilização de substâncias com capacidade antioxidante pode ser de grande relevância na prevenção e terapêutica de doenças relacionadas com o aumento do estresse oxidativo, uma vez que se sugere seu envolvimento na melhora da fisiopatologia de várias doenças crônicas, tais como aterosclerose, câncer, e doenças degenerativas (SILVA et al., 2009).

Figura 8: Pimenta dedo-de-moça (Fonte: <http://applicatomoda.blogspot.com.br/2013/01/sabor-de-saude.html>).

As pimentas em geral vêm sendo utilizadas para aplicações diversas: em alimentos, em aplicações médicas e em aerossóis de proteção pessoal. A capsaicina (Figura 9) presente

em todas as espécies, em diferentes concentrações, é a responsável pela maior parte das aplicações citadas, é utilizada também no tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite e desordens neuropáticas como dor local. Atualmente, é testada como composto antimicrobiano, analgésico local/tópico, controle de peso, auxiliar em antiofídeos e como coadjuvantes contra vermes e fungos de plantas (DAVIS et al., 2007).

Figura 9: Estrutura molecular da capsaicina (Fonte: http://www.crq4.org.br/quimica_viva_capsaicina).

Zacaroni et al. (2009) testaram óleo essencial de pimenta longa na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra fungos de plantas e concluíram que a capsaicina presente inibiu totalmente o crescimento do fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*, enquanto que, para o *Fusarium oxysporum* e o *Colletotrichum gloeosporioides* esta ocorreu na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Alves (2006) verificou o efeito de *Capsicum baccatum* em diferentes modelos experimentais de inflamação, além de avaliar sua ação antidislipidêmica e antioxidante. O extrato de *Capsicum baccatum* apresentou ação antiinflamatória nos modelos experimentais de inflamação aguda (pleurisia e peritonite), reduzindo de forma significativa os parâmetros inflamatórios tais como exsudação, migração de leucócitos e linfócitos, proteínas e lipídeos de alta densidade no líquido pleural e permeabilidade vascular. O extrato de *Capsicum baccatum*

exibiu ação antiinflamatória no modelo experimental de sepse, alterando a resposta do hospedeiro de maneira a melhorar parâmetros hematológicos (hemoglobina, contagem de plaquetas), consumo de bicarbonato e agregação plaquetária. Além disso, apresentou ação antioxidante, verificada através da manutenção da enzima IMA.

Alves (2006) comprovou também que o extrato da pimenta dedo-de-moça apresentou ação antidislipidêmica em ratos, reduzindo o colesterol total e conseqüentemente a relação colesterol total/HDL – também conhecida como Índice Aterogênico. Verificou-se que o extrato também foi capaz de reduzir os níveis de LDL-oxidada, confirmando sua ação antioxidante.

Segundo Rodríguez et al. (1997) o creme de *Pimenta dioica* pode ser empregado profilaticamente para evitar enfermidades transmitidas como a dengue hemorrágica espantando os mosquitos. O creme demonstrou repelência eficaz contra insetos a 1% por até 5 horas. Lima et al. (2009) revelaram por análise cromatográfica que o constituinte majoritário do óleo essencial de pimenta-longa era safrol (82%) e os bioensaios demonstraram sua atividade inseticida para *S. frugiperda*, causando mortalidade e redução alimentar pelo teste de ingestão e toxicidade aguda pelo teste de aplicação tópica.

Neves et al. (2009) realizaram um experimento contra nematóides que mostrou que o extrato de pimenta malagueta causou redução do número de galhas e de ovos nas concentrações de 400 e 200 ppm e não causou efeitos tóxicos em nenhuma das concentrações, o melhor resultado foi obtido na concentração de 400 ppm, onde, o número de galhas teve uma redução de 23,5% e o número de ovos 45,5% em relação à testemunha. Estes resultados demonstram a variedade de aplicações para o princípio ativo das pimentas.

2.8. Eugenol

O eugenol, cujo nome pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é 4-Alil-2-Metoxifenol, é um composto fenólico volátil que constitui de 70 a 80% da composição do óleo de cravo-da-índia, sendo utilizado, tanto por suas atividades medicinais, como pelas cosméticas (MARTINS et al., 2008) (Figura 10). Em altas concentrações tem efeito bactericida, ação atribuída aos fenóis por causarem degeneração de proteínas. Os resultados encontrados na literatura sugerem que o eugenol puro inibe o crescimento de vários patógenos fúngicos, sozinho ou combinado, e geralmente é utilizado no tratamento de enfermidades infecciosas orais (ESCOBAR, 2002).

Figura 10: Estrutura molecular do Eugenol (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/e51791?lang=pt®ion=BR>)

Os compostos mais conhecidos por sua atividade antimicrobiana são os fenóis, os terpenos e os aldeídos que agem alterando a concentração de ácidos graxos na membrana celular microbiana e, conseqüentemente, causando danos em sua estrutura (DONSI, WANG e HUANG, 2011). A alta atividade antimicrobiana exibida pelos compostos fenólicos puros é atribuída à interação dos grupos hidroxilas característicos de suas moléculas com as células da membrana plasmática microbiana, causando danos irreversíveis como quebras, alterações no

perfil de ácidos graxos e fosfolipídios e alterando o metabolismo energético e síntese de material genético (DONSI et al., 2014).

Sob a forma de emulsões, é importante ressaltar a ligação existente entre a atividade antimicrobiana de fenóis e da maioria dos componentes de óleos essenciais e extratos com sua presença na fase aquosa, quanto maior a concentração de princípios ativos na forma de micelas na fase aquosa, maior sua atividade antimicrobiana, tal característica pode ser facilitada pela escolha do tensoativo ideal. Donsi et al. (2012) realizaram testes de atividade antimicrobiana de carvacrol, limoneno e cinamaldeído contra bactérias e leveduras, e demonstraram que quando a nanoemulsão continha proteínas como as da ervilha e lecitina como tensoativos não ocorria nenhuma inibição antimicrobiana, mas, quando as nanoemulsões continham ésteres de açúcar ou Tween® 20 e glicerol, as populações iniciais de microrganismos eram reduzidas. Mesmo o fato da membrana celular microbiana ter maior afinidade pelas proteínas e, consequentemente, ser mais permeável às nanoemulsões contendo proteínas como tensoativos, não foi suficiente para potencializar a atividade antimicrobiana de carvacrol cinamaldeído e limoneno quando nanoemulsionados, indicando a relevância da escolha ideal dos tensoativos.

Qiu et al. (2010) demonstraram os efeitos do eugenol na prevenção de contaminações, além de seu potencial antioxidante, pois, a estrutura do eugenol pode ser usada como estrutura básica para o desenvolvimento de drogas mais potentes para tratar infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes. Qiu et al. (2010) chegaram a esta conclusão após observar que o eugenol em concentração de 1mg/mL no teste de concentração mínima inibitória, causou decréscimo no crescimento microbiano após 30, 210 e 420 minutos (58,1%, 49,2% e 55,6%, respectivamente), ocorrendo ainda, hemólise das culturas sobrenadantes na concentração de 1/16 (v/v). Fortalecendo este fundamento, Gill e Holley (2004) testaram a ação bactericida do eugenol e demonstraram que o mesmo possui uma dose dependente de

efeito bactericida no crescimento da fase logarítmica das células de *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei*, após 15 minutos de exposição, nas concentrações de 5 e 6 mg/mL, respectivamente.

A adição de óleo de cravo em suco combinado de maçã e cenoura (previamente inoculado com microrganismo) inibiu a proliferação de *Kloeckera apiculata* e *Candida albicans* (IRKIN e KORUKLUOGU, 2009). A adição de eugenol em soja orgânica inibiu o crescimento de *Salmonella typhimurium* e *tennesse* na concentração de 0,5% (v/v) e *negev* a 2% (v/v) (aproximadamente 4,5 reduções logarítmicas) (YOSSA et al., 2011). Ressalta-se o fato de que, nos estudos de Yossa et al. (2011), o eugenol presente no óleo de cravo estava em concentrações baixas, e que o mesmo tem seus efeitos potencializados quando puro. Segundo Ordoñez et al. (2008) o uso de eugenol tem se mostrado eficiente quando adicionado em ração fornecida a galináceos que foram infectados com *Salmonella* entérica sorovar *enteritidis*. Após alguns dias de alimentação, Ordoñez et al. (2008) verificaram que os galináceos que consumiram o bioativo juntamente com a ração tiveram resultados negativos para infecção, ou ainda, negativo de infecção para os ovos produzidos, indicando a alta eficiência do eugenol também como aditivo alimentar.

2.9. Triclosan

Os métodos atuais de saneamento de instalações alimentícias têm desvantagens bem conhecidas como a toxicidade de agentes de limpeza devido à alta concentração necessária ou promoção de mecanismos de resistência microbiana. Outro problema particularmente desafiador em ambientes de processamento de alimentos é a presença de biofilmes e suas bactérias produtoras, pois, estas são mais resistentes aos antimicrobianos e desinfetantes comumente utilizados (TEIXEIRA et al., 2007), além das toxi-infecções e infecções

alimentares causadas por patógenos presentes nas mucosas e pele de manipuladores, visto que, estes são transferidos para os alimentos com condições de crescer e produzir toxinas que causam vários danos à saúde humana.

Como alternativa aos antisépticos clorados, o triclosan vem sendo adicionado há mais de 30 anos em produtos de higiene básica, porém, sua efetividade varia muito dependendo do meio de dispersão e concentração, portanto, faz-se necessário um estudo que demonstre uma formulação adequada para o uso como higienizador de mãos e superfícies (TANOMARU et al., 2008). Gautério et al. (2008) demonstraram que produtos de higiene contendo a mesma concentração de triclosan, mas, com formulações variadas têm valores distintos de concentração mínima inibitória.

Em se tratando de vida de prateleira e segurança alimentar o foco não pode ser unicamente nos componentes presentes no alimento e sua embalagem, mas, também, nos riscos associados a sua manipulação inadequada, pois, a pele humana é colonizada por diversas bactérias contaminantes de alimentos. A microbiota das mãos constitui-se de bactérias transitórias e residentes, e para higienizar as mãos dos manipuladores, a Organização Mundial de Saúde permite o uso de etanol, isopropanol ou n-propanol em concentrações entre 60 e 80%, a clorexidina em 0,5 a 4,0%, o hexaclorofórmio a 3,0%, o povidine-iodine de 7,5 a 10,0% e compostos de quaternário de amônia e triclosan de 0,2 a 2,0% (CUSTÓDIO et al., 2009).

O triclosan (2,4,4'-triclóro-2'-hidroxidifenil éter) é um composto antimicrobiano, não iônico, de baixa toxicidade e largo espectro de ação antimicrobiana e antiviral (AQUINO et al., 2004), possui um grupo fenol e átomos de cloro e é insolúvel em água, sendo comercialmente conhecido como Irgasan DP300 ou Irgacare (Figura 11).

Figura 11: Estrutura molecular do Triclosan (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/phr1338?lang=pt®ion=BR>).

Segundo Litz et al. (2007), a correta assepsia das mãos dos manipuladores na indústria de carnes constitui uma das etapas mais importantes que influenciam na qualidade microbiológica dos alimentos produzidos, já que, as mãos podem apresentar microrganismos deteriorantes e patogênicos que precisam ser removidos a fim de evitar sua veiculação aos alimentos, prejudicando sua vida de prateleira ou oferecendo riscos potenciais aos consumidores. Uma vez que não há padrões ou especificações para contagens microbianas em mãos de manipuladores de alimentos no Brasil, são sugeridos como níveis aceitáveis de contaminação contagens inferiores a 10^4 UFC/mão para mesófilos aeróbios, 10^2 UFC/mão para *Staphylococcus aureus* e 10^2 UFC/mão para *Escherichia coli*.

Liu et al. (2010) buscaram demonstrar a capacidade de inibição de crescimento de *Escherichia coli* por inibição da síntese de ácidos graxos pelo antiséptico triclosan e obtiveram resultados positivos. Deve-se salientar que seu uso em cosméticos e sabonetes é comum nos dias atuais, porém, com efeito de curta duração, a eliminação dos microrganismos se dá momentaneamente durante a lavagem de mãos sem a liberação constante do ativo ou sua presença na pele, visto que, a colonização dessa extensão é rápida, há possibilidade de contaminações dos alimentos manipulados em todo período de manipulação. Por essa questão, a obtenção de uma nanoemulsão de triclosan possibilitaria liberação prolongada e efeito duradouro contra esses microrganismos, sem causar ressecamento da pele.

A área que atualmente mais utiliza o triclosan é a odontologia, por meio da incorporação de pequenas quantidades em enxaguatórios bucais ou dentifrícios, no entanto, sempre em associação com outro antimicrobiano, pois, para exibir atividade bactericida a concentração do triclosan sozinho deve ser alta, se tornando inviável e não permitida pelas legislações vigentes (AQUINO et al., 2004).

Objetivos

3. Objetivos

O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento do processo de produção e a caracterização físico-química de nanoemulsões óleo/água com atividades antioxidante e/ou antimicrobiana.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Desenvolvimento de nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça, que para uso como aditivo alimentar e em matrizes biopoliméricas;
- Desenvolvimento de nanoemulsão de eugenol, reconhecidamente antioxidante, para uso em alimentos;
- Desenvolvimento de nanoemulsão de triclosan, como produto padrão para assepsia de mãos de manipuladores de alimentos e superfícies;
- Estudar a influência das variáveis de composição e de processo nos sistemas desenvolvidos: ordem de adição dos tensoativos e das fases aquosa e oleosa; velocidade e tempo de agitação em homogeneizador de alta velocidade; características dos materiais utilizados; temperatura de pré-emulsificação; relação tensoativo/óleo e relação fase oleosa/fase aquosa.
- Avaliar a estabilidade dos sistemas obtidos por testes de estabilidade preliminar e acelerada;

- Avaliar o potencial antioxidante dos sistemas obtidos;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos sistemas obtidos.

Material e Métodos

Figura 12: Fluxograma de Processo de Produção das Nanoemulsões.

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Material utilizado na produção das nanoemulsões

4.1.1.1. Princípios ativos:

- Eugenol 99% de pureza(Sigma Aldrich):

- ✓ Fenol ($C_{10}H_{12}O_2$) isolado de plantas condimentares como cravo, canela e pimenta.
- ✓ Sinônimos - 2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenol; 4-Allyl-2-methoxyphenol; 4-Allylguaiacol.
- ✓ Características: líquido amarelo claro de odor característico, ponto de fusão -12 a -10 °C, ponto de ebulição 254 °C, ponto de fulgor 112 °C, massa molecular 164.20 g/mol, Pressão de vapor < 0.1 hPa a 25 °C, Densidade relativa 1.067 g/cm³ a 25 °C, Coeficiente de partição n-octanol/água log Pow: 2.7 (Sigma).

- Triclosan (Reagen):

- ✓ Antisséptico sintético de amplo espectro contra bactérias, fungos e vírus ($C_{12}H_7Cl_3O_2$).
- ✓ Sinônimo: Irgasan DP 300.
- ✓ Características: pó branco fino de odor característico de massa molecular 289,54 g/mol, ponto de fusão entre 55 e 60 °C, solúvel em muitos solventes orgânicos e soluções alcalinas e insolúvel em água (Reagen) .

4.1.1.2. Fases oleosas:

- Óleo de soja:

- ✓ Óleo refinado vegetal alimentar (Liza).

- Óleo mineral:

- ✓ Produto de origem mineral derivado do petróleo de grande compatibilidade com a pele.
- ✓ Sinônimos: vaselina líquida.

- ✓ Características: líquido incolor insolúvel em água, ponto de fulgor 180 °C, temperatura de decomposição acima de 300 °C (Vetec).
- Óleo de girassol: óleo vegetal alimentar (Liza).
- Pimenta dedo-de-moça:
 - ✓ Nome científico: *Capsicum baccatum*;
 - ✓ Comprada no mercado local;
 - ✓ Coloração vermelha (frutos maduros).

4.1.1.3. Tensoativos não iônicos:

4.1.1.3.1. Tensoativos hidrofílicos

- Tween 20®:
 - ✓ Monolaurato de polioxietilenosorbitano.
 - ✓ Características: líquido amarelo claro viscoso, massa molecular 1,225 g/mol, valor de HLB 16,7 (Sigma) (Figura 13).

Figura 13: Estrutura molecular do tensoativo Tween 20® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p9416?lang=pt®ion=BR>)

- Tween 40®:

- ✓ Monopalmitato de polioxietilenosorbitano.
- ✓ Características: líquido amarelo claro viscoso, ponto de fulgor > 113 °C, valor de HLB 15,6 (Sigma) (Figura 14).

Figura 14: Estrutura molecular do tensoativo Tween 40® (Fonte: <http://www.foods-additive.com/category/Tween-40.htm>).

- Tween 60®:

- ✓ Monoestearato de polioxietilenosorbitano.

Características: líquido amarelo escuro viscoso e opaco, ponto de fulgor > 113 °C, massa molecular 1311,70 g/mol, valor de HLB 14,6 (Sigma) (Figura 15).

Figura 15: Estrutura molecular do tensoativo Tween 60® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w291609?lang=pt®ion=BR>).

- Tween 80®:

- ✓ Monooleato de polioxietilenosorbitano, polisorbato 80.
- ✓ Características: líquido amarelo viscoso, ponto de fulgor > 113 °C, massa molecular 1.310 g/mol, valor de HLB 15 (Sigma) (Figura 16).

Figura 16: Estrutura molecular do tensoativo Tween 80® (Fonte: [http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/\(webtds2\)/103168](http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/(webtds2)/103168)).

4.1.1.3.2. Tensoativos lipofílicos:

- Span 20®:

- ✓ Monolaurato de sorbitano.
- ✓ Características: sólido, massa molecular 346,47 g/mol, valor de HLB 8,6 (Sigma) (Figura 17).

Figura 17: Estrutura molecular do tensoativo Span 20® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s6635?lang=pt®ion=BR>).

- Span 40®:

- ✓ Monopalmitato de sorbitano.
- ✓ Características: cristais de coloração ligeiramente bege, massa molecular 402,58 g/mol valor de HLB 6,7 (Sigma) (Figura 18).

Figura 18: Estrutura molecular do tensoativo Span 40® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/85545?lang=pt®ion=BR>).

- Span 60®:

- ✓ Monoestearato de sorbitano.

Características: pó bege, massa molecular 430,63 g/mol, valor de HLB 4,7 (Sigma) (Figura 19).

Figura 19: Estrutura molecular do tensoativo Span 60® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s7010?lang=pt®ion=BR>).

- Span 80®:

- ✓ Monooleato de sorbitano.

Características: líquido castanho escuro viscoso, massa molecular 428,62 g/mol, valor de HLB 4,3 (Sigma) (Figura 20).

Figura 20: Estrutura molecular do tensoativo Span 80® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s6760?lang=pt®ion=BR>).

4.1.1.4. Aditivos

- Polietilenoglicol:

- ✓ PEG 1500.
- ✓ Características: cristais de coloração branca (Figura 21) (Sigma).

- ✓ 1,2,3-Propanetriol
- ✓ Características: líquido incolor inodoro, massa molecular 92,09 g/mol (Figura 22) (Sigma).

- Água destilada.

Capacidade de seqüestro do radical DPPH•

- Radical livre DPPH•:

- ✓ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl.
- ✓ Características: pó de massa molecular 394.32 g/mol (Figura 23) (Sigma).

Figura 23: Estrutura molecular do radical DPPH• (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=pt®ion=BR>).

Capacidade de seqüestro do radical ABTS•+.

- ABTS•+:

- ✓ 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), Diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate).
- ✓ Características: sólido, massa molecular 548,68 g/mol (Figura 24) (Sigma).

Figura 24: Estrutura molecular do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1888?lang=pt®ion=BR>).

- Trolox:

- ✓ ácido $(\pm)$ -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico.
- ✓ Características: pó de coloração bege, massa molecular 250,29 g/mol (Figura 25) (Sigma).

Figura 25: Estrutura molecular do Trolox® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=pt®ion=BR>).

- Persulfato de Potássio: pó, massa molecular 270,3 g/mol (Sigma).

4.1.3. Atividade antibacteriana:

- Caldo e Agar Infusão Cérebro-Coração (BHI): meio recomendado para o cultivo de bactérias patogênicas fastidiosas, leveduras e bolores, altamente nutritivo, suporta o crescimento abundante de uma grande variedade de microrganismos (Himedia).
- Agar Müeller Hinton (MH): meio recomendado para testes de susceptibilidade a antimicrobianos por difusão de agentes impregnados em discos de papel através de um gel de Agar, como descrito pelos Padrões Aprovados pela NCCLS (Himedia).
- Cloranfenicol: antibiótico de referência comprado em farmácia de manipulação local.
- Corante celular I8377:
 - ✓ 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride.
 - ✓ Características: pó amarelo claro, peso molecular 505,70 g/mol (Figura 26) (Sigma).

Figura 26: Estrutura molecular do corante celular I8377® (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/i8377?lang=pt®ion=BR>).

4.2. Métodos

4.2.1. Produção de extrato de pimenta dedo-de-moça

Pimenta dedo-de-moça seca por 24 horas em estufa 60 °C (Fanem, Brasil) foi dissolvida em óleo de soja comercial a 85 °C. A mistura (6% m/v) foi agitada mecanicamente por 1h30min e o extrato foi mantido refrigerado em vidro âmbar por três meses para liberação de compostos.

4.2.2. Produção das nanoemulsões

4.2.2.1. Método de emulsificação

Foram desenvolvidos sistemas coloidais contendo diferentes princípios ativos: eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça. As nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça foram produzidas por emulsificação de alta energia em duas etapas, na primeira, a fase oleosa contendo Span e princípio ativo foi vertida sob a fase aquosa contendo Tween, e a mistura foi homogeneizada em homogeneizador de alta velocidade por períodos e velocidades estabelecidos nos estudos preliminares (4.2.3.). Ambas as fases foram aquecidas, separadamente, em banho 40 °C por 30 minutos. A concentração de fase lipídica, fase aquosa, concentração de princípio ativo e mistura de tensoativos foram fixadas em 2; 96,75; 0,25 e 1% (m/m) para as nanoemulsões de eugenol e triclosan. Para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça o princípio ativo incorporado à fase oleosa representou 2% (m/m) do sistema, a fase aquosa e mistura de tensoativos foram 97 e 1%, respectivamente. A segunda etapa consistiu do uso de homogeneizador de alta pressão

(Nuzzle Z5, NanoDeBEE, Bee International, USA) para redução de tamanho médio de gota. Durante esses experimentos, os produtos foram resfriados colocando-se bolsas de gelo sobre a geometria do homogeneizador. O número de ciclos variou de 5 a 20 e a pressão de trabalho de 7000 a 22000 psi.

4.2.3. Estudos preliminares

4.2.3.1. Determinação do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)

O valor de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) ideal para as nanoemulsões foi determinado com base no componente majoritário de cada fase oleosa, ou seja, óleo mineral para emulsões com eugenol e triclosan e óleo de soja para emulsões contendo extrato de pimenta dedo-de-moça. Com auxílio da Equação 1, calcularam-se diferentes concentrações de tensoativos das famílias Tween® (20, 40, 60 e 80) e Span® (20, 40, 60 e 80) de forma a se obter misturas com valores de HLB entre 6 e 15 (Tabela 1), faixa ideal para obtenção de nanoemulsões O/A estáveis (LIU et al., 2010).

$$\text{HLB}_{\text{mix}} = (\text{HLBT}) (T) + (\text{HLBS}) (S\%), \quad (1)$$

Onde, HLBT, HLBS and HLBmix são valores de HLB do Tween®, Span® e a mistura, respectivamente, e T% e S% a porcentagem em massa de cada tensoativo.

Dispersões contendo 5% (m/m) de tensoativos, 10% (m/m) de óleo de soja ou óleo mineral, sem princípio ativo, e 85% (m/m) de água ultrapura foram preparadas segundo metodologia de Prista et al. (1992), com modificações (emulsões preparadas sem

aquecimento). Cada mistura de tensoativos foi adicionada a água ultrapura e, após 24 horas o óleo foi vertido lentamente sob agitação magnética constante por cerca de 20 minutos. Os sistemas foram deixados em repouso por 24 horas e avaliados visualmente, sendo o valor de HLB ideal correspondente ao valor de HLB da dispersão que apresentou a maior estabilidade visual, ou seja, menor separação de fases. Após estabelecer a faixa ideal, diferentes misturas de tensoativos foram testadas para avaliar a influência da suas estruturas químicas sobre a fase oleosa.

Tabela 1: Cálculos de valor de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) de misturas de tensoativos, onde massa total corresponde a 5% (m/m) do volume final da emulsão.

Tensoativo A	Tensoativo B	HLB de A	HLB de B	Massa de A (g)	Massa de B (g)	Massa total (g)	HLB da mistura
Tween 20	Span 20	16,7	8,6	0,5	2	2,5	10,22
Tween 20	Span 40	16,7	6,7	0,5	2	2,5	8,7
Tween 20	Span 60	16,7	4,7	0,5	2	2,5	7,1
Tween 20	Span 80	16,7	4,3	0,5	2	2,5	6,78
Span 20	Tween 20	8,6	16,7	0,5	2	2,5	15,08
Span 40	Tween 20	6,7	16,7	0,5	2	2,5	14,7
Span 60	Tween 20	4,7	16,7	0,5	2	2,5	14,3
Span 80	Tween 20	4,3	16,7	0,5	2	2,5	14,22
Tween 40	Span 20	15,6	8,6	0,5	2	2,5	10
Tween 40	Span 40	15,6	6,7	0,5	2	2,5	8,48
Tween 40	Span 60	15,6	4,7	0,5	2	2,5	6,88
Tween 40	Span 80	15,6	4,3	0,5	2	2,5	6,56
Span 20	Tween 40	8,6	15,6	0,5	2	2,5	14,2
Span 40	Tween 40	6,7	15,6	0,5	2	2,5	13,82
Span 60	Tween 40	4,7	15,6	0,5	2	2,5	13,42
Span 80	Tween 40	4,3	15,6	0,5	2	2,5	13,34
Tween 60	Span 20	14,9	8,6	0,5	2	2,5	9,86
Tween 60	Span 40	14,9	6,7	0,5	2	2,5	8,34
Tween 60	Span 60	14,9	4,7	0,5	2	2,5	6,74
Tween 60	Span 80	14,9	4,3	0,5	2	2,5	6,42
Span 20	Tween 60	8,6	14,9	0,5	2	2,5	13,64
Span 40	Tween 60	6,7	14,9	0,5	2	2,5	13,26
Span 60	Tween 60	4,7	14,9	0,5	2	2,5	12,86
Span 80	Tween 60	4,3	14,9	0,5	2	2,5	12,78
Tween 80	Span 20	15	8,6	0,5	2	2,5	9,88
Tween 80	Span 40	15	6,7	0,5	2	2,5	8,36
Tween 80	Span 60	15	4,7	0,5	2	2,5	6,76
Tween 80	Span 80	15	4,3	0,5	2	2,5	6,44
Span 20	Tween 80	8,6	15	0,5	2	2,5	13,72
Span 40	Tween 80	6,7	15	0,5	2	2,5	13,34
Span 60	Tween 80	4,7	15	0,5	2	2,5	12,94
Span 80	Tween 80	4,3	15	0,5	2	2,5	12,86
Span 20	Span 80	8,6	4,3	0,5	2	2,5	5,16
Span 40	Span 60	6,7	4,7	0,5	2	2,5	5,1
Span 40	Span 80	6,7	4,3	0,5	2	2,5	4,78
Span 60	Span 80	4,7	4,3	0,5	2	2,5	4,38
Tween 20	Tween 40	16,7	15,6	1	1,5	2,5	16,04
Tween 20	Tween 60	16,7	14,9	1	1,5	2,5	15,62
Tween 20	Tween 80	16,7	15	1	1,5	2,5	15,68
Tween 20	Tween 40	16,7	15,6	1,5	1	2,5	16,26
Tween 20	Tween 60	16,7	14,9	1,5	1	2,5	15,98
Tween 20	Tween 80	16,7	15	1,5	1	2,5	16,02
Tween 40	Tween 60	15,6	14,9	1	1,5	2,5	15,18
Tween 40	Tween 80	15,6	14,9	1,5	1	2,5	15,32
Tween 40	Tween 80	25,6	15	1	1,5	2,5	19,24
Tween 40	Tween 80	15,6	15	1,5	1	2,5	15,36
Tween 60	Tween 80	14,9	15	1	1,5	2,5	14,96
Tween 60	Tween 80	14,9	15	1,5	1	2,5	14,94

4.2.3.2. Influência das variáveis de processo

4.2.3.2.1. Influência da ordem de adição dos tensoativos e das fases aquosa e oleosa

Determinou-se a ordem de adição dos tensoativos mais adequada para uma emulsificação rápida e eficiente das nanoemulsões contendo apenas óleo de soja e óleo mineral, sem princípio ativo. Quatro ordens de adição foram testadas:

A – mistura de tensoativos adicionada à fase aquosa vertidas sob fase oleosa;

B - mistura de tensoativos adicionados a fase oleosa vertidas sob fase aquosa;

C - tensoativo hidrofílico Tween na fase aquosa vertidos sob tensoativo lipofílico Span na oleosa;

D – tensoativo lipofílico Span na oleosa vertidos sob tensoativo hidrofílico Tween na fase aquosa.

A melhor ordem de adição dos tensoativos foi escolhida como sendo a de menor formação de espuma durante o preparo da emulsão e menor separação de fases (GULLAPALI e SHETH, 1999).

4.2.3.2.2. Influência da velocidade e tempo de agitação

A influência de velocidade e tempo de agitação em homogeneizador de alta velocidade (Ultra Turrax®, T25, IKA, Alemanha) na diminuição de tamanho de gota na etapa de pré-mistura foi avaliada. A melhor combinação foi determinada com base nas medidas de

tamanho médio de gota e polidispersidade (PDI) analisadas em equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

4.2.3.2.3. Influência das características dos materiais utilizados

Analisou-se a influência da geometria do tubo utilizado em homogeneizador de alta velocidade. Dois tubos, diâmetro e altura de 4,4 x 24,8 cm e 2,7 x 11,5 cm foram testados, assim como, a movimentação durante a pré-homogeneização em homogeneizador de alta velocidade, os parâmetros avaliados foram tamanho médio de gota e PDI.

4.2.3.2.4. Influência da temperatura de pré-emulsificação

Avaliou-se a influência de três temperaturas distintas para melhor solubilização dos componentes para a fase de pré-mistura em homogeneizador de alta velocidade:

- Sob temperatura ambiente, a fase oleosa contendo Span foi vertida sob a fase aquosa contendo Tween sem aquecimento das fases;
- Com aquecimento de ambas as fases em separado nas temperaturas de 40 e 60 °C.

4.2.3.2.5. Influência da adição de glicerol e polietilenoglicol (PEG) e alteração de fase oleosa

Diferentes concentrações de glicerol e polietilenoglicol (PEG) foram adicionadas à fase aquosa para avaliar o efeito da viscosidade na diminuição de tamanho médio de gota. O efeito de diferentes óleos vegetais como o óleo de girassol também foi analisada. As emulsões

foram preparadas conforme o item 4.2.2.1., e, avaliadas quanto aos parâmetros de tamanho médio de gota e polidispersidade (PDI) em equipamento de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

4.2.3.2.6. Influência da relação tensoativo/óleo e da relação fase aquosa/fase oleosa

A relação óleo/tensoativo foi investigada mantendo-se fixa a concentração da mistura de Tween® e Span® de 1% (m/m) e alterando-se a de óleo de soja ou óleo mineral de 1 a 10% (m/m), a concentração de água ultra pura variou de maneira a completar 100% (m/m) da emulsão. Para avaliar o efeito do sinergismo entre a relação óleo/tensoativo e relação fase oleosa/fase aquosa, ambos os componentes, óleo e tensoativo, variaram entre 1 e 3% e 2,5 e 10% (m/m), respectivamente.

4.3. Otimização por Planejamento Experimental

Uma metodologia de superfície de resposta (DANTAS et al., 2003) foi utilizada para avaliar os efeitos das pressões de trabalho e número de ciclos (variáveis independentes) sobre o tamanho médio de gota das nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça. Para isto, foi elaborado um delineamento composto central com fatorial completo de dois níveis com 3 pontos centrais no cubo e 3 pontos centrais na estrela, α : 1,41421, em 2 blocos com tamanho médio de gota como resposta, totalizando 14 experimentos. Para cada nanoemulsão foi realizada regressão por superfície de resposta e obtida equação do modelo linear ou quadrático. Os valores reais e codificados para as nanoemulsões de eugenol e para as nanoemulsões de triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça utilizados são apresentados nas

Tabelas 2 e 3, respectivamente. As análises foram realizadas no programa Minitab versão 17 (Minitab Inc, Estados Unidos).

Tabela 2: Condições testadas em delineamento experimental para a nanoemulsão de eugenol.

Ordem padrão	Ordem de corrida	Tipo de ponto	Pressão de trabalho (psi)	Número de ciclos
9	1	-1	11000	6
12	2	0	7500	6
8	3	-1	4000	6
13	4	0	7500	6
14	5	0	7500	6
10	6	-1	7500	2
11	7	-1	7500	11
4	8	1	10000	10
5	9	0	7500	6
7	10	0	7500	6
1	11	1	5000	3
6	12	0	7500	6
3	13	1	5000	10
2	14	1	10000	3

Tabela 3: Condições testadas em delineamento experimental para as nanoemulsões de triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça.

Ordem padrão	Ordem de corrida	Tipo de ponto	Pressão de trabalho (psi)	Número de ciclos
1	0	15000	6	194,7
2	0	15000	6	194,6
3	0	15000	6	195,4
4	1	20000	10	197,9
5	1	20000	3	187,7
6	1	10000	3	192,1
7	1	10000	10	188,4
8	-1	15000	2	188,2
9	-1	8000	6	190
10	0	15000	6	195,8
11	-1	22000	6	196,4
12	0	15000	6	194,7
13	-1	15000	11	193,3
14	0	15000	6	194,7

4.4. Testes de estabilidade por estresse térmico e força centrífuga

4.4.1. Estresse térmico

4.4.1.1. Aquecimento em banho-maria

Tubos do tipo eppendorfs contendo 2 mL de amostra foram mantidos em banho-maria a 70 e 90 °C por 30 minutos, sendo, posteriormente, resfriados a temperatura ambiente. Triplicatas de medidas de tamanho médio de gota, PDI e potencial zeta foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico após 24 horas e 7 dias (adaptado de YANG e McCLEMENTS, 2013).

4.4.1.2. Rampa de temperatura (gradiente de temperatura)

O efeito do estresse térmico na amostra submetida a gradientes de temperatura, que podem ocorrer por falhas na cadeia do frio, foi avaliado com uma rampa de resfriamento/aquecimento em termostato (CH-100, Cooling and Heating Thermostat, Biosan). Eppendorfs cônicos contendo 2 mL de nanoemulsão foram resfriados a 10 °C e aquecidos gradualmente até atingir 80 °C. A taxa de aquecimento foi de 10 °C a cada 30 minutos. Adicionalmente foi realizada uma rampa de temperatura iniciando em – 10 °C para avaliar a influência de temperaturas negativas.

4.4.1.3. Ciclos de aquecimento/resfriamento

Tubos tipo eppendorfs contendo amostras de 2 mL de cada nanoemulsão, não diluídas, foram submetidas a 6 ciclos de alteração de temperatura, segundo metodologia de Saranya, Chandrasekaran e Mukherjee (2012), com adaptações (48 horas modificado para 24 horas em cada temperatura). Cada ciclo consistiu em manter cada nanoemulsão em temperatura de refrigeração (4 °C) por 24 horas, e, em seguida, em estufa (45 °C) por mais 24 horas. Ao final de 48 horas (1 ciclo) foram realizadas medidas de tamanho médio de gota, PDI e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico.

4.4.1.4. Congelamento/Descongelamento (*Freeze-thaw*)

As amostras foram congeladas em freezer (Brastemp, Brasil) -20 °C por 22 horas e, em seguida, colocadas em banho-maria (Fanem, Brasil) a 30°C por 2 horas, perfazendo um ciclo de 24 horas. Ao final de cada ciclo foram realizadas medidas de tamanho médio de gota, PDI e potencial zeta e o processo foi repetido por 6 ciclos ou até ocorrer separação de fases e/ou cremeação (AOKI, DECKER e McCLEMENTS, 2005 e MUN et al., 2013).

4.4.2. Estresse de força centrífuga

Triplicatas de eppendorfs cônicos contendo 2 mL de amostra foram submetidos a diferentes velocidades (80 a 3050 g), em centrífuga com rotor de 7,1 cm (Mikro 120, Hettich, UK), durante 15 minutos e deixadas em repouso por 30 minutos. Foram realizadas análises de tamanho médio de gota, PDI e potencial zeta.

4.5. Testes de estabilidade ao armazenamento ao longo do tempo

As amostras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C), temperatura ambiente (25 °C) e estufa (37 °C), uma alíquota foi analisada nos intervalos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Foram realizadas medidas de tamanho médio de gota, PDI e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico.

4.6. Índice de Maturação de Ostwald

Para elucidar qual o mecanismo responsável pela instabilidade no tamanho das gotas ao longo da estocagem foi utilizada a teoria Lifshitz-Slezov e Wagner (LSW), onde o índice ou taxa de maturação de Ostwald foi calculada pela Equação 2 (NAZARZADEH et al., 2013; WOOSTER et al., 2008):

$$\omega = dr^3/dt \quad (2)$$

onde:

ω = taxa de maturação de Ostwald;

r = raio da gota;

t = tempo.

Esta teoria pode ser simplificada pelo indicativo de linearidade por meio do coeficiente de regressão (r^2) da equação da reta do raio da gota ao cubo ao longo do tempo (BERNARDI et al., 2011).

4.7. Microscopia de força atômica

Microscopia de força atômica (AFM) foi empregada para caracterização da gota em relação ao formato e morfologia de superfície e confirmação de resultados de tamanho obtidos por espalhamento de luz dinâmico. Uma gota de nanoemulsão diluída 1:10 (v/v) em água ultrapura foi colocada sob lamínula e deixada em repouso por 24 horas em temperatura ambiente para adsorção na superfície. As amostras foram observadas em “Tapping Mode” utilizando um microscópio Multimode, Digital Instruments, controlador NanoScope III, pontas modelo NCHV, Bruker, no Laboratório de Materiais, Escola de Ciências, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

4.8. Crio-Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de crio-microscopia eletrônica de varredura (Crio-MEV) foi utilizada como ferramenta complementar para caracterizações morfológicas e de tamanho médio de gota. Com auxílio de uma grelha de microscopia, uma gota de nanoemulsão não diluída foi mergulhada em N₂ líquido por 30 segundos e transferida, sob vácuo, para a câmara de preparação (Gatan Alto 2500, UK), onde foi fraturada e sublimada durante 3 minutos a – 90 °C e, em seguida, revestida com Au/Pd por pulverização iônica sob uma corrente de 12mA durante 40 segundos. As imagens foram obtidas à – 150 °C por um microscópio eletrônico de varredura com microanálise por raios X e sistema de observação a baixas temperaturas (JEOL JSM 6301F / Oxford INCA Energy 350, Japão) no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálises por Raios X, inserido no Centro de Materiais da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

5. Caracterização das nanoemulsões

5.1. Determinação do tamanho de gota, polidispersidade e do potencial zeta.

O diâmetro médio das gotas, distribuição de tamanho e polidispersidade (PDI) foram mensurados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), e o potencial zeta por microeletroforese Doppler a laser. Dois equipamentos foram utilizados, um analisador Zetasizer – Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) e um ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Uma gota de nanoemulsão foi diluída em água ultrapura até completar o volume da cubeta de medição, as medidas foram feitas em triplicata. Para o potencial zeta uma gota de nanoemulsão foi diluída em solução 1mM de KCL.

5.2. Cor

Valores do sistema CIELab L^* , a^* e b^* (luminosidade, variação de verde a vermelho, variação de azul a amarelo, respectivamente) foram obtidos por um colorímetro portátil CR-400 (Konica Minolta Optics, Japão) e por um colorímetro MiniScan EZ (Hunterlab), ambos com acessório para líquidos. O índice de brancura baseado nestes valores foi calculado, segundo Vargas et al. (2008), pela Equação 3:

$$IB = 100 - ((100 - L^*)^2 + (a^{*2} + b^{*2}))^{0,5} \quad (3)$$

Onde:

IB = índice de cor branca;

L^* = luminosidade;

a* = variação de verde e vermelho;

b* = variação de azul e amarelo.

5.3. Análise do comportamento reológico por curvas de escoamento

O perfil reológico foi investigado por curvas de fluxo das nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça. As curvas foram obtidas em temperatura de 4 e 25 °C usando um reômetro de tensão controlada (AR2000 Advanced Rheometer, TA Instruments, New Castle DE, EU) equipado com uma geometria de cilindros concêntrico de parede dupla (raio interno = 16,0 mm, raio externo = 17,5 mm, altura = 53 mm e *gap* (separação) = 2000 µm). Para cada ensaio foram usados aproximadamente 12 ml de amostra, sendo analisadas para taxas de cisalhamento ascendente e descendente entre 0 e 100 s⁻¹, com duração de 2 minutos cada rampa (JORGE et al., 2014; MORAES et al., 2009; PERESSINI et al., 2003). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

5.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para obtenção de espectros na região de infravermelho foi utilizado o espectrômetro FTIR com acessório para líquidos UATR, Perkin Elmer, com resolução 4 cm⁻¹ na região espectral 4000 a 400 cm⁻¹ em modo automático. Após calibração do equipamento, algumas gotas de nanoemulsão sem diluição foram depositadas com uma pipeta Pasteur entre os discos próprios para líquidos (vedação da amostra contra luz externa) criando um filme fino, duplicatas de espectro foram coletadas e analisadas no computador acoplado com software do equipamento Spectrum (adaptado de VLACHOS et al., 2006).

5.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A determinação das propriedades térmicas das nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça e dos princípios ativos puros (eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça) foram analisados com calorímetro diferencial de varredura (modelo DSC TA2010) controlado por um sistema TA5000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). As amostras, pesadas ($\pm 0,01$ mg) em balança de precisão (Ohaus, Analytical Plus) em cápsulas de alumínio, seladas hermeticamente, foram aquecidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, entre 0 e 100°C para as nanoemulsões e entre -200 e $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ para os compostos puros, em corrida dupla, sempre após resfriamento com nitrogênio líquido, em atmosfera inerte ($45\text{ mL}/\text{minuto}$ de N_2) (GONTARD e RING, 1996; SOBRAL et al., 2001). A referência foi uma cápsula vazia. O equipamento foi calibrado com uma amostra de índio ($T_m = 156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta H_m = 28,71\text{ J.g}^{-1}$) (TA Instruments).

Nas análises dos resultados, quando pertinentes, a temperatura de transição vítrea (T_g) foi calculada como o ponto de inflexão da linha de base e a temperatura de fusão, como o pico endotérmico na curva de fluxo do termograma, utilizando-se em ambas, o programa Universal Analysis V1.7F (TA Instruments).

5.6. Medida de Tensão Superficial e Tensão Interfacial

As medidas de tensão superficial (entre o líquido-nanoemulsão e o ar) e de tensão interfacial (entre a fase aquosa e a fase oleosa) foram determinadas com um tensiômetro de balanço Du Noüy pelo método do anel segundo metodologia proposta por Persson et al. (2014). O valor de tensão interfacial foi fornecido pelo equipamento com base na equação $\gamma = aS + b$, as variáveis a e b consistem na calibração com massas conhecidas, a calibração é feita

automaticamente pelo equipamento pela inserção do valor da diferença de densidade entre as fases. Os valores de densidade das fases aquosas e oleosas foram mensuradas em equipamento DMA4500 (Anton Paar).

Para medir a tensão superficial, 20 mL de nanoemulsão foi colocada dentro do cilindro interno e o anel de platina foi imerso até metade do volume, durante a subida foi mensurada a força necessária para desprender um anel de platina da superfície (ar) através do braço de uma balança ou torção provocada em um fio. Para as medidas de tensão interfacial colocou-se o mesmo volume de fase aquosa (fase pesada), na qual, o anel de platina foi imerso em uma profundidade de 4-5 mm, em seguida, a fase leve (oleosa) foi gotejada o mais próximo possível, mas sem contato, na fase aquosa até que ambas as fases tivessem o mesmo volume, após 30-90 segundos de equilíbrio as tensões foram medidas entre a interface líquido/líquido. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

5.7. pH

O pH das nanoemulsões foi determinado com pHmetro digital (Digimed) por imersão direta do eletrodo na nanoemulsão, em triplicata.

6. Testes de atividades de interesse das nanoemulsões

6.1. Avaliação da atividade antioxidante

6.1.1. Capacidade de seqüestro do radical DPPH•

A atividade antioxidante foi determinada por meio da capacidade dos antioxidantes presentes nas nanoemulsões em seqüestrar o radical estável DPPH•, de acordo com a metodologia de Brand-Williams et al. (1995), com modificações de metanol para etanol. Uma alíquota de 10 mL de solução estoque de DPPH (0,024 g do reagente DPPH em 100 mL de etanol) foi misturada a 45 mL de etanol e a absorbância da mistura foi determinada a 517 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer. Uma alíquota de 0,5 mL da solução de amostras (50 mg de nanoemulsão dissolvidas em 3 mL de etanol) foi homogeneizada com 2,5 mL da solução etanólica de DPPH•. Para o controle 0,5 mL de etanol foram adicionados em 2,5 mL de solução etanólica de DPPH•. A reação foi conduzida na ausência de luz à temperatura ambiente e as absorbâncias foram determinadas em função do tempo (o tempo foi determinado em testes preliminares). O cálculo da atividade antioxidante (AA) foi realizado com a equação (4).

$$AA \% = \left[\frac{(A \text{ controle} - A \text{ amostra})}{(A \text{ controle})} \right] 100 \quad (4)$$

Onde: AA = porcentagem de sequestro de radicais livres; A amostra = valor da absorbância da amostra e A controle = valor da absorbância do controle.

A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50 % é denominada concentração eficiente (CE50 ou EC50).

6.1.2. Capacidade de seqüestro do radical ABTS•+

A atividade antioxidante das nanoemulsões pelo método do seqüestro do radical livre ABTS•+ (2,20-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) das nanoemulsões de eugenol e extrato de pimenta dedo-de-moça foi determinada de acordo com Re et al. (1999), com adaptações, de 30 para 50 µL de amostra. A solução do radical ABTS (7 mM) foi adicionada a uma solução de persulfato de potássio (2,45 mM) diluída em água destilada e, mantida no escuro à temperatura ambiente durante 16 h. Esta solução foi diluída em etanol até obter uma absorbância próxima de 0,70 em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm. Em seguida, 50 µL da nanoemulsão foram adicionados a 3000 µL da solução de trabalho do radical ABTS e, incubada durante 10 minutos no escuro. Após este período a absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm. Foi construída uma curva padrão de trolox para expressar a atividade antioxidante em trolox equivalente (TEAC). A diluição ideal das nanoemulsões foi determinada nos testes preliminares.

6.2. Atividade antibacteriana

A ação antimicrobiana das nanoemulsões foi avaliada com técnicas de poço-difusão em Agar (adaptado de DUARTE et al., 2003; MARTIN et al., 2012 e NCCLS, 2003) e microdiluição em caldo (adaptado de Alves et al., 2008 e NCCLS, 2003). As bactérias utilizadas foram as cepas padrões ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (produtora de biofilme), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

Em 10 mL de caldo infusão cérebro-corção (BHI) foi semeada uma alíquota de 100 µL de uma cepa padrão American Type Culture Collection (ATCC) e incubada em estufa 37

°C por 16 – 24 horas, as cepas foram armazenadas sob congelamento em 30% de glicerol até o momento da reativação. Após incubação por 24 horas a 37 °C, cada cepa foi diluída em caldo BHI até obter um valor de absorbância entre 0,08 e 0,10, compatível ao padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ cels/mL) confirmadas por cultivo de uma alíquota e contagem de colônias após 24 horas, as suspensões foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm.

As diluições foram utilizadas sem filtração e após filtração com filtro de seringa 0,22 µm.

6.2.1. Teste de susceptibilidade pelo método de poço-difusão

Diluições em água ultra pura das nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça foram preparadas de forma a se obter concentrações finais de 100, 50, 25, 12, 6 e 3% (v/v). Agar Muller Hinton foi preparado, autoclavado e resfriado até atingir temperatura de 45-50 °C, e, para cada 100 mL de meio em estado líquido acrescentou-se 100 µL da suspensão ajustada da bactéria desejada (correspondente a $1,5 \times 10^5$ UFC/mL) e homogeneizou-se com movimentos suaves. Com a extremidade de uma ponteira de 1000 µL estéril foram feitos poços de 8 mm de diâmetro, afundando-se a ponta de encaixe no meio e retirando-se em seguida. Excedentes de meio no centro dos poços foram removidos com a ponta de menor diâmetro de ponteiras de 100 µL estéreis. Em cada poço adicionou-se 40 µL de cada concentração a ser testada, sendo, um deles o controle negativo (água ultra pura e óleo de soja ou mineral) e no centro cloranfenicol na concentração de 2,5 mg/mL como controle positivo. As placas foram deixadas em repouso por 1h para difundir as nanoemulsões e, em seguida, incubadas sem serem invertidas a 37 °C por 24 horas. A leitura das duplicatas consistiu na medição com régua de possíveis halos de inibição que indicaram sensibilidade ao composto testado.

6.2.2. Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A menor concentração que apresentou halos de inibição maiores que 20 mm no teste de poço-difusão foi escolhida como a mais alta a ser submetida ao teste de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB), a diluição das nanoemulsões em água ultrapura esterilizada foi utilizada no mesmo dia de preparo (baseado em Alves et al, 2008 e NCCLS, 2003). As suspensões bacterianas compatíveis ao padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram diluídas 1:10 (v/v) de forma a se obter concentração final de 10^7 UFC/mL.

Com auxílio de uma pipeta multicanal pipetou-se 95 µL de caldo BHI nas colunas 1 a 11 em placas de microdiluição de 96 poços com fundo “U” estéreis, e 55 µL de caldo BHI na coluna 12. Em seguida, 95 µL da nanoemulsão 2x a concentração pretendida foram acrescentados no primeiro poço, sendo esta, a primeira diluição correspondente a 0,75 µg/mL, com auxílio de uma pipeta multicanal transferiu-se 95 µL do primeiro poço para o segundo, as diluições seriadas prosseguiram até o poço 10. O poço 11 foi o controle negativo e o poço 12 recebeu 40 µL de cloranfenicol 2,5 mg/mL, sendo, o controle positivo. Foi acrescentada uma alíquota de 5 µL das suspensões bacterianas (10^7 UFC/mL) em todos os poços, cada linha correspondente a uma bactéria, resultando na concentração final de inóculo de 10^4 UFC/mL, as placas foram homogeneizadas com movimentos suaves, seladas com adesivo e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, 40 µL de corante de células (2 mg/mL) foi acrescentado a todos os poços e a microplaca foi incubada por 3 horas em estufa 37 °C, os poços com crescimento adquirem coloração roxa intensa, a diluição anterior a menor diluição sem crescimento é considerada a concentração inibitória mínima, com auxílio de pipeta multicanal

transferiu-se uma alíquota de 7 µL de todos os poços anteriores até o poço correspondente ao valor CMI para uma placa de Agar BHI e incubou-se por 24 horas em estufa 37 °C, a concentração anterior a menor concentração que não apresentou crescimento foi considerada a CMB.

6.3. Análises estatísticas

Todos os valores presentes nesta tese foram demonstrados na forma de média dos dados e desvio padrão. Os resultados experimentais de todas as nanoemulsões dos testes (preliminares, estabilidade por estresse e força centrífuga, estabilidade ao armazenamento ao longo do tempo, testes de atividade antioxidante e antibacterina) foram analisados análise de variância (ANOVA) e teste múltiplo de Tukey no intervalo de 95% de confiança para as amostras que apresentaram diferenças significativas na ANOVA.

Para o desenho experimental das nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça utilizou-se um delineamento composto central com pontos centrais e axiais, por superfície de resposta. Os dados foram analisados com séries temporais, gráficos de efeitos principais e efeitos de interação, análises de regressão para obtenção de modelo linear ou quadrático no intervalo de confiança de 95%. Para análise das condições utilizadas obteve-se gráficos de contorno e superfície de resposta.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software Minitab versão 17.

Resultados e Discussão

7. Resultados e Discussão

7. 1. Experimentos preliminares

7.1.1. Desenvolvimento das nanoemulsões

7.1.1.1. Determinação do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)

Griffin (1949) foi o primeiro pesquisador a criar uma técnica baseada no balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) para a escolha ideal de tensoativos para se obter o tipo de emulsão desejada, óleo/água (O/A) ou água/óleo (A/O). O método partia do princípio de que, a despeito de todo tensoativo ser uma molécula anfifílica (conter grupos hidrofóbicos e hidrofílicos), sua maior afinidade pela fase aquosa ou oleosa seria determinante para formar emulsões estáveis. Valores de HLB elevados tendem a formar emulsões do tipo O/A, enquanto valores baixos formam emulsões do tipo A/O. Apesar de útil, o método tinha muitas considerações empíricas e era necessário conhecer a estrutura química dos componentes, o que levou ao seu aprimoramento ao longo dos anos com o método direto, onde cálculos utilizando concentrações de misturas de tensoativos forneciam diferentes valores criando uma faixa onde o HLB ótimo era aquele no qual ocorreu a formação de uma emulsão sem separação de fases após 24 horas.

Pelo método direto foi observado quais emulsões se mantiveram visualmente estáveis após 24 horas de preparo, ou seja, sem aparente separação de fases ou cremeação (Figura 27). Emulsões de óleo mineral, visualmente estáveis, foram obtidas em HLB 8,6 e 9,1, concordando com resultados encontrados na literatura (GULLAPALLI e SHETH, 1999; LIU et al., 2010; TAKAMURA et al., 1979).

Figura 27: Emulsões com diferentes valores de HLB, a esquerda uma emulsão que sofreu separação de fases e a direita uma emulsão estável após 24 horas.

Análises de tamanho médio de gota auxiliam na triagem da melhor mistura de tensoativos. Observou-se menores tamanhos médios de gota para as emulsões de óleo mineral em HLB 9,1, após passagem por homogeneizador de alta pressão, sendo, por este motivo, o valor de HLB escolhido para o desenvolvimento das nanoemulsões de eugenol e triclosan (Tabela 4). Para o óleo de soja, os valores de HLB, nos quais, uma emulsão visualmente estável foi obtida, foram de 6,4 e 6,7, somente com Tween 80 e Span 80, sendo estes escolhidos inicialmente, entretanto, após a incorporação da pimenta dedo-de-moça e obtenção de seu extrato em óleo de soja, foi necessário um ajuste para 6,9. O valor de HLB está diretamente ligado à estrutura química da fase oleosa, portanto, o óleo de soja puro tem um valor de HLB distinto de quando está misturado com outros compostos. Quando os compostos da pimenta dedo-de-moça se ligaram ao óleo de soja ocorreu a formação de uma fase oleosa mista, misturas podem levar a fase oleosa a uma tendência mais hidrofóbica ou mais hidrofílica que uma fase oleosa composta por um óleo puro (SCHIMIDTS et al., 2009).

Tabela 4: Tamanho médio de gota das nanoemulsões de óleo mineral com diferentes valores de HLB.

Valor de HLB	Tamanho médio de gota (nm)	Polidispersidade
8,6	173 $\pm$ 3	0,084 $\pm$ 0,021
9,1	139 $\pm$ 1	0,096 $\pm$ 0,041
10,5	146 $\pm$ 2	0,155 $\pm$ 0,086
12,3	203 $\pm$ 8	0,373 $\pm$ 0,025

7.1.1.2. Escolha da mistura de tensoativos

Outro fator que pode influenciar a estabilidade de emulsões é a compatibilidade química entre o tensoativo e a fase oleosa. Diversos tensoativos podem ser utilizados para se obter um mesmo valor de HLB, porém, alguns tensoativos podem ser mais efetivos que outros, por este motivo, foram testados valores iguais ou próximos de HLB de tensoativos sozinhos e mistura de tensoativos hidrofílicos ou lipofílicos. Menor separação de fases e cremeação foram observadas quando os valores de HLB escolhidos eram obtidos de misturas de Tween 80® e Span 80® para a nanoemulsão de óleo de soja e Tween 40® e Span 80® para a nanoemulsão de óleo mineral.

Os dados para emulsões de óleo de soja em sistemas próximos ao utilizado são escassos na literatura, todavia, Schmidts et al. (2009) atribuíram a afinidade entre a mistura de Tween 80 e Span 80 e triglicerídeos vegetais, ao fato de que, ambos são ácidos graxos de cadeia longa com 18 átomos de carbono e uma ligação insaturada, formando uma camada interfacial mais estável em emulsões do tipo O/A.

Além da existência de afinidade entre óleos vegetais e determinadas misturas de tensoativos não-iônicos, Gullapali e Sheth (1999) demonstraram que óleos vegetais são muito sensíveis ao valor de HLB, óleo de oliva sofreu cremeação e separação de fases em HLB menor que 9 e em HLB maior que 10. Um dos tensoativos mais comumente utilizados na

indústria de alimentos é o Tween 80, que, por ser derivado de sorbitano polietoxilado e ácido oléico, é inodoro e insípido. Tween 80 possui estrutura molecular de 214 átomos, várias cabeças hidrofílicas e quatro moléculas hidrofílicas estendidas, sendo, uma delas uma cadeia de alceno, e, a parte hidrofóbica da molécula fica voltada para a água podendo formar micelas ou clusters dependendo de sua concentração (KARJIBAN et al., 2012).

Em contrapartida, foram encontrados diversos relatos sobre o desenvolvimento de emulsões estáveis contendo óleo mineral com diferentes combinações de tensoativos na faixa de HLB entre 9 e 14. Há pesquisadores que atribuem a estabilidade aos valores de HLB e não à estrutura química existente, entretanto, Takamura et al. (1979) estabeleceram que a distribuição de tamanhos dependia fortemente do uso de Span 20 e Tween 40, sendo confirmado por estudos de Shinoda, Yoneyama e Tsutsumi (1980), que atribuem a compatibilidade à diferença entre o HLB dos dois tensoativos, pois, quanto menor esta, menor as chances de enfraquecimento no filme interfacial por interações insuficientes.

Opostamente a estes estudos, o presente trabalho está em concordância com resultados obtidos por Boyd et al. (1972) que testaram diversas combinações de Tween e Span com valor de HLB 12, mas, buscaram otimizar o sistema apenas com base em considerações estéricas e concluíram que a substituição de Tween 20 por Tween 40 em combinação com Span 80 ocasionou melhora na estabilidade e distribuição de tamanho de gota, como já citado na Tabela 4.

Várias forças podem estar associadas à interação entre Tween e Span na interface das gotas, como forças de van der Waals, íon-dipolo ou dipolo-dipolo, no entanto, quando se trata da mistura específica entre Tween 40 e Span 80 há uma afinidade maior entre suas estruturas hidrofóbicas. Na presença de óleo mineral, as moléculas de Span 80 se orientam de forma que, cada cadeia de hidrocarboneto fique na interface e cada anel de sorbitano no lado aquoso e durante o estágio de emulsificação com o aumento da pressão na superfície, essas cadeias de

hidrocarbonetos são impedidas de se aproximar umas das outras devido à largura dos anéis de sorbitano, e é neste momento que as moléculas de Tween 40, que têm forte atração pela água devido às suas cadeias de polioxietileno, se orientam na interface deixando apenas uma parte de hidrocarbonetos na fase oleosa e a outra na fase aquosa. A porção hidrofóbica de Tween 40 que está no lado oleoso, por sua vez, penetra entre as moléculas de Span 80 adsorvidas, fazendo com que a distância entre as cadeias de hidrocarbonetos adjacentes seja reduzida aumentando a atração entre elas. Três das cadeias de hidrocarbonetos de Tween 40 se entrelaçam formando uma estrutura tipo gel que proporciona boa estabilidade contra a coalescência da gota, e, quando incorporamos Span 80 um mecanismo de estabilidade adicional é fornecido pela proximidade das cadeias de hidrocarbonetos compactadas de Tween 40 e Span 80 alternadas que estão no lado do óleo da interface, como consequência, o espaço criado nas imediações entre as gotas de óleo é tamanho que as cadeias de polioxietileno de Tween 40 são incapazes de se aproximar umas das outras através do meio aquoso, impedindo a união das gotas ou coalescência (Figura 28) (BOYD et al, 1972; TAKAMURA et al, 1979).

Figura 28: Representação da orientação de moléculas de Tween 40 e Span 80 na interface óleo-água (BOYD et al, 1972).

O mesmo acontece com outros tipos de Tween, como o 20, por exemplo, que tem cadeias de hidrocarbonetos mais curtas para o interior da gota, não se orientando corretamente. A interação de Tween 40 e Span 80 com óleo mineral cria uma barreira efetiva entre as fases dispersa e contínua (TAKAMURA et al., 1979).

Shinoda et al. (1971) e Takamura et al. (1979) já haviam elucidado que além do HLB, a natureza da fase oleosa, uso de aditivos e temperatura podem influenciar diretamente a interação entre as fases aquosa e oleosa e os grupos hidrofílicos e lipofílicos dos tensoativos e que a estabilidade é mais influenciada pelo HLB que pelo tamanho médio da gota. Cálculos teóricos de HLB auxiliam no processo de triagem, mas, podem ser enganosos para

estabilidade quando se utiliza uma mistura de tensoativos, pois, possuem propriedades que se modificam quando se associam em nível molecular na interface (BOYD et al., 1972), portanto, o valor de HLB ideal do óleo é um ponto de partida, mas, a escolha do tipo de tensoativos deve ser também motivo de estudos.

Cada sistema é único, levando em consideração este fato pode-se verificar que, no presente trabalho, a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça não está dentro do valor de HLB esperado para emulsões do tipo O/A, pois, Gullapali e Sheth (1999) destacaram que emulsões do tipo O/A devem ter uma faixa de HLB acima de 8, mas, o óleo de soja necessitou de valores próximos de 6. Por ser um óleo vegetal, as moléculas de Tween 80 provavelmente se orientaram na interface O/A de tal maneira que, a cadeia lipofílica de oleato penetrou e se incorporou no interior das cadeias de oleato das moléculas de triglicerídeos do óleo.

7.1.1.3. Influência da temperatura de pré-emulsificação

A importância da temperatura para solubilização do tensoativo na fase aquosa ou oleosa já está consolidada em processos de emulsificação como inversão de fases ou para a obtenção de emulsões múltiplas. Nos testes preliminares em homogeneizador de alta velocidade as emulsões foram deixadas em banho-maria a 60 °C por 30 minutos, por ser esta a temperatura na qual o tensoativo hidrofílico se dissolvia totalmente na fase aquosa e o lipofílico na fase oleosa. Para investigar a influência da temperatura, as fases aquosa e oleosa foram mantidas, separadamente, em temperatura ambiente (25 °C) e a 40 °C por 30 minutos em banho-maria.

Não foi possível formar emulsões quando as fases aquosa e oleosa foram mantidas em temperatura ambiente no caso da emulsão de triclosan, pois, o mesmo está na forma sólida

nesta temperatura e não houve solubilização no óleo. Já na temperatura de 40 °C os componentes da fase oleosa tornam-se totalmente miscíveis. Nas emulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça e eugenol não houve dificuldade na solubilização da fase oleosa, no entanto, pequenos grumos foram observados na fase aquosa, pois, o Tween se agregou e não se misturou de maneira satisfatória em temperatura ambiente.

Considerando que o uso de homogeneizador de velocidade e homogeneizador de alta pressão fornecem muita energia ao sistema, o aquecimento gerado poderia causar perdas de princípios ativos, especialmente nas emulsões de eugenol e extrato de pimenta dedo-de-moça, por conterem componentes sensíveis ao calor e parcialmente voláteis, optou-se então, por manter a temperatura de 40 °C que se mostrou suficiente para solubilizar totalmente os componentes de ambas as fases das três emulsões.

7.1.1.4. Influência da velocidade e tempo de agitação

É freqüente na literatura a escolha da maior velocidade possível em agitador de alta velocidade (exemplo: 25000 rpm, por 5 minutos), no entanto, nos sistemas baseados em óleo de soja ou óleo mineral esta combinação não formou uma emulsão, ocorrendo cremeação alguns minutos após o preparo devido a re-coalescência por falta de tempo para que os tensoativos estabilizassem completamente as gotas recém formadas, assim como em baixas velocidades, independentemente do tempo. Emulsões estáveis foram obtidas nas velocidades intermediárias de 12000 e 16000 rpm por 5 minutos e em alta velocidade de agitação (20000 e 25000 rpm), mas, as últimas exigiram curtos períodos de agitação por formação excessiva de espuma. A influência da velocidade e do tempo de agitação foi evidente na redução do tamanho médio de gota e polidispersidade (Tabela 5).

Tabela 5: Influência da velocidade e tempo de agitação em homogeneizador de alta velocidade no tamanho médio de gota e polidispersidade na formação de emulsões.

Velocidade de agitação <i>versus</i> Tempo	Tamanho médio de gota (nm)	Polidispersidade	Desvio padrão
3200 rpm x 5, 10 e 20 minutos	*	*	*
5000 rpm x 5, 10 e 20 minutos	*	*	*
12000 rpm x 5 minutos	1547	0,35	95
16000 rpm x 5 minutos	1275	0,41	117
20000 rpm x 3,5 minutos	1911	0,43	215
25000 rpm x 5 minutos	*	*	*
25000 rpm x 1 minuto	1341	0,39	40
Combinação 1	*	*	*
Combinação 2	289	0,26	3
Combinação 3	270 a 295	0,21 a 0,27	4 a 7

Legenda: (*) não ocorreu formação de emulsão; (Combinação 1) = 5 minutos em 7000 rpm + 5 minutos em 12000 rpm + 5 minutos em 16000 rpm + 5 minutos em 20000 rpm + 10 minutos em 25000 rpm; (Combinação 2) = 2 minutos em 7000 rpm + 2 minutos em 12000 rpm + 5 minutos em 16000 rpm + 5 minutos em 20000 rpm + 20 minutos em 25000 rpm; (Combinação 3) = 1 minuto em 7000 rpm + 1 minuto em 12000 rpm + 1 minuto em 16000 rpm + 1 minuto em 20000 rpm + 1 minuto em 25000 rpm.

Os valores de tamanho médio de gota das combinações citadas acima, com exceção da combinação 2, estão de acordo com a literatura, que preconiza que o homogeneizador de alta velocidade é capaz de formar emulsões brutas com cerca de 1 a 3 μm (macroemulsões) e PDI maior que 0,3, auxiliando a homogeneização e diminuindo a cremação, mas, não exerce grande influência ao final do processo no tamanho médio de gota (GULLAPALI e SHETH, 1999), o objetivo do homogeneizador de alta velocidade é realizar apenas uma pré-mistura que facilite a obtenção de uma emulsão em escala nanométrica em homogeneizador de alta pressão.

A possibilidade de redução do tamanho médio de gota e aumento do número de gotas de óleo com mais uniformidade foi relatada por Guojung et al. (2014), todavia, não há relatos da formação de gotas em escala nanométrica, de tamanho de gota menor que 300 nm, com

homogeneizador de alta velocidade. Para comprovar que o homogeneizador de alta velocidade (Ultra-Turrax T-25®) é capaz de formar nanoemulsões, com pequeno tamanho médio de gotas, otimizando variáveis do processo, foi testada uma combinação de velocidade e tempo de agitação que, inicialmente consistia no aumento gradual da velocidade de agitação a cada 5 minutos. Ocorreu separação de fases em função do excesso de energia cinética imposta ao sistema, que levou à re-coalescência. Ainda tendo por base a importância de um gradiente de velocidade, aumentou-se também gradualmente o tempo resultando em uma redução expressiva de tamanho médio de gota, passando de mais de 1µm para menos de 300nm e PDI menor que 0,3. Entretanto, o tempo gasto (34 minutos no total) inviabiliza o processo industrialmente, e por esta razão, a combinação foi adaptada fixando-se o tempo em 1 minuto, mas, mantendo o aumento gradual de velocidade de agitação dentro da faixa escolhida. Esta opção teve por base a comprovação de que muitos minutos numa mesma velocidade de agitação podem desestabilizar o sistema, mas, o gradiente de velocidade é de vital importância para obtenção de uma nanoemulsão com homogeneizador de alta velocidade. Os resultados apresentados na Tabela 2 comprovam que é possível obter emulsões com tamanho médio de gota menor que 300 nm e PDI menor que 0,3 com o uso do homogeneizador de alta velocidade, o que é de grande interesse para indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentares que não necessitam de emulsões ultrafinas.

Como o objetivo principal deste trabalho foi a produção de nanoemulsões com gotas menores que 200 nm, o uso de homogeneizador de alta pressão foi mantido como etapa seguinte para redução de tamanho médio de gota e PDI, contudo, vale ressaltar que, mesmo neste caso, a diminuição prévia de tamanho médio de gota e obtenção de um sistema homogêneo acarreta em redução significativa de tempo e energia necessários nas etapas posteriores, e, conseqüentemente, pode-se diminuir os custos do processo aumentando a viabilidade em escala industrial.

7.1.1.5. Influência da relação tensoativo/óleo e da relação fase aquosa/fase oleosa

Tão importante quanto o valor de HLB é a concentração ideal de tensoativos com base na relação tensoativo/óleo, pois, o tensoativo deve estar presente em concentrações suficientes para cobrir totalmente as gotas de óleo recém-formadas, sendo adsorvidos rapidamente na interface para evitar re-coalescência e garantir estabilidade, além de auxiliar na redução de tamanho médio de gota. Concentrações muito altas de tensoativo podem gerar micelas presentes na fase aquosa, que podem acelerar o mecanismo de desestabilização mais comum em nanoemulsões, conhecido como maturação de Ostwald, e concentrações muito baixas podem levar à rápida coalescência.

As emulsões de óleo mineral não se mantiveram estáveis por mais de 48 horas quando preparadas com homogeneizador de alta velocidade, sendo crucial o uso do homogeneizador de alta pressão para formar emulsões estáveis, e, por este motivo, a investigação da influência das quantidades de óleo, água e tensoativo com agitador mecânico foi realizada apenas com o óleo de soja. Fixou-se uma formulação com 5% de tensoativo e variou-se a concentração de óleo entre 1 e 10%, a quantidade de água foi alterada conforme variação de óleo para ajuste final de 100% (m/m). As fases aquosa e oleosa foram homogeneizadas em homogeneizador de alta velocidade na combinação ideal de tempo e velocidade estabelecidas no item **7.1.1.4**. Foi possível observar que quanto menor a concentração de óleo, menores foram os valores de tamanho médio de gota e polidispersidade (PDI), passando de 900 nm para cerca de 200 nm com homogeneizador de alta velocidade (Tabela 6). Isto se deve ao fato de que, diminuindo a quantidade de óleo, há maior concentração de tensoativo para cobrir as gotas, como observado por Liu et al. (2010). Encontrar as concentrações ideais de cada componente é essencial para aperfeiçoar o processo.

Tabela 6: Efeito da concentração de óleo no tamanho médio de gota e polidispersidade da emulsão.

Óleo de soja (g)	Mistura de tensoativos (g)	Água (g)	Tamanho médio de gota (nm)	polidispersidade (PDI)
15	5	180	926 ± 30	0,399 ± 0,014
10	5	185	333 ± 4	0,316 ± 0,090
5	5	190	213 ± 1	0,165 ± 0,018

O sinergismo entre a relação tensoativo/óleo e fase oleosa/fase aquosa também foi investigada. Foram obtidas emulsões que variavam a concentração de óleo e tensoativos concomitantemente (Tabela 7), quando a concentração de óleo estava entre 2 e 5% (m/m) e a relação tensoativo/óleo era 1:1 (m/m), menores tamanhos médios de gota e PDI foram alcançados, concordando com outros estudos encontrados na literatura (BERNARDI et al., 2011), seguidos de valores muito próximos quando a relação passou para 1:2 (m/m), em concordância com outros estudos que relacionam esta razão como a ideal para que haja quantidade suficiente de tensoativo para cobrir rapidamente a superfície das gotas recém-formadas (QIAN e McCLEMENTS, 2011).

Tabela 7: Efeitos da relação óleo/tensoativo no tamanho médio de gota e polidispersidade da emulsão.

Óleo de soja (g)	Mistura de tensoativos (g)	Água (g)	Tamanho médio de gota (nm)	polidispersidade (PDI)
10	3	187	424 ± 10	0,323 ± 0,011
5	2	193	386 ± 4	0,270 ± 0,008
2,5	1	197	456 ± 13	0,341 ± 0,009

Quando a mistura de tensoativos estava acima de 2,5% (m/m) ainda ocorria formação de espuma, um efeito indesejado, pois, pré-emulsões não podem conter espuma para passar por homogeneizador de alta pressão. Como a concentração de 1% (m/m) de tensoativo

formou menos espuma e a formulação com 2% (m/m) de óleo teve bons valores de tamanho médio de gota e PDI, esta combinação foi a escolhida para as etapas seguintes. Ao acrescentar os princípios ativos em concentração maior que 0,3% (m/m), para as nanoemulsões de eugenol e triclosan, o tamanho médio de gotas era próximo de 300 nm, assim como, quando a concentração dos princípios ativos da pimenta dedo-de-moça em óleo de soja era maior que 2,5% (m/m) para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça. Por esta razão, fixaram-se as concentrações dos princípios ativos em 0,25% (m/m) para as emulsões de eugenol e triclosan perfazendo 2,25% (m/m) de fase oleosa e extrato puro de pimenta dedo-de-moça como fase oleosa em concentração de 2% (m/m) para a emulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça.

Após estabelecer as condições ideais nos testes preliminares, pré-misturas das emulsões foram obtidas em homogeneizador de alta velocidade (Tabela 8).

Tabela 8: Emulsões produzidas após pré-mistura em homogeneizador de alta velocidade.

	Tamanho médio de gota (nm)	Polidispersidade	Potencial zeta (mV)
emulsão bruta de eugenol	283 ± 7	$0,208 \pm 0,010$	$-34,84 \pm 1,64$
emulsão bruta de triclosan	295 ± 6	$0,256 \pm 0,008$	$-41,93 \pm 1,18$
emulsão bruta de extrato de pimenta dedo-de-moça	272 ± 4	$0,277 \pm 0,004$	$-36,71 \pm 0,62$

7.1.1.6. Influência da ordem de adição dos tensoativos e das fases aquosa e oleosa

Os ensaios da ordem de adição dos tensoativos demonstraram que quando a fase aquosa foi vertida sob a fase oleosa ocorreu uma homogeneização rápida com formação de uma emulsão leitosa, homogênea e sem espuma, porém, a emulsão se desestabilizou em

menos de 24 horas; quando a ordem era inversa, fase oleosa vertida sob fase aquosa, ocorreu menor separação de fases. Ocorreu intensa formação de espuma e grumos quando ambos os tensoativos estavam na fase aquosa (Figura 29). Quando ambos os tensoativos eram dissolvidos na fase oleosa não havia total solubilização, somente quando a fase oleosa contendo Span foi vertida lentamente sob fase aquosa contendo Tween a emulsão ficou homogênea, leitosa e estável por mais de 24 horas. Este resultado pode ser explicado pelo fato de o Span ter maior afinidade pelo óleo e o Tween pela água, e, como consequência, se solubilizam melhor nas respectivas fases.

Figura 29: Formação de grumos na tentativa de homogeneização prévia em temperatura ambiente.

Verter a fase oleosa sob a fase aquosa possibilita que o óleo se incorpore lentamente aos tensoativos e as gotas se formem aos poucos, o que não ocorre quando a fase aquosa é

vertida sob a oleosa, pois, não há tempo e mobilidade suficiente para que os tensoativos cubram as gotas de óleo. Todavia, Gullapali e Sheth (1999) demonstraram que a ordem de adição se tornou insignificante quando outros parâmetros foram otimizados. Ainda assim, concordando com o presente trabalho, Takamura et al. (1979) observaram que a emulsão com melhor homogeneização foi obtida quando o Tween foi solubilizado na fase aquosa e o Span na oleosa.

7.1.1.7. Influência das características dos materiais utilizados

Dois tubos de ensaio foram testados para verificar a influência da geometria do recipiente utilizado em homogeneizador de alta velocidade para minimização da formação de espuma, sendo, o tubo com maior diâmetro e altura (4,4 x 24,8 cm) mais eficiente na minimização da formação de espuma que o menor (2,7 x 11,5 cm) (Figura 30). O tubo com maior geometria possibilitou que a energia fosse dissipada por todo volume da emulsão e a espuma recém-formada se incorporasse a mistura. Quando o tubo foi mantido imóvel a porcentagem de espuma final era de cerca de 40% (v/v), porém, quando o tubo era movimentado em sentido horário, para assegurar que todo o volume tivesse contato com o elemento dispersor do homogeneizador de alta velocidade, o volume de espuma no final da agitação pôde ser desconsiderado, por ser muito pequeno.

Figura 30: Diferentes tubos utilizados para a pré-mistura em homogeneizador de alta velocidade.

7.1.1.8. Homogeneização por alta pressão

Os aumentos de temperatura no interior do homogeneizador são de difícil controle variando com a pressão de trabalho utilizada e podendo modificar intensamente a emulsão final. Para minimizar estes efeitos bolsas de gelo foram colocadas ao longo de toda geometria principal do homogeneizador de alta pressão.

A partir das emulsões brutas como aquelas obtidas em 7.1.1.4., foi estudada a influência da pressão de trabalho de 10000, 15000 e 20000 psi e do número de ciclos de 5, 10, 15 e 20, em homogeneizador de alta pressão sobre o tamanho médio de gota e PDI. Os efeitos observados foram distintos para cada nanoemulsão. O aumento da pressão de trabalho foi relatado como sendo diretamente proporcional à diminuição do tamanho médio de gota, e o

número de ciclos como sendo capaz de ajudar nessa diminuição até atingir um *plateau* (QIAN e McCLEMENTS, 2011; SALVIA-TRUJILLO et al. 2013, YANG e McCLEMENTS, 2013). Apesar da nanoemulsão de triclosan ter apresentado menores tamanhos médios de gota e PDI com o aumento da pressão de trabalho (20000 psi) e baixo número de ciclos (5), o mesmo resultado foi obtido com pressões de trabalho intermediárias (15000 psi) e alto número de ciclos (15 e 20), resultando em tamanho médio de gota entre $116 \pm 0,1$ e $120 \pm 0,1$ nm e PDI abaixo de 0,2. As condições testadas foram indiferentes para a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça que manteve o valor de tamanho médio de gota entre $138 \pm 0,1$ e $141 \pm 0,1$ nm e PDI menor que 0,2 para todas as pressões de trabalho e número de ciclos. Jafari, Assadpoor e Bhandari (2008) e Qian e McClements (2011) atribuíram resultados similares, inicialmente, a um aumento de colisão de gotas e re-coalescência, mas, depois sugeriram que a quantidade de tensoativo usado atingiu a capacidade máxima de cobertura de gotas ou teve suas características alteradas dentro do homogeneizador.

A nanoemulsão de eugenol apresentou os menores tamanhos médios de gota quando pressões de trabalho mais baixas e menor número de ciclos foram empregados (10000 psi, 5 e 10 ciclos, respectivamente) com tamanho médio de gota entre $104 \pm 0,1$ e $108 \pm 0,2$ nm e PDI menor que 0,2, conforme a pressão de trabalho aumentava para 15000 e 20000 psi, o tamanho médio de gota também aumentava entre $129 \pm 0,2$ e $165 \pm 0,3$ nm, assim como a PDI acima de 0,2.

A taxa de adsorção, ou seja, a velocidade com a qual o tensoativo cobre as gotas recém-formadas pode criar um filme protetor contra re-coalescência. Em altas pressões esta taxa pode ser insuficiente. Pressões muito altas não são benéficas, pois, causam alta taxa de re-coalescência, uma menor distribuição de tamanhos pode ser alcançada com uma prevenção da re-coalescência na câmara de turbulência, sendo, este, o ponto mais importante para otimizar a ruptura da gota (JAFARI, ASSADPOOR e BHANDARI, 2008).

A resposta inesperada da nanoemulsão de eugenol pode ter sido consequência de um mecanismo chamado efeito Gibbs-Marangoni, que, quando afetado por um gradiente de temperatura é conhecido como efeito Bénard-Marangoni, onde, duas gotas recém-formadas se aproximam adquirindo mais tensoativo na região de contato da interface causando adsorção desigual e um gradiente de tensão superficial que atrai ainda mais tensoativo nesta região, o influxo de água gerado separa estas gotas, que, estando com a interface incompleta de tensoativo colidem e coalescem (WOOSTER et al., 2008). Ainda que se tenha tentado controlar o aumento de temperatura, é inevitável que altas pressões causem um acréscimo de energia cinética e aqueçam o sistema dentro do homogeneizador de alta pressão. Mudanças graduais na composição da gota ocorrem até que se atinjam concentrações de equilíbrio de ambos os componentes (KABALNOV, 2001).

Segundo Suriyarak e Weiss (2014), o eugenol conduz mudanças no tensoativo dentro da membrana interfacial ao redor da gota, alterando as forças superficiais, pois, suas moléculas adsorvem muito mais rápido à interface recém-formada que Tween 20, por exemplo, devido a diferença de massa molecular entre os tensoativos das famílias Tween e Span (por volta de 1200 g/mol) e o eugenol (164 g/mol). A competição entre eugenol e os tensoativos exige um tempo mínimo para estabilizar a gota, porém, o tempo de permanência na zona de ruptura dentro do homogeneizador de alta pressão é reduzido sob altas pressões.

Buscando o aprofundamento no conhecimento de sistemas nanométricos, analisaram-se também os picos e histogramas obtidos por espalhamento de luz dinâmico, que, permitiram comprovar que apesar de as nanoemulsões de um mesmo princípio ativo serem iguais com relação aos parâmetros estudados, em algumas combinações era possível visualizar a presença de duas populações distintas, que, embora não causassem aumento de PDI ou tamanho médio de gota, são de vital importância sobre a vida de prateleira destas nanoemulsões, pois, a existência de uma população muito pequena de gotas muito reduzidas pode desencadear o

mecanismo de maturação de Ostwald afetando o tempo de estabilidade e, possivelmente, a ação pretendida. O aumento do número de ciclos eliminou completamente a segunda população de gotas (Figura 31), estes dados estão de acordo com o observado por Lee e Norton (2013) e Qian e McClements (2011). O tipo de equipamento também interfere, pois, em microfluidizador foram necessárias altas pressões de trabalho para alcançar os mesmos resultados que o homogeneizador de alta pressão sob baixas pressões (QIAN e McCLEMENTS, 2011).

Figura 31: Efeito do número de ciclos em triplicatas da nanoemulsão de eugenol produzida na pressão de trabalho de 10000 psi. Legenda: (A) = 5 ciclos; (B) = 10 ciclos.

Com base nas informações acima, as combinações idéias para os objetivos desejados foram escolhidas para os testes de estabilidade (Tabela 9).

Tabela 9: Características das emulsões escolhidas na primeira etapa de desenvolvimento.

Nanoemulsão	Pressão de Trabalho (psi)	Número de Ciclos	Tamanho médio de gota (nm)	Polidispersidade	Potencial zeta (mV)
Eugenol	10000	10	97 ± 1	0,101 ± 0,013	-36,7 ± 1,7
Triclosan	20000	10	121 ± 1	0,079 ± 0,006	-40,0 ± 0,84
Extrato de pimenta dedo-de-moça	15000	10	139 ± 2	0,089 ± 0,019	-35,0 ± 1,22

7.1.1.9. Uso de aditivos e mudança de fase oleosa

Inicialmente todas as nanoemulsões teriam óleo de soja como componente majoritário da fase oleosa, contudo, a nanoemulsão de eugenol apresentou aumentos expressivos de tamanho médio de gota variando de 170 a 260 nm e valores de PDI acima de 0,2 em todos os ciclos (variando de 5 até 30) e pressões (variando de 10000 até 20000 psi) com óleo de soja. A nanoemulsão de triclosan apresentou tamanhos médios de gotas próximos aos da nanoemulsão de eugenol. O óleo de soja é altamente insolúvel em água e o eugenol e o triclosan têm pequena tendência anfifílica, o que dificulta a formação de uma emulsão estável em óleos vegetais de alta massa molecular e baixa solubilidade em água. Uma segunda alternativa foi o óleo de girassol, especialmente por suas propriedades antiinflamatórias, capacidade de atuar como calmante para pele, antialérgico e renovador cutâneo (MARQUES et al., 2004; MORAIS et al., 2013), mas, os tamanhos médios de gota foram ainda maiores, variando de 790 a 1000 nm, estes valores estão fora do contexto do objetivo desta tese e, conseqüentemente, o uso de óleo de girassol como fase oleosa foi descartado. Como alternativa para a fase oleosa das nanoemulsões de ticlosan e eugenol foi escolhido o óleo mineral por sua rápida emulsificação devido à baixa massa molecular e uso comum em

indústrias de cosméticos, fármacos e em alguns nichos de indústrias de alimentos (GULLAPALI e SHETH, 1999; GUOJUNG et al., 2014).

7.1.1.9.1. Adição de glicerol e PEG

A adição de glicerol ou polietilenoglicol é relatada como método de diminuição de tamanho médio de gota como consequência do aumento da viscosidade da fase contínua em homogeneizador de alta pressão. Diversos trabalhos ressaltam a importância da razão entre a viscosidade aparente da fase dispersa sobre a viscosidade aparente da fase contínua, preconizando como valores ideais os que se encontram entre 0,1 e 5. A chamada variação de Braginsky prediz que, quanto menor a viscosidade da fase oleosa ou maior a da fase aquosa, menor será o tamanho médio de gota obtido e mais estável será a emulsão (LEE e NORTON, 2013; QIAN e McCLEMENTS, 2011; WOOSTER et al., 2008).

As nanoemulsões de extrato de pimenta-de-moça e eugenol foram consideradas inviáveis para avaliar a influência do uso de aditivos sobre a viscosidade da fase contínua por diferentes razões: a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça já tem uma viscosidade superior ao óleo mineral e a quantidade necessária de aditivos na fase aquosa seria muito alta para superar a viscosidade do óleo de soja, por este motivo, esta nanoemulsão foi descartada para o teste. Já a adição de glicerol ou PEG na nanoemulsão de eugenol não era de interesse por duas questões, primeiro porque os fenóis têm a tendência de se liquefazer na presença de poliálcool e, segundo, porque o eugenol tem caráter anfifílico e a hipótese de ocorrer sinergismo entre os compostos dificultaria o objetivo da análise, que era avaliar apenas a influência do aumento da viscosidade da fase contínua sobre redução do tamanho médio de gota. A nanoemulsão de triclosan foi escolhida para o teste.

Não foi possível avaliar a adição de PEG em concentração acima de 12,5% (m/m) devido à formação de grumos durante sua solubilização na fase aquosa. A produção de nanoemulsões de triclosan adicionadas de glicerol em concentrações variando de 5 a 50% (m/m) resultou em tamanhos médios de gota próximos de 150 e 300 nm para a menor e maior concentração, respectivamente. Em concentrações acima de 12,5% (m/m) os valores de PDI ultrapassaram 0,2, pois, o sistema deixou de ser homogêneo. Apenas a diferença de viscosidade entre as fases aquosa e oleosa não controla o tamanho médio de gota, mudanças ocorrem dependendo do tipo de tensoativo. Qian e McClements (2011) demonstraram que a diminuição do tamanho médio de gota pode ser principalmente limitada pelas forças de ruptura dentro do homogeneizador de acordo com a pressão de trabalho.

O tamanho médio de gota da nanoemulsão de triclosan com PEG ou glicerol (entre 150 e 300 nm) foi maior que o tamanho médio de gota sem a adição de PEG ou glicerol (entre 110 e 120 nm), corroborando com resultados obtidos por Lee e Norton (2013) que também não observaram diminuição de tamanho médio de gota com o uso de glicerol quando a fase oleosa era composta de óleo mineral. A forma de obtenção por homogeneizador de alta pressão proporciona cisalhamento suficiente para quebrar as gotas sem influência da viscosidade. Wooster et al. (2008) elucidaram ainda, que a redução de tamanho médio de gota na presença de aditivos depende da estrutura do tensoativo utilizado, pois, quando PEG foi utilizado com o tensoativo SDS ocorreu diminuição de tamanho médio de gota de cerca de 80 nm, porém, o mesmo não foi observado quando PEG era utilizado em combinação com Tween 80.

Apenas a viscosidade do óleo não controla o tamanho médio das gotas, pois, este é principalmente limitado pelas forças de ruptura dentro do homogeneizador na pressão usada, além de ser desejável que uma quantidade cada vez menor de tensoativo seja utilizada, visando as características sensoriais e econômicas (QIAN e McCLEMENTS, 2011).

7.1.1.10. Otimização por planejamento experimental

Tendo em vista a viabilidade em escala industrial, o controle da temperatura por bolsas de gelo pode não ser eficiente em todos os momentos, prejudicando a reprodutibilidade na produção das nanoemulsões e, por esta razão, optou-se pelo não resfriamento da geometria do homogeneizador e realizou-se um planejamento experimental, respeitando os limites de pressão e ciclos observados no item 7.1.1.8. como pontos ótimos para encontrar as condições satisfatórias para os objetivos. A hipótese de linearidade dos fatores (pressão de trabalho e número de ciclos) foi avaliada e os limites inferiores e superiores utilizados foram apresentados na Tabela 7. Para avaliar o efeito da temperatura e para fins de comparação, uma formulação com os parâmetros de pressão de trabalho e número de ciclo ótimos do item 7.1.1.8. foi obtida sem resfriamento do homogeneizador de alta pressão. As nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça apresentaram tamanho médio de gota de $150 \pm 1,2$, $172 \pm 0,9$ e 170 ± 1 nm, respectivamente.

Tabela 10: Limites superiores e inferiores das variáveis utilizadas no desenho experimental.

Nanoemulsão	Limite inferior pressão de trabalho (psi)	Limite superior pressão de trabalho (psi)	Limite inferior número de ciclos	Limite superior número de ciclos
Eugenol	5000	15000	3	10
Triclosan	10000	20000	3	10
Extrato de pimenta dedo-de-moça	10000	20000	3	10

7.1.1.10.1. Nanoemulsão de Eugenol

Observou-se valores de tamanho médio de gota entre 147 ± 1 e 165 ± 3 nm. Os pontos centrais apresentaram valores de tamanho médio de gota entre 155 e 157 nm, permitindo

considerar o ensaio estável. A Figura 32 apresenta o gráfico de dispersão para tamanho médio de gota dos pontos centrais e axiais para as nanoemulsões de eugenol.

Figura 32: Dispersão de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol obtidas pelas seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos. Comparativo das combinações de tamanho médio dos pontos axiais (vermelho) versus pontos centrais (cinza).

A Figura 33 apresenta o gráfico dos efeitos principais (pressão de trabalho e numero de ciclos) no tamanho médio de gota das nanoemulsões de eugenol. O resultado evidenciou que a pressão de trabalho e o número de ciclos contribuíram para o valor do tamanho médio de gota.

Figura 33: Efeitos principais no tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol com diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.

Na Figura 34 verificou-se o efeito de interação entre pressão de trabalho e número de ciclos, a associação entre essas variáveis influenciou os valores de tamanho médio de gota da nanoemulsão de eugenol.

Figura 34: Interação entre variáveis no tamanho médio de gota (nm) para as nanoemulsões de eugenol obtidas por diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.

A Tabela 11 apresenta o teste de significância do modelo obtido para tamanho médio de gota como resposta. Os valores de tamanho médio foram analisados por DLS. Os fatores pressão de trabalho e número de ciclos influenciaram significativamente ($p < 0,05$) os valores de tamanho médio de gota. Apresentaram valores de p iguais a 0,000 ($\alpha = 0,05$), assim como a interação entre as mesmas (valor p igual a 0,002, $\alpha = 0,05$).

Tabela 11: Teste de significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliar tamanho médio de gota das nanoemulsões de eugenol obtidas por homogeneizador de alta pressão.

Termos	Efeito	Coeficientes	Desvio padrão dos Coeficientes	Teste T	Nível de significância (p-valor)
Constante		156,9	0,4	409,3	0,000
Pressão de trabalho	6,3	3,2	0,5	6,2	0,000
Número de Ciclos	-8,6	-4,3	0,5	-8,5	0,000
Pressão*Ciclos	6,3	3,1	0,7	4,4	0,002

Os valores observados para os coeficientes de determinação, de determinação ajustado e de previsão do modelo linear que gerou a equação 5 foram 93,63, 90,81 e 70,39%, respectivamente. Estes valores, tal como, o baixo desvio padrão (1,435) comprovam que o modelo de regressão foi adequado.

$$TM = 173,03 - 0,0012 P - 3,9 C + 0,0004 P*C \quad (5)$$

Onde: TM = Tamanho Médio de Gota

P = Pressão de Trabalho

C = Número de Ciclos

A Tabela 12 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a resposta relativa ao tamanho médio de gota. Foi observada falta de ajuste (p igual a 0,013) que indica que o modelo pode não prever corretamente o tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol.

Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do tamanho médio de gota pelas variáveis pressão de trabalho e número de ciclos.

Fonte	GL	SQ (Aj)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	4	272,6	68,1	43,3	0,000
Linear	2	228,6	114,3	55,1	0,000
Pressão	1	79,9	79,9	38,8	0,000
Ciclos	1	148,6	148,6	72,2	0,000
Interação com 2 fatores	1	39,7	39,7	19,3	0,002
Pressão*Ciclos	1	39,7	39,7	19,3	0,002
Erro	9	18,5	2,1		
Falta de Ajuste	5	17,5	3,5	13,6	0,013
Erro puro	4	1,0	0,3		
Total	12	291,1			

Pela análise dos resíduos (diferença entre a observação e o tamanho médio de gota do tratamento correspondente) foi possível confirmar a normalidade da distribuição dos resíduos e autocorrelação negativa, demonstrando que uma variável externa interferiu no desenho experimental, como temperatura, rearranjo do eugenol na interface, entre outras. A suposição de normalidade foi comprovada através da obtenção de um gráfico de probabilidade normal e um histograma de resíduos. Pela Figura 35 foi possível validar a suposição de normalidade pela localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, pelo fato de o número de tratamentos ser pequeno, a avaliação do histograma não foi viável.

Figura 35: Resíduos de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol com as seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos.

Os gráficos de superfície e contorno de resposta (Figuras 36 e 37, respectivamente) em função da pressão de trabalho e número de ciclos revelaram que os menores tamanhos médios de gota são obtidos em baixas pressões e maior número de ciclos. Apesar dos maiores tamanhos observados em função do aumento da temperatura, que claramente exerce influência no tamanho médio de gota, ao se observar o comportamento da nanoemulsão de eugenol, pode-se aferir que estes dados estão em concordância com os observados no item 7.1.1.8..

Figura 36: Superfície de resposta relativa ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.

Figura 37: Contorno relativo ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de eugenol em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.

7.1.1.10.2. Nanoemulsão de Triclosan

Observou-se valores de tamanho médio de gota entre $188 \pm 2,1$ e 198 ± 2 nm. Os pontos centrais apresentaram valores de tamanho médio de gota entre 194 e 196 nm, permitindo considerar o ensaio estável. A Figura 38 apresenta o gráfico de dispersão de tamanho médio de gota dos pontos centrais e axiais para as nanoemulsões de triclosan.

Figura 38: Dispersão de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan obtidas pelas seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos. Comparativo das combinações de tamanho médio de gota dos pontos axiais (vermelho) versus pontos centrais (cinza).

A Figura 39 apresenta o gráfico dos efeitos principais (pressão e ciclos) no tamanho médio de gota das nanoemulsões de triclosan. O resultado evidenciou que a pressão de trabalho e o número de ciclos contribuíram para o valor do tamanho médio de gota.

Figura 39: Efeitos principais no tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan com diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.

Na Figura 40 verificou-se o efeito de interação entre pressão de trabalho e número de ciclos, a associação entre essas variáveis influenciou os valores de tamanho médio de gota para a nanoemulsão de triclosan.

Figura 40: Interação entre variáveis no tamanho médio de gota (nm) para as nanoemulsões de triclosan obtidas por diferentes pressões de trabalho e número de ciclos.

A Tabela 13 apresenta o teste de significância do modelo obtido para tamanho médio de gota como resposta. Os valores de tamanho médio foram analisados por espalhamento de luz dinâmico. Os fatores pressão de trabalho e número de ciclos influenciaram significativamente ($p < 0,05$) os valores de tamanho médio de gota, apresentaram valores de p iguais a 0,000 ($\alpha = 0,05$), assim como a interação entre as mesmas. Os fatores apresentaram um modelo quadrático (valor p igual a 0,000, $\alpha = 0,05$).

Tabela 13: Teste de significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliar tamanho médio de gota das nanoemulsões de triclosan obtidas por homogeneizador de alta pressão.

Termos	Efeito	Coeficientes	Desvio padrão dos Coeficientes	Teste T	Nível de significância (p-valor)
Constante		194,9	0,3	698,8	0,000
Pressão de trabalho	3,5	1,8	0,2	7,3	0,000
Número de Ciclos	3,4	1,7	0,2	7,0	0,000
Pressão*Pressão	-2,0	-1,0	0,2	-4,0	0,005
Ciclos*Ciclos	4,4	2,2	0,2	-8,9	0,000
Pressão*Ciclos	6,9	3,5	0,3	10,2	0,000

Os valores observados para os coeficientes de determinação, de determinação ajustado e de previsão foram 97,70, 95,73 e 82,93%, respectivamente. Estes valores, tal como, o baixo desvio padrão (0,68) comprovaram que o modelo de regressão foi adequado.

A Tabela 14 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a resposta relativa ao tamanho médio de gota. Não foi observada falta de ajuste (p igual a 0,215) indicando que o modelo foi capaz de prever o tamanho médio de gota com base na pressão de trabalho e número de ciclos resultando na equação 6.

$$TM = 189,1 + 0,0003 P - 0,12 C - 0,2 C*C + 0,0002 P*C \quad (6)$$

Onde: TM = Tamanho Médio de Gota

P = Pressão de Trabalho

C = Número de Ciclos

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do tamanho médio de gota pelas variáveis pressão de trabalho e número de ciclos.

Fonte	GL	SQ (Aj)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	6	139,1	23,2	49,6	0,000
Linear	2	48,5	24,3	52,0	0,398
Pressão	1	25,	25,0	53,6	0,000
Ciclos	1	23,5	23,5	50,3	0,000
Quadrado	2	41,9	20,9	44,8	0,000
Pressão*Pressão	1	7,4	7,4	15,9	0,005
Ciclos*Ciclos	1	36,7	36,7	78,6	0,000
Interação com 2 fatores	1	48,3	48,3	103,4	0,000
Pressão*Ciclos	1	48,3	38,3	103,4	0,000
Erro	7	3,3	0,5		
Falta de Ajuste	3	2,1	0,7	2,3	0,215
Erro puro	4	1,2	0,3		
Total	12	142,3			

Pela análise dos resíduos (diferença entre a observação e a média do tratamento correspondente) foi possível confirmar a normalidade da distribuição dos resíduos e ausência de autocorrelação. A suposição de normalidade foi comprovada através da obtenção de um gráfico de probabilidade normal e um histograma de resíduos. Pela Figura 41 foi possível validar a suposição de normalidade pela localização dos pontos em relação à curva de probabilidade. Pelo fato do número de tratamentos ser pequeno, a avaliação do histograma não foi viável.

Figura 41: Resíduos de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan com as seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos.

Os gráficos de superfície e contorno de resposta (Figuras 42 e 43, respectivamente) em função da pressão de trabalho e número de ciclos revelaram que os menores tamanhos médios de gota são obtidos em baixas pressões e pequeno número de ciclos ou baixas pressões e alto número de ciclos (assim como nas nanoemulsões de eugenol) negligenciando o fato de que os tamanhos médios de gota finais são maiores que na etapa com controle de temperatura, foi possível validar o comportamento das nanoemulsões no item 7.1.1.8., baseando-se nas variáveis pressão de trabalho e número de ciclos. Os cálculos de otimização por superfície de resposta demonstraram que tamanhos menores que 181 nm não podem ser obtidos com as condições trabalhadas.

Figura 42: Superfície de resposta relativa ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.

Figura 43: Contorno relativo ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de triclosan em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.

7.1.1.10.3. Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça

Observou-se valores de tamanho médio de gota entre 173 ± 2 e 183 ± 2 nm. Os pontos centrais apresentaram valores de tamanho médio de gota entre 173 e 174 nm, permitindo considerar o ensaio estável. A Figura 44 apresenta o gráfico de dispersão do tamanho médio de gota dos pontos centrais e axiais para a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça.

Figura 44: Dispersão do tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça obtidas pelas seguintes variáveis: pressão de trabalho e ciclos. Comparativo das combinações de tamanho médio de gota dos pontos axiais (vermelho) versus pontos centrais (cinza).

A Tabela 15 apresenta o teste de significância do modelo obtido para tamanho médio de gota como resposta. Os valores de tamanho médio foram analisados por espalhamento de luz dinâmico. Apenas a pressão de trabalho foi significativa com valor de p igual a 0,000, o número de ciclos ou a interação entre ambas as variáveis não influenciaram significativamente os valores de tamanho médio de gota, apresentaram valores de p iguais a

0,907 e 0,118 ($\alpha = 0,05$). No entanto, o quadrado da pressão de trabalho e o quadrado do número de ciclos se mostraram significativos (valor-p igual a 0,000, $\alpha = 0,05$), indicando um modelo não-linear, mas, quadrático.

Tabela 15: Teste de significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliar tamanho médio de gota das nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça obtidas por homogeneizador de alta pressão.

Termos	Coeficientes	Desvio padrão dos Coeficientes	Teste T	Nível de significância (p-valor)
Constante	173,4	0,1	1164,9	0,000
Pressão de trabalho	1,6	0,1	12,1	0,000
Número de Ciclos	-0,1	0,1	-0,1	0,907
Pressão*Pressão	3,2	0,1	23,9	0,000
Ciclos*Ciclos	4,3	0,1	32,2	0,000
Pressão*Ciclos	0,3	0,1	1,8	0,118

Os valores observados para os coeficientes de determinação, de determinação ajustado e de previsão foram 99,6, 99,2 e 97,5%, respectivamente. Estes valores, tal como, o baixo desvio padrão (0,36) comprovam que o modelo de regressão foi adequado.

A Tabela 16 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a resposta relativa ao tamanho médio de gota. Não foi observada falta de ajuste (p igual a 0,065) indicando que o modelo quadrático foi capaz de prever o tamanho médio de gota com base na pressão de trabalho e número de ciclos com base na equação 7.

$$TM = 214,4 - 3,7 P - 4,9 C + 0,13 P*P + 0,3 C*C + 0,02 P*C \quad (7)$$

Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do tamanho médio de gota pelas variáveis pressão de trabalho e número de ciclos.

Fonte	GL	SQ (Aj)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	219,6	43,9	330,3	0,000
Linear	2	19,5	9,8	73,4	0,000
Pressão	1	19,5	19,5	146,9	0,000
Ciclos	1	0,0	0,0	0,0	0,907
Quadrado	2	199,6	99,2	750,1	0,000
Pressão*Pressão	1	76,0	76,1	575,5	0,000
Ciclos*Ciclos	1	137,7	137,7	1036,0	0,000
Interação com 2 fatores	1	0,4	0,5	3,2	0,118
Pressão*Ciclos	1	0,4	0,5	3,2	0,118
Erro	7	0,9	0,1		
Falta de Ajuste	3	0,7	0,2	5,6	0,065
Erro puro	4	0,2	0,0		
Total	12	221,3			

Pela análise dos resíduos (diferença entre a observação e a média do tratamento correspondente) foi possível confirmar a normalidade da distribuição dos resíduos e ausência de autocorrelação. A suposição de normalidade foi comprovada através da obtenção de um gráfico de probabilidade normal e um histograma de resíduos. Pela Figura 45 foi possível validar a suposição de normalidade pela localização dos pontos em relação à curva de probabilidade. Pelo fato de o número de tratamentos ser pequeno, a avaliação do histograma não é viável.

Figura 45: Resíduos de tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça com as seguintes variáveis: pressão de trabalho e número de ciclos.

Os gráficos de superfície e contorno de resposta (Figuras 46 e 47, respectivamente) demonstram que as condições ótimas para os menores tamanhos médios de gota são obtidos apenas em função da pressão de trabalho, sendo os valores intermediários os pontos ótimos.

Figura 46: Superfície de resposta relativa ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.

Figura 47: Contorno relativo ao tamanho médio de gota para as nanoemulsões de extrato de pimenta dedo-de-moça em função da pressão de trabalho e número de ciclos utilizados em homogeneizador de alta pressão.

Pela obtenção de emulsões seguindo os parâmetros escolhidos por superfície de resposta sugere-se que não é possível obter tamanho médio de gota muito reduzido sem controle de temperatura, e, como o objetivo desta pesquisa era desenvolver nanoemulsões abaixo de 200 nm, a escolha dos valores de pressão de trabalho e número de ciclos por superfície de resposta foi baseada no tempo de preparo, gasto energético e viabilidade em escala industrial. As combinações escolhidas foram as que apresentaram tamanho médio de gota menor que 200 nm mantendo um valor de PDI abaixo de 0,2, sendo, 7500, 10000 e 15000 psi e 6, 3 e 2 ciclos para a nanoemulsão de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça, respectivamente. Os valores de potencial zeta foram os mesmos observados pelo processamento com resfriamento e da emulsão bruta (7.1.1.3. e 7.1.1.8), demonstrando que a carga eletrostática não está relacionada ao tamanho médio de gota, mas, à concentração

e estrutura dos tensoativos, valores de potencial zeta negativos são comuns com o uso de tensoativos não-iônicos e valores mais negativos que -30 mV são considerados satisfatórios para garantir a estabilidade (HSU e NACU, 2003). As nanoemulsões desta etapa são especificadas como nanoemulsão de eugenol (E), nanoemulsão de triclosan (T) e nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P).

7.2. Caracterização das nanoemulsões contendo eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça

7.2.1. Tensão interfacial

A tensão interfacial está relacionada à influência da pressão de Laplace na gota, onde, baixos valores facilitam a ruptura das gotas gerando tamanho médio de gota reduzido e aumentando a estabilidade contra coalescência, apesar de macroemulsões possuírem menor área de tensão interfacial que nanoemulsões, esta última tem pouca probabilidade de sofrer separação de fases, pois, o tamanho muito pequeno das gotas a torna cineticamente estável e, adicionalmente, os métodos de obtenção como alta energia causam redução da tensão interfacial na presença de tensoativos (NAZARZADEH et al., 2013). Os valores de densidade das fases estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Densidade das fases aquosa e oleosa.

Densidade (g/cm³)	
Fase oleosa	
Contendo Eugenol e Span	0,90 ± 0,1
Contendo Triclosan e Span	0,92 ± 0,1
Contendo Extrato de Pimenta Dedo-de-moça e Span	0,93 ± 0,1
Fase aquosa	
Contendo Tween 40	1,00 ± 0,2
Contendo Tween 80	1,00 ± 0,1

Os valores de tensão interfacial das formulações contendo eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça foram $40,4 \pm 0,01$, $43,1 \pm 0,01$, $39,3 \pm 0,01$ mN/m, respectivamente. O tensoativo hidrofílico foi dissolvido na água e o tensoativo lipofílico e o princípio ativo foram dissolvidos no óleo mineral ou óleo de soja. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras, esperava-se que o eugenol diminuísse significativamente o valor de tensão interfacial, pois, é relatado como co-tensoativo (SURIYARAK e WEISS, 2014). Terjung et al. (2012) mostraram que com o aumento da concentração de eugenol em nanoemulsões de Mygliol 812 ocorria redução exponencial no valor de tensão interfacial, a adição de 30% do fenol causou uma redução de 30 para 25 mN/m.

Os valores de tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase oleosa foram próximos, contudo, a nanoamulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça resultou em maior tamanho médio de gota, o que sugere que a tensão interfacial não é o único fator responsável pela diminuição do tamanho médio de gota. Óleos de baixa massa molecular como o óleo mineral tendem a formar gotas menores, a eficiência de ruptura está mais ligada à turbulência criada e viscosidade da fase oleosa que a tensão interfacial. Wooster et al. (2008) observou que emulsões com óleo vegetal resultaram em 40 nm a mais que hexadecano no tamanho médio

de gota, mesmo com um valor de tensão interfacial muito menor, sugerindo que a menor viscosidade do segundo superou a influência da pressão de Laplace na gota. Na segunda etapa, sem controle de temperatura, os valores de tamanho médio de gota das nanoemulsões foram muito próximos, sugerindo que as condições de homogeneização têm maior influência na redução de tamanho médio de gota.

7.2.2. Cor

Apesar das nanoemulsões de eugenol tenderem mais ao azul e as de extrato de pimenta dedo-de-moça ao laranja, em todas as nanoemulsões observou-se alto índice de intensidade de cor branca (Tabela 18). O espalhamento de luz e, conseqüentemente, a cor de uma emulsão, dependem fortemente do índice relativo de refração das fases contínua e dispersa, concentração de óleo e tamanho médio de gota. Para que uma emulsão seja transparente é necessário que as gotas sejam pequenas o bastante se comparadas as ondas de luz, prevenindo um espalhamento de luz muito intenso. A opacidade e a cor branca tendem a aumentar com o aumento do contraste no índice de refração que é causado pela alta concentração de gotas e presença de gotas maiores que 40 nm, como observado nas nanoemulsões do presente trabalho (McCLEMENTS, 2002; McCLEMENTS, 2012; McCLEMENTS e RAO, 2011; SALVIA-TRUJILLO et al 2013).

Tabela 18: Valores de cor e índice de brancura (IB) das emulsões preparadas na primeira etapa por resfriamento e na segunda etapa por desenho experimental sem resfriamento.

	Nanoemulsão	L*	a*	b*	IB (%)
primeira etapa	Eugenol	60,80 ± 0,04	-3,70 ± 0,01	-12,14 ± 0,01	58,80 ± 0,01
	Triclosan	72,30 ± 1,50	-3,80 ± 0,01	-5,60 ± 0,03	71,50 ± 0,95
	Extrato de pimenta dedo-de-moça	70,00 ± 0,04	-2,20 ± 0,01	0,71 ± 0,01	59,90 ± 0,02
segunda etapa	Eugenol	90,40 ± 0,02	-2,00 ± 0,01	-0,72 ± 0,01	90,15 ± 0,03
	Triclosan	90,40 ± 0,01	-2,20 ± 0,02	-2,24 ± 0,02	89,90 ± 0,02
	Extrato de pimenta dedo-de-moça	88,30 ± 0,03	3,00 ± 0,01	8,75 ± 0,01	85,10 ± 0,02

7.3. Estabilidade ao estresse térmico e força centrífuga

O teste de centrifugação impõe força gravitacional adicional ao sistema com a finalidade de verificar se o movimento Browniano é alto o bastante para se sobrepor à coalescência por força da gravidade e garantir uma estabilidade cinética de forma que as gotas não colidam e se unam.

Os testes de estresse térmico são baseados no fato de que, ao aquecer um sistema coloidal há um acréscimo de energia cinética, podendo levar a desittrações de tensoativos hidrofílicos como o Tween alterando a sua solubilidade em água (LIMA e OLIVEIRA, 2010). Mudanças bruscas de temperatura são boas formas de avaliar a estabilidade de uma nanoemulsão e prever sua vida de prateleira.

As metodologias mais encontradas na literatura para verificação da estabilidade de nanoemulsões são força centrífuga compreendida entre 80 e 860G e estresse térmico por rampa de aquecimento em banho ou placa com termostato na faixa compreendida entre 40 e 80 °C. No presente trabalho, estas variáveis foram avaliadas sob uma maior amplitude,

estendendo até 3050 G, e, iniciando em 10 °C os testes de centrifugação e aquecimento, respectivamente. Nenhuma das nanoemulsões, obtidas na primeira e na segunda etapa se alteraram macroscopicamente (visualmente), não apresentaram cremeação ou separação de fases, mantendo o aspecto inicial. As medidas de tamanho médio de gota confirmaram que não ocorreram alterações significativas ($p>0,05$).

A área de nanoemulsões ainda está sendo explorada, e, portanto, torna-se necessário que mais testes sejam realizados, pois, cada formulação e forma de obtenção são únicas, tornando as características e comportamento de cada nanoemulsão imprevisíveis. Visando elucidar o efeito da temperatura nos sistemas obtidos no presente trabalho, foram realizados seis ciclos de aquecimento/resfriamento, aquecimento em banho diretamente em altas temperaturas (70 e 90 °C) e uma nova rampa de aquecimento iniciada em temperaturas negativas (-10 até 80 °C). O teste de Tukey (95% de confiança) para os tamanhos médios de gota, das amostras que tiveram diferença significativa na análise de variância ($p<0,05$) do controle, está apresentado na Tabela 19 para as nanoemulsões escolhidas pelo desenho experimental (maiores tamanhos médios de gota). Notam-se algumas diferenças entre as amostras, no entanto, apenas há diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao tamanho médio de gota inicial nos ciclos finais do testes de aquecimento/resfriamento para todas as nanoemulsões. Há diferenças significativas ($p<0,05$) no aquecimento direto na temperatura de 90 °C e rampa iniciada em temperaturas negativas para a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) e para nanoemulsão de triclosan (T), respectivamente.

Tabela 19: Tamanho médio de gota após testes de estresse térmico e força centrífuga das nanoemulsões escolhidas por superfície de resposta.

Tamanho médio de gota (nm)			
Processo	(E)	(T)	(P)
Controle	180 ± 1	186 ± 1	181 ± 1
Aquecimento 70°C	181 ± 2	186 ± 1	182 ± 1
Aquecimento 70°C 7 dias	183 ± 1	186 ± 1	183 ± 2
Aquecimento 90°C	182 ± 1	187 ± 1	182 ± 1
Aquecimento 90°C 7 dias	183 ± 1	184 ± 2	181 ± 1
Ciclo 1 aquecimento/resfriamento	179 ± 1	187 ± 1	179 ± 2
Ciclo 2 aquecimento/resfriamento	179 ± 1	183 ± 1	180 ± 1
Ciclo 3 aquecimento/resfriamento	180 ± 1	184 ± 1	182 ± 2
Ciclo 4 aquecimento/resfriamento	171 ± 2*	170 ± 3*	181 ± 1
Ciclo 5 aquecimento/resfriamento	172 ± 1*	173 ± 2*	179 ± 2
Ciclo 6 aquecimento/resfriamento	173 ± 2*	171 ± 3*	161 ± 1*
Rampa de temperatura	180 ± 1	185 ± 1	181 ± 1
Rampa de temperatura negativa	182 ± 1	200 ± 2*	182 ± 1
Centrifugação 80G	181 ± 1	185 ± 2	183 ± 1
Centrifugação 250G	182 ± 1	185 ± 2	181 ± 1
Centrifugação 1000G	182 ± 1	185 ± 1	182 ± 1
Centrifugação 3050G	181 ± 1	186 ± 1	183 ± 1

Legenda: (E) = Nanoemulsão de eugenol, (T) = Nanoemulsão de triclosan e (P) = Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça, (*) indica que houve diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Os ciclos finais do teste de aquecimento/resfriamento foram os únicos a apresentar alterações em todas as nanoemulsões, apesar de a amostra ter sido mantida vedada, os muitos ciclos em estufa podem ter causado desidratação das moléculas de Tween, pois, tensoativos hidrofílicos não iônicos são caracterizados pela forte dependência da solubilidade com a temperatura, o aquecimento pode levar a formação de micelas gigantes, por atração intermicelar, com reduzida solubilidade em água e cobertura falha das gotas, levando a desestabilização do sistema (LIMA e OLIVEIRA, 2010).

A nanoemulsão de triclosan (T) demonstrou susceptibilidade à quedas de temperatura, pois, somente demonstrou alterações significativas de tamanho médio de gota quando submetida a baixas temperaturas, isto ocorre porque o triclosan em seu estado natural é sólido em temperatura ambiente e precisa ser aquecido para se tornar miscível em óleo na presença de tensoativos. Em temperaturas abaixo de 10 °C tende a se recrystalizar e se compactar, o que provavelmente causou a diminuição de tamanho nas gotas. Pelos resultados sugere-se que as nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) foram estáveis à maior parte dos testes. Possivelmente, o filme interfacial garantiu estabilização estérica suficiente para se recuperar após situações extremas.

Na Tabela 20 observou-se que dentre as emulsões obtidas na primeira etapa, a nanoemulsão de eugenol se tornou instável no tempo de sete dias após ter sido aquecida em banho 90 °C por 30 minutos, a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça se mostrou instável sete dias após ser aquecida em banho a 70 e 90 °C por 30 minutos, assim como a nanoemulsão de triclosan, esta última foi a de menor estabilidade, pois, também se alterou desde o primeiro ciclo aquecimento/resfriamento. Menores tamanhos médios de gota requerem maior quantidade de tensoativos para cobrir toda superfície da gota, portanto, é plausível sugerir que os resultados se devem ao fato de que a formulação para as nanoemulsões da primeira e segunda etapa foram iguais, mas, com menores tamanhos médios de gota, as nanoemulsões não continham a mesma quantidade de micelas em excesso de tensoativo na fase aquosa ou mesmo no filme interfacial para re-estabilizar as gotas após estresse térmico.

Tabela 20: Tamanho médio de gota após testes de estresse térmico e força centrífuga das nanoemulsões escolhidas na primeira etapa com resfriamento.

Processo	Tamanho médio de gota (nm)		
	Nanoemulsão de eugenol	Nanoemulsão de Triclosan	Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça
Controle	96 ± 1	124 ± 1	142 ± 1
Aquecimento 70°C	97 ± 0	124 ± 0	139 ± 1
Aquecimento 70°C 7 dias	98 ± 1	127 ± 0*	146 ± 1*
Aquecimento 90°C	100 ± 1	123 ± 0	138 ± 1
Aquecimento 90°C 7 dias	110 ± 1*	129 ± 1*	146 ± 1*
Ciclo 1 aquecimento/resfriamento	95 ± 1	113 ± 1*	142 ± 1
Ciclo 2 aquecimento/resfriamento	96 ± 2	112 ± 2*	140 ± 1
Ciclo 3 aquecimento/resfriamento	98 ± 1	112 ± 1*	144 ± 1
Ciclo 4 aquecimento/resfriamento	96 ± 0	110 ± 0*	142 ± 1
Ciclo 5 aquecimento/resfriamento	91 ± 0	106 ± 1*	140 ± 2
Ciclo 6 aquecimento/resfriamento	97 ± 1	100 ± 1*	145 ± 1*
Rampa de temperatura	96 ± 1	124 ± 1	140 ± 1
Rampa de temperatura negativa	95 ± 1	158 ± 1*	138 ± 1
Centrifugação 80G	99 ± 0	124 ± 1	144 ± 1
Centrifugação 250G	97 ± 1	121 ± 1	138 ± 1
Centrifugação 1000G	99 ± 0	124 ± 1	143 ± 1
Centrifugação 3050G	97 ± 0	124 ± 1	142 ± 1

Legenda: (*) indica que houve diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Os valores de PDI e potencial zeta não tiveram diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhuma das análises de nenhuma das emulsões mantendo os valores da emulsão inicial, exceto o valor de PDI para rampa de aquecimento na nanoemulsão de triclosan com início em -10 °C ($PDI > 0,3$), indicando que o congelamento causa desestruturação do sistema de forma irreversível. A continuação dos testes de estabilidade na etapa de estabilidade ao armazenamento foi viável, pois, os valores de PDI se mantiveram abaixo de 0,2, garantindo que o sistema não deixou de ser monomodal (PREETZ et al., 2010).

7.3.1. Congelamento/Descongelação

Com o aumento da carga de trabalho da sociedade como um todo, e a conseqüente falta de tempo dos consumidores, o consumo de alimentos prontos congelados é crescente, garantindo praticidade, contudo, a exigência por alimentos congelados mais saudáveis restringe o uso de diversos compostos artificiais. O teste de congelamento/descongelação (*freeze-thaw*) nas nanoemulsões de eugenol e extrato de pimenta dedo-de-moça, de ambas as etapas, teve por objetivo prever o efeito de sua incorporação em matrizes alimentícias submetidas ao processo de congelamento e/ou suas embalagens, assegurando sua estabilidade até o consumo final, além de simular uma condição inadequada de armazenamento frequente em muitas regiões brasileiras, o descongelamento parcial por aumento de temperatura seguido do re-congelamento. Apesar das nanoemulsões de triclosan não terem por finalidade sua incorporação em alimentos, o processo de congelamento/descongelação foi realizado para assegurar que baixas temperaturas são a única causa de desestabilização da mesma em função da solidificação do princípio ativo (ponto de fusão entre 55 e 60 °C).

A influência dos ciclos de congelamento e descongelamento acarretou em cremeação e/ou separação de fases de todas as nanoemulsões à partir do terceiro ciclo (Figura 48), e, apesar de ter sido visivelmente mais intensa na nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça, as medidas de DLS demonstraram que a nanoemulsão de triclosan foi a mais instável, com valores de tamanho médio de gota maiores que 2 µm após o primeiro ciclo, enquanto a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça e a nanoemulsão de eugenol variaram seu tamanho médio de gota entre valores próximos de 0,3 e 0,5 µm após o primeiro ciclo e ultrapassaram 1µm após o segundo ciclo. O potencial zeta variou cerca de 10 mV para a emulsão de eugenol e cerca de 20-30 mV para as demais.

Figura 48: Desestabilização da nanoemulsão de eugenol (A), nanoemulsão de triclosan (B e D) e nanoemulsão de extrato de pimenta (C e E) obtidas na primeira etapa por resfriamento.

Nas nanoemulsões otimizadas por desenho experimental ocorreu desestabilização de todas as nanoemulsões logo após o primeiro ciclo (Figura 49). Pelos tamanhos médios de gota obtidos por espalhamento de luz dinâmico verificou-se que a nanoemulsão de eugenol (E) alcançou tamanho médio de gota de mais de $2\ \mu\text{m}$ e PDI acima de 0,3, já as nanoemulsões de triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) resultaram em valores variando de $10\ \mu\text{m}$ até ultrapassar o limite de sensibilidade do equipamento, com valores de PDI acima de 0,7.

Figura 49: Nanoemulsão de eugenol (E), Nanoemulsão de triclosan (T) e Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) escolhidas por superfície de resposta após 1 ciclo de congelamento/descongelamento.

A instabilidade das nanoemulsões ocorreu devido ao congelamento ter sido lento somada à alta quantidade de água que formou cristais ao redor das gotas e as rompeu no descongelamento. Gotas menores resistem mais porque se orientam de forma mais organizada entre os cristais de água.

Deve haver cuidado na interpretação de resultados de DLS, pois, as amostras demonstraram coalescência e possivelmente alto índice de floculação, o que interfere diretamente no espalhamento de luz do equipamento, explicando a grande variação de tamanhos de gota. São muitos os processos físico-químicos que podem ocorrer durante o processo de congelamento, dentre eles podemos citar cristalização, formação de gelo que podem romper as gotas durante o descongelamento, alteração da temperatura de cristalização devido ao tensoativo, entre outros (AOKI, DECKER e McCLEMENTS, 2005 e MUN et al., 2013).

7.4. Testes de estabilidade ao longo do tempo de armazenamento

Observou-se redução do tamanho médio de gota inicial, após sete dias, em temperatura ambiente e em 4 °C, da nanoemulsão de eugenol (E), passando de $184 \pm 2,5$ nm para 175 ± 2 nm. A nanoemulsão de triclosan (T) também apresentou redução de 188 ± 0 nm para 181 ± 2 nm em temperatura ambiente, e tamanho médio de gota de 165 ± 1 nm após sete dias em 4 °C. Quando a medida é realizada com menos de 24 horas de preparo ainda há muita energia no sistema, principalmente quando a fase oleosa tem alguma solubilidade na aquosa, e o tensoativo leva um tempo para sua completa solubilização podendo levar ao efeito Gibbs-Marangoni e início de maturação de Ostwald. Como o óleo de soja utilizado como fase oleosa na nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) é insolúvel em água, esta nanoemulsão está menos sujeita ao mecanismo de maturação de Ostwald. No entanto, este fato não indica que ocorreu perda das atividades antioxidante ou antimicrobiana das nanoemulsões de eugenol (E) e triclosan (T). A manutenção do tamanho médio de gota ao longo do tempo, após a queda inicial, também pode ser consequência da estabilização das gotas pelos tensoativos, evitando que coalescessem.

A análise de variância (ANOVA) comprovou a estabilidade total da nanoemulsão de eugenol por todo período testado em todas as temperaturas de armazenamento, já a nanoemulsão de eugenol (E) apresentou alterações significativas ($p < 0,05$) para a temperatura de estufa.

Ao se observar a nanoemulsão de triclosan nota-se que, apesar de ocorrer alteração no tamanho médio de gota, esta não foi significativa ($p > 0,05$) para 4 e 25 °C. Já em 37 °C houve alteração significativa ($p < 0,05$) em 30 dias. A nanoemulsão de triclosan (T) mostrou ser estável em 25 e 37 °C, mas, ocorreram alterações significativas ($p < 0,05$) no tamanho médio de gota, com diminuição do tamanho médio de gota ao longo do tempo, à partir de sete dias

em temperatura de 4 °C. As Tabelas 21 e 22 apresentam os resultados do teste de Tukey (95% de confiança) das nanoemulsões que apresentaram diferença significativa no teste de variância ($p < 0,05$).

Tabela 21: Teste de Tukey (95% de confiança) das diferenças no tamanho médio de gota ao longo do tempo no teste de estabilidade ao longo do tempo de armazenamento das nanoemulsões preparadas na primeira etapa de desenvolvimento.

Tamanho médio de gota (nm)						
Nanoemulsão de eugenol						
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
4°C		97 ± 0^{Aa}	98 ± 1^{Aa}	95 ± 1^{Aa}	96 ± 0^{Aa}	96 ± 1^{Aa}
25°C	97 ± 1^{Aa}	95 ± 1^{Aa}	95 ± 0^{Aa}	92 ± 0^{Aa}	95 ± 0^{Aa}	96 ± 1^{Aa}
37°C		94 ± 1^{Aa}	93 ± 0^{Aa}	93 ± 0^{Aa}	93 ± 1^{Aa}	91 ± 1^{Aa}
Nanoemulsão de triclosan						
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
4°C		122 ± 1^{Bb}	124 ± 0^{Bb}	124 ± 0^{Bb}	123 ± 1^{Bb}	122 ± 0^{Bb}
25°C	121 ± 1^{Bb}	125 ± 1^{Bb}	125 ± 1^{Bb}	125 ± 0^{Bb}	125 ± 0^{Bb}	124 ± 1^{Bb}
37°C		126 ± 2^{Bb}	126 ± 1^{Bb}	137 ± 1^{Cc}	141 ± 1^{Cc}	140 ± 1^{Cc}
Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça						
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
4°C		143 ± 1^{Dd}	142 ± 1^{Dd}	142 ± 1^{Dd}	142 ± 0^{Dd}	140 ± 2^{Dd}
25°C	139 ± 2^{Dd}	144 ± 1^{Dd}	140 ± 1^{Dd}	142 ± 1^{Dd}	141 ± 2^{Dd}	142 ± 2^{Dd}
37°C		141 ± 0^{Dd}	141 ± 1^{Dd}	145 ± 1^{Dd}	178 ± 2^{Ee}	291 ± 4^{Fe}

Legenda: Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) ao longo do tempo para uma mesma condição de temperatura e letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre amostras armazenadas em diferentes temperaturas no mesmo tempo de armazenamento.

A nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça mostrou sinais de instabilidade a partir de 30 dias apenas em estufa 37 °C, já a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) com maiores tamanhos médios de gota se mostrou estável em todas as temperaturas,

apenas na temperatura de estufa aos 60 dias as gotas começaram a crescer, e aos 90 dias a desestabilização era clara com tamanho médio de gota acima de 300 nm.

Tabela 22: Teste de Tukey (95% de confiança) das diferenças no tamanho médio de gota no teste de estabilidade ao longo do tempo de armazenamento das nanoemulsões preparadas na segunda etapa superfície de resposta.

Tamanho médio de gota (nm)						
Nanoemulsão de eugenol						
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
4°C		175 ± 1 ^{Bb}	168 ± 2 ^{Cb}	169 ± 1 ^{CDb}	168 ± 2 ^{Db}	168 ± 1 ^{Db}
25°C	185 ± 2 ^{Aa}	175 ± 2 ^{Bb}	177 ± 2 ^{Bc}	176 ± 1 ^{BCc}	172 ± 2 ^{Cb}	174 ± 2 ^{Cc}
37°C		187 ± 2 ^{Ac}	175 ± 1 ^{BCc}	172 ± 1 ^{CDbc}	171 ± 2 ^{CDb}	170 ± 1 ^{Dbc}
Nanoemulsão de triclosan						
	0 dias	7 dias	15 dias	45 dias	60 dias	90 dias
4°C		166 ± 2 ^{Gg}	163 ± 1 ^{GHg}	158 ± 1 ^{HIg}	155 ± 2 ^{Ig}	156 ± 1 ^{Ig}
25°C	188 ± 0 ^{Ffg}	182 ± 2 ^{Gh}	182 ± 2 ^{Gh}	180 ± 1 ^{Gh}	180 ± 2 ^{Gh}	180 ± 1 ^{Gh}
37°C		188 ± 2 ^{Fi}	182 ± 2 ^{FGHh}	181 ± 1 ^{Hi}	181 ± 2 ^{Hh}	182 ± 2 ^{GHh}
Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça						
	0 dias	7 dias	15 dias	45 dias	60 dias	90 dias
4°C		182 ± 2 ^{Dd}	180 ± 1 ^{Dd}	181 ± 1 ^{Dd}	181 ± 1 ^{Dd}	181 ± 1 ^{Dd}
25°C	182 ± 0 ^{Dd}	183 ± 2 ^{Dd}	182 ± 2 ^{Dd}	182 ± 1 ^{Dd}	179 ± 2 ^{Dd}	181 ± 2 ^{Dd}
37°C		183 ± 2 ^{Dd}	181 ± 1 ^{Dd}	181 ± 2 ^{Dd}	194 ± 2 ^{Ee}	313 ± 2 ^{Fe}

Legenda: Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não existe diferença significativa ($p>0,05$) ao longo do tempo para uma mesma condição de temperatura e letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não existe diferença significativa ($p>0,05$) entre amostras armazenadas em diferentes temperaturas no mesmo tempo de armazenamento.

A taxa de maturação de Ostwald pode ser calculada com a equação 2, resultando em uma relação linear do raio do cubo em relação ao tempo (BERNARDI et al., 2011). Para confirmar se as alterações de tamanho das nanoemulsões se deram por maturação de Ostwald foram realizadas regressões lineares, onde o coeficiente de regressão ao quadrado em função

do tempo, com valores maiores que 0,8, indicam instabilidade por maturação de Ostwald (Figura 50).

Figura 50: Análise de regressão e valores de coeficientes de determinação (r^2) para avaliar a influência do mecanismo de maturação de Ostwald na nanoemulsão de eugenol (37 °C) ao longo do período de estocagem.

Pôde-se observar que os valores e o comportamento descritos anteriormente corroboram com o valor de coeficiente de determinação (r^2), maior que 0,8 para a nanoemulsão de eugenol (E) (37 °C) sugerindo que possa ter ocorrido maturação de Ostwald, contudo, nesta temperatura, conforme citado anteriormente, há grandes chances das moléculas de Tween terem desidratado e o filme interfacial ter deixado de ser robusto por alterações no balanço hidrofílico-lipofílico.

Contudo, Nazarzadeh et al. (2013) ressaltou que a maturação de Ostwald pode ser de regime transiente, consistindo em frequentes quedas e aumentos de tamanho médio de gota, com um comportamento representado graficamente como dente de serra, portanto, o crescimento nem sempre é linear. Ao se observar o gráfico obtido para a nanoemulsão de

eugenol (E) e as diferenças significativas no tamanho médio de gota, uma investigação mais aprofundada fez-se necessária.

Uma ferramenta útil para tentar elucidar os diferentes mecanismos de desestabilização foi a observação do padrão de distribuição de tamanho das gotas ao longo de 90 dias para verificar a estabilidade. Nazarzadeh et al. (2013) estudaram estes efeitos e comprovaram que apenas tamanho médio de gota e polidispersidade não são indicadores de estabilidade, porém, as curvas ou diagramas fornecidos por DLS podem desvendar estas dúvidas. Como regra geral, se ocorre uma ampliação na curva/diagrama de distribuição de tamanhos indicando aumento no tamanho médio de gota, o mais provável é que esteja ocorrendo coalescência, mas, se a alteração ocorrer no formato da curva/diagrama gerando maiores picos nas extremidades, o mecanismo mais provável é maturação de Ostwald, pois, o número de pequenas gotas diminuiu rapidamente à medida que gotas maiores crescem vagarosamente, causando alteração no formato do diagrama, um achatamento da distribuição de tamanhos com o tempo.

As gotas pequenas aumentam por um período, ao mesmo tempo em que as gotas maiores, até que o equipamento detecte apenas o crescimento das gotas, a técnica de DLS não é capaz de detectar pequenas gotas residuais e subestima seu número real na presença de gotas grandes. Por este fato, Nazarzadeh et al. (2013) ressaltaram que ao contrário dos dados constantes na literatura até o momento, observar as alterações de tamanho de gota por períodos muito longos de tempo pode mascarar o real mecanismo de desestabilização das nanoemulsões, pois, ao final do teste de estabilidade observou-se a presença de gotas grandes que poderiam ser atribuídas à coalescência e não ao mecanismo mais provável, maturação de Ostwald.

Baseando-se nesta teoria as curvas de distribuição de tamanho e histograma de distribuição de tamanhos entre temperaturas de armazenamento para a nanoemulsão de

triclosan (T) foram analisados com a finalidade de elucidar se a cristalização do ativo ocasionou a diminuição de tamanho, já que, o coeficiente de determinação não foi conclusivo para provar que a maturação de Ostwald foi a principal causa de instabilidade (Figura 51).

Figura 51: Análise de regressão e valores de coeficientes de determinação (r^2) para avaliar a influência do mecanismo de maturação de Ostwald na nanoemulsão triclosan (T) (4 °C) ao longo do período de estocagem.

Nas nanoemulsões de eugenol (E) e triclosan (T) foi possível confirmar a presença de duas populações nas emulsões que apresentaram sinais de instabilidade a partir de 7 dias, que foram se alterando ao longo do período de estocagem (Figura 52).

Figura 52: Distribuição de tamanhos de gota (nm) da nanoemulsão de triclosan (T) no tempo de 60 dias armazenadas em 4 e 25 °C.

Na nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) há uma população de pequenas gotas aumentando e outra de gotas maiores, o que explica a diminuição do tamanho

médio de gota, o tempo final de análise poderia sugerir que o mecanismo principal foi coalescência, porém, ao observar os histogramas é possível afirmar que inicialmente ocorreu maturação de Ostwald, sendo este, o provável mecanismo precursor da instabilidade (Figura 53).

Figura 53: Distribuição de tamanhos de gota (nm) ao longo do tempo para nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) armazenada a 37 °C. Legenda: (A) 7 dias, (B) 15 dias, (C) 60 dias.

A presença de duas ou mais populações iniciais por espalhamento de luz dinâmico é consequência da formulação, mas, a formação destas populações ao longo do tempo está relacionada ao processo de desestabilização, a temperatura que mais causou instabilidade foi a de estufa, em concordância com Boyd et al. (1972), que observaram a influência da temperatura de armazenamento de 5, 25 e 40 °C e concluíram que a temperatura de

armazenamento exerce menor importância que a dependência do HLB na coalescência, pois, a desestabilização ocorria conforme o valor de HLB aumentava, porém, em 40 °C a emulsão coalesceu após 15 dias, provavelmente devido a perda de água que favorece ligações entre os grupos de óxidos de etileno e os grupos adjacentes de polioxietileno.

Quando o armazenamento é feito sob temperaturas próximas as temperaturas de produção pode ocorrer perda de água e desidratação de tensoativos não iônicos hidrofílicos. Os valores de potencial zeta não se alteraram, mas, podem ter ocorrido alterações químicas, nanoemulsões com menores tamanhos de gota são mais propensas por terem maior área de contato.

Bernardi et al. (2011) realizaram testes com nanoemulsões O/A contendo óleo de arroz como fase oleosa e diferentes combinações de Tween e Span como tensoativos, de forma a se obter sempre valor de HLB de 8, e compararam um processo de baixa energia (inversão de fases) e um de alta energia (homogeneizador de alta pressão), e observaram as formulações em 5, 25 e 40 °C por 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, e, ao final de 30 dias as formulações preparadas por alta pressão se desestabilizaram em todas as condições mesmo com a adição de preservativos e antioxidantes, ao contrário da estabilidade observada no presente trabalho para todas as nanoemulsões em temperatura ambiente, indicando que o método de obtenção foi satisfatório, tal como a formulação, no entanto, não foi suficiente para evitar o mecanismo de maturação de Ostwald.

As nanoemulsões contendo triclosan mostrou comportamentos distintos em função do tamanho. A formulação com menor tamanho médio de gota se desestabilizou em temperatura de estufa, tal como as demais, no entanto, a formulação com maior tamanho médio de gota (nanoemulsão de triclosan (T)) foi estável a esta temperatura. Maiores tamanhos de gota têm menor área de contato, sendo menos susceptíveis a degradações do óleo e dos tensoativos, fato observado também na nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P).

Em temperatura de 4 °C a nanoemulsão de triclosan, com menor tamanho médio de gota, não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) durante o período testado, mas, notou-se diminuição no tamanho médio de gota. Na nanoemulsão de triclosan (T) ocorreu diminuição notável no tamanho médio de gota após 7 dias com queda acentuada ao longo de 90 dias. O triclosan tem ponto de fusão a 55-60 °C e na presença de tensoativos se mantém líquido por volta de 40 °C. A diminuição de tamanhos não pode ser atribuída somente ao maturação de Ostwald nesta condição de armazenamento.

Outro parâmetro essencial para estabilidade é o índice de polidispersidade (PDI) que garante o comportamento monomodal do sistema. Valores menores que 0,2 garantem a homogeneidade ao longo do período de estocagem (BERNARDI et al., 2011; TERJUNG et al., 2012; WOOSTER et al., 2008). Somente os valores de PDI da nanoemulsão de triclosan (T) em 4 °C e a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça em 37 °C não se mantiveram abaixo de 0,2 ao final do período testado (90 dias). Ressalta-se a importância de correlacionar o formato e comportamento dos diagramas de distribuição de tamanhos com seu valor de PDI, pois, conforme o sistema vai se alterando entre gotas menores e maiores no maturação de Ostwald, o valor de PDI pode se ajustar e permanecer satisfatório. Quedas ou aumentos acentuados no valor de PDI são bons indicadores de instabilidade, como no presente trabalho não houve variações no valor de PDI das nanoemulsões, com exceção da nanoemulsão de triclosan (T) em 4 °C e a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça em 37 °C, sugere-se que o mecanismo de coalescência não desestabilizou os sistemas.

7.4.1. Crio-Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica

Para tentar elucidar se houve diferenças entre as nanoemulsões, quanto à morfologia e seus efeitos na estabilidade, foram obtidas imagens no tempo de 120 dias das nanoemulsões

de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça armazenadas em temperatura ambiente. Para fins de comparação, todas as nanoemulsões investigadas foram as obtidas com resfriamento na primeira etapa do desenvolvimento.

As medidas realizadas por espalhamento de luz dinâmico são bem aceitas para caracterizar o tamanho médio de gota e sua homogeneidade, entretanto, o equipamento não tem sensibilidade para pequenas quantidades de gotas de tamanhos muito reduzidos ou resquícios de gotas maiores, além de mascarar alguns processos de desestabilização em nanoemulsões com tamanho médio de gota abaixo de 150nm (KLANG et al., 2012). Para confirmar os resultados de DLS e visualizar a morfologia das gotas, averiguando possíveis mecanismos de desestabilização, frequentemente recorre-se a técnicas de microscopia como Microscopia de Força Atômica (AFM).

A técnica de Microscopia de Força Atômica é baseada na varredura de superfícies por meio de sondas de dimensões muito reduzidas a distâncias muito pequenas que possibilitam alta resolução espacial lateral e vertical em nível atômico, é uma ferramenta muito versátil e de ampla aplicabilidade. O modo de contato intermitente (“Tapping”) permite que pela vibração da ponteira de átomos ocorra um contato não contínuo. Este modo modifica menos a amostra (FERREIRA e YAMANAKA, 2006), e, por esta razão, foi a escolhida para obter micrografias das nanoemulsões no presente trabalho, considerando que as partículas são totalmente maleáveis e poderiam se deformar com contato direto.

Pelas micrografias obtidas por AFM (Figuras 54, 55 e 56) notou-se a presença de muitas gotas mesmo com o uso da amostra diluída 1:10 (v/v), porém, nem todas apresentaram formato definido. Foram observadas gotas de tamanho menor às medidas por espalhamento de luz dinâmico nas nanoemulsões de eugenol e triclosan, e maiores na nanoemulsão de extrato de pimenta-de-moça. Esta discrepância já foi observada por outros autores (PREETZ et al., 2010; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013) que sugerem como causa o preparo da amostra, ou

seja, fraca adsorção das gotas na superfície do substrato utilizado (mica, vidro, etc). O método de imobilização das moléculas pode causar alteração estrutural do sistema (FERREIRA e YAMANAKA, 2006).

Figura 54: Micrografias de microscopia de força atômica da nanoemulsão de eugenol.

Legenda: em roxo - gotas de fase dispersa aderidas em lamínula, em verde – fase contínua.

No presente trabalho, devido à natureza dos princípios ativos optou-se por secagem em temperatura ambiente para minimizar estes efeitos, ainda assim, ocorreu evaporação parcial da água presente na amostra, esperado pelo fato da água não estar totalmente livre, o que causou falta de aderência no vidro e alteração na estrutura morfológica das gotas, impossibilitando uma correlação segura entre espalhamento de luz dinâmico e microscopia de força atômica. Pelos espectros realizados comprovou-se a presença de fase oleosa no interior das gotas, como esperado.

Figura 55: Micrografias de microscopia de força atômica da nanoemulsão de triclosan.

Legenda: em roxo - gotas de fase dispersa aderidas em lamínula, em verde – fase contínua.

Preetz et al. (2010) não notaram diferenças entre as medidas de tamanho médio de gota feitas por espalhamento de luz dinâmico e AFM, mas ressaltaram que parte da emulsão é parcialmente perdida quando a amostra é seca em mica ou outras superfícies. A pressão exercida pela ponta do equipamento também pode causar até 10% de alterações laterais nos tamanhos de gota e até mesmo deformar gotas que não possuam compostos de estrutura rígida, este fato pode explicar a diferença no tamanho médio de gota nas imagens de microscopia de força atômica, pois, o processo de secagem pode ter alterado a interface, e o óleo também torna as gotas maleáveis permitindo deformação.

Figura 56: Micrografias de microscopia de força atômica da nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça. Legenda: em roxo - gotas de fase dispersa aderidas em lamínula, em verde – fase contínua.

Para complementar as micrografias e análises de morfologia e tamanho médio de gota das nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça buscou-se outra técnica de microscopia que permitisse uma visualização mais detalhada das gotas. Entre as microscopias mais utilizadas está a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que possui algumas características importantes que a tornam altamente popular para investigações ultra-estruturais. Contudo, o preparo da amostra pode causar deformações e causar dificuldades para aproximação e aumento de resolução para nanoestruturas devido aos riscos de dano nos elétrons. Para solucionar esta limitante foram criadas técnicas combinadas, como Crio-MEV, que consiste no congelamento rápido, seguido de sublimação e fratura, sendo imediatamente transferidas para um estágio de baixa temperatura em câmara específica com um microscópio eletrônico de varredura acoplado para obtenção direta de imagens da amostra próximas de seu estado real, permitindo ver claramente a morfologia e distribuição de tamanho de gota ou estruturas específicas como agregados na superfície, além de possibilitar a investigação de grandes áreas (KLANG et al., 2012; MIKULA e MUNOZ, 2000).

Pelas micrografias (Figura 57) observou-se claramente o formato esférico e uniforme das gotas e foi possível confirmar o tamanho médio de gota mensurado por DLS. Verificou-se a presença de muitas gotas e boa distribuição de tamanhos, mas, também, a presença de gotas maiores e menores em pequenas proporções, o que é frequente em nanoemulsões e relatado por outros autores (SAUPE, GORDON e RADES, 2006). O equipamento de DLS subestima o número destas gotas quando as quantidades são muito baixas em comparação ao tamanho médio das gotas.

Figura 57: Imagens de Crio-MEV para confirmação de tamanho médio de gota.

Legenda: (A) = Nanoemulsão de eugenol; (B) = Nanoemulsão de triclosan; (C) = Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça.

Em uma imagem ampliada foi possível observar a perfeita orientação dos cristais de gelo, isto se deve à alta quantidade de água na formulação (Figura 58).

Figura 58: Orientação da água em cristais e das gotas de fase dispersa entre os mesmos em imagem obtida em Crio-MEV da nanoemulsão de eugenol.

As técnicas de microscopia também se mostram úteis para elucidar mecanismos de desestabilização ou comprovar a ausência dos mesmos. O maturação de Ostwald pode ser observado por medidas de tamanho médio de gota e distribuição de tamanhos ao longo da estocagem, porém, é difícil distingui-lo dos demais processos de desestabilização. Rao e McClements (2012) conseguiram atribuir o aumento do tamanho das gotas de emulsão de óleo de limão a este fenômeno mantendo a emulsão primária em lâmina e observando-a em microscópio óptico ao longo do tempo, pois, somente garantindo que não ocorria colisão entre as gotas era possível verificar o aumento de tamanhos como sendo devido à difusão das moléculas de óleo das gotas menores para as maiores por sua solubilidade na fase contínua.

Em um segundo corte das amostras notou-se que as nanoemulsões de triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça apresentaram gotas grandes em pequenas quantidades (Figura 59), a análise de variância provou que não há diferenças no tamanho médio de gota ao longo do período de estocagem ($p>0,05$), o que pôde ser confirmado pela análise dos picos e suas extremidades, que permaneceram os mesmos desde o início, portanto, a hipótese de maturação de Ostwald pode ser descartada e as gotas maiores consideradas residuais do processo de produção, pois, como já discutido, é comum a presença de pequena quantidade de gotas maiores. As características únicas da nanoemulsão de eugenol com tamanho médio de gota menor que 100nm permitiram visualizar a presença de floculação em algumas imagens, porém, a estabilidade se provou satisfatória, sugerindo que este processo de agregação seja reversível e não desencadeie a desestabilização da nanoemulsão de eugenol.

Figura 59: Novas microscopias de Crio-MEV em diferentes áreas das emulsões.

Legenda: (A) = Nanoemulsão de eugenol; (B) = Nanoemulsão de triclosan; (C) = Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça.

O processo de floculação em uma nanomulsão nem sempre significa o início da desestabilização do sistema, pois, pode ser reversível em função do potencial eletrostático das partículas na interface ou quando o potencial zeta é grande, a reversão também pode ser efeito de forças de Van der Waals. Nanoemulsões, com tamanho médio de gota menor que 100 nm, são resistentes a desestabilização por cremação ou coalescência, e mesmo após uma aglomeração típica de floculação, a alta eficiência na estabilização estérica do sistema permite que as gotas sejam re-dispersas e evita desestabilizações e processos como o maturação de Ostwald (BINKS e RODRIGUES, 2009; QIAN e McCLEMENTS, 2011; RALM-CHIQUÉ et al., 2012; TAKAMURA et al., 1979; WOOSTER et al., 2008).

7.5. Escolha das formulações ideais para os testes de atividade antioxidante e antibacteriana

Somente as nanoemulsões escolhidas por superfície de resposta, nanoemulsão de eugenol (E), a nanoemulsão de triclosan (T) e a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P), foram submetidas às etapas de caracterizações adicionais e testes de atividade antioxidante e antibacteriana pelos seguintes motivos:

1 – apesar das nanoemulsões da primeira etapa se mostrarem mais estáveis no armazenamento em 4 e 37 °C não é possível garantir que a taxa de resfriamento seja constante e o processo seja sempre o mesmo quando do uso de bolsas de gelo, além disso, as nanoemulsões obtidas por desenho experimental apresentaram estabilidade em temperatura ambiente e maior estabilidade aos testes de estabilidade ao estresse térmico e à força centrífuga, o que justifica os testes subsequentes;

2 – Diversos autores relataram que nanoemulsões só possuem atividade antimicrobiana quando o princípio ativo está disperso em micelas de tensoativo na fase aquosa e tamanhos médios de gota muito pequenos necessitam de mais tensoativo para cobrir a gota, portanto, tamanhos médios de gota intermediários teriam maior efetividade e eficácia (DONSI et al., 2012; DONSI et al., 2014; TERJUNG et al., 2012);

3 – Quando a finalidade é o uso tópico, é necessário cuidado com a escolha do tamanho médio de gota, pois, nanoemulsões com tamanho médio de gota muito pequeno têm maior área interfacial, aumentando a absorção dos compostos ativos pela pele devido à probabilidade de penetração cutânea, atingindo a camada mais profunda da derme podendo

causar fragmentação e perda de flexibilidade do tecido devido às interações do óleo e tensoativo com a camada da pele, que geram desorganização desta estrutura (CLARES et al., 2014).

7.6 Caracterizações específicas das formulações ideais

7.6.1. Tensão superficial

Os valores de tensão superficial das nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) foram $43,7 \pm 0,8$, $43,6 \pm 0,4$ e $48,4 \pm 0,9$ mN/m, respectivamente. É comum que os valores de tensão superficial sejam maiores que os de tensão interfacial, pois, a tensão exercida pelo contato com o ar é maior que entre as fases. Assim como a tensão interfacial, não houve diferenças entre as nanoemulsões de eugenol (E) e triclosan (T), contudo, diferentemente da tensão interfacial, a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) teve o maior valor de tensão superficial, efeito observado pela fase oleosa composta por óleo vegetal (óleo de soja).

7.6.2. pH

As médias de pH para as nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) foram muito próximas, sendo, $5,0 \pm 0,1$; $5,1 \pm 0$ e $5,9 \pm 0$, respectivamente. Os valores encontrados são satisfatórios, pois, o potencial zeta menor que -30 mV está fortemente ligado ao pH do sistema, o ideal é a obtenção de pH maior que 4 (HSU e NACU, 2003). Ainda segundo Hsu e Nacu (2003), o óleo de soja possui potencial zeta positivo, mas, tensoativos da família Tween conferem carga negativa às gotas. Com base no

pH e potencial zeta das nanoemulsões do presente trabalho pode-se atribuir a força de formação da micela do tensoativo ao efeito hidrofóbico da cauda que exclui as moléculas de água e se agrupam em uma barreira protetora. A concentração do tensoativo abaixo de 5% permitiu que houvesse aproximadamente 5 a 10 moléculas capazes de se estabilizar em nanossegundos mantendo pH e potencial zeta dentro do desejado (KARJIBAN et al., 2012).

7.6.3. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) se baseia em radiação infravermelha na amostra em uma ampla faixa de comprimento de onda, cada amostra absorve a radiação em uma banda específica e a transmite criando uma impressão digital única apresentando picos de absorção correspondentes às vibrações das ligações em nível molecular.

As leituras provenientes de infravermelho com transformada de Fourier foram exatamente iguais para todas as nanoemulsões, as mesmas bandas e de mesma intensidade foram observadas nas nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P). A presença de um único pico expressivo e um pico menor nos comprimentos de onda próximos a 3500 e 1650 cm^{-1} representam ligações OH^- da água, e, o fato de serem os únicos picos visíveis pode ser explicado pela quantidade de água da fase contínua, como esta é o componente majoritário (mais de 96%) os picos correspondentes à mesma sobrepõem-se aos picos dos demais componentes das nanoemulsões (Figura 60).

Figura 60: Perfil das nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) analisadas em FTIR.

7.6.4. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma das técnicas mais utilizadas para caracterizações térmicas de transformações físico-químicas. Consiste em monitorar as interações durante aquecimento entre a amostra e uma referência, ambos *versus* tempo, ou *versus* temperatura durante um programa de aquecimento ou resfriamento (DALMAZZONE, HAMED e DALMAZZONE, 2009).

As curvas da rampa de aquecimento das nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (T) demonstraram o mesmo comportamento (Figura 61): nenhum fenômeno térmico foi observado, muito provavelmente devido à concentração muito baixa da fase lipídica, a escolha das temperaturas da rampa foi baseada no comportamento do componente majoritário, ou seja, a água.

Figura 61: Análise de calorimetria diferencial de varredura das nanoemulsões. Legenda: em verde – nanoemulsão de eugenol (E), em vermelho – nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P), em azul – nanoemulsão de triclosan (T).

Para complementar a análise térmica das nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) e confirmar se a falta de picos nas nanoemulsões foi devido à baixa concentração da fase lipídica, análises de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas nos princípios ativos puros: eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça.

Na rampa de aquecimento do triclosan puro nota-se um único pico endotérmico na temperatura de $60,89 \pm 0,5$ °C e com calor latente de $98,24 \pm 2$ J/g (Figura 62). Este pico não apareceu na nanoemulsão de triclosan pela baixa concentração do ativo.

Figura 62: Análise de calorimetria diferencial de varredura do triclosan puro.

O eugenol apresentou inflexão da linha de base como resultado da relaxação da molécula, indicando transição vítrea ocorrendo em $-77,96$ °C (Figura 63), mas, não apresentou mudanças na faixa testada para sua nanoemulsão.

Figura 63: Análise de calorimetria diferencial de varredura do eugenol puro.

O extrato de pimenta dedo-de-moça (P) apresentou picos endotérmicos e exotérmicos (Figura 64). A presença de mais de um pico indica uma mistura, um dos componentes com mudança de fases é o óleo de soja, porém, o extrato de pimenta dedo-de-moça é uma mistura complexa de carotenóides e outros compostos.

Figura 64: Análise de calorimetria diferencial de varredura do extrato de pimenta dedo-de-moça. Legenda: em verde – extrato de pimenta dedo-de-moça.

7.6.5. Comportamento reológico por curvas de escoamento

As análises reológicas são importantes na indústria alimentícia por prever alterações indesejáveis que podem ocorrer nos alimentos ou embalagens quando submetidos a cisalhamento como perda de atividade ou rompimento de matrizes. Os reogramas das três nanoemulsões indicam comportamento Newtoniano (Figura 65). É interessante observar que,

mesmo tendo fases oleosas distintas, as nanoemulsões contêm os mesmos valores em todos os pontos no gráfico, confundindo-se com réplicas de uma mesma amostra. Isto se deve em função da baixa concentração de compostos e tamanho médio das gotas muito pequeno. Contrariamente ao observado, Guojung et al. (2014) demonstraram que tamanhos pequenos de gotas possuem viscosidade mais alta e comportamento não-Newtoniano, porém, o comportamento reológico tornou inviável a construção de reogramas ao longo do tempo para avaliar estabilidade ou o uso da reologia para caracterizar detalhadamente cada nanoemulsão, pois, o movimento Browniano torna as gotas escorregadias quando o cisalhamento é aplicado, gerando falsos valores de viscosidade pela possibilidade de turbulência.

Os valores de viscosidade estavam na faixa de 10^{-3} Pa.s, correspondente a valores próximos aos da água, componente majoritário das nanoemulsões, ao final do teste as nanoemulsões não demonstraram alterações visíveis a olho nu (separação de fases ou cremeação).

Figura 65: Reogramas das nanoemulsões indicando comportamento Newtoniano.

Legenda: (A) = Nanoemulsão de eugenol; (B) = Nanoemulsão de triclosan; (C) = Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça.

7.7. Testes de atividade antioxidante e antibacteriana das formulações ideais

7.7.1. Atividade Antioxidante

Mais recentemente uma ampla gama de ensaios espectrofotométricos tem sido adotada para medir a capacidade antioxidante de alimentos, sendo, os mais populares, os ensaios ABTS e DPPH (FLOEGEL et al., 2011). O diluente escolhido para as nanoemulsões foi o etanol, pois, como solvente orgânico há maiores chances de rompimento das gotas e medidas reais de atividade antioxidante.

7.7.1.1. Capacidade de seqüestro do radical DPPH•

As nanoemulsões de eugenol (E), triclosan (T) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P) foram submetidas ao teste de seqüestro de radical DPPH para avaliação da atividade antioxidante. O teste de DPPH fornece informações da reatividade de um composto com um radical livre. A solução metanólica ou etanólica do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) tem uma coloração violeta escura que vai se tornando mais clara na presença de um seqüestrador de radical livre e quando reduzido a difenil-picril-hidrazina fica com coloração amarela. A capacidade seqüestradora é monitorada pela diminuição da absorbância e expressa em porcentagem de inibição do radical e por EC50, quantidade necessária do composto para inibir 50% do radical (AYOOLA et al., 2008).

A nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) demonstrou atividade antioxidante baixa, inibindo apenas $28,5 \pm 0,6\%$ do radical livre DPPH, mesmo em concentração de 1000 $\mu\text{L/mL}$, com um valor de EC50 de 1871,94 $\mu\text{L/mL}$ correspondente a 37 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de pimenta dedo-de-moça na nanoemulsão. Asnaashari et al. (2014) observaram que ácido gálico, metil galato e α -tocoferol têm alta atividade antioxidante por DPPH quando puros, com porcentagens de inibição de 46,3, 69,0 e 16,1%, respectivamente, porém, quando emulsionados, os valores caíram para 1,3, 2,9 e 3,6%, respectivamente. No presente trabalho a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) provavelmente possui os princípios ativos totalmente ligados ao óleo de soja, não estando disponíveis para atuar como antioxidante, estando protegidos dentro da gota pelo processo de emulsificação.

A Tabela 23 e a Figura 66 apresentam a curva de inibição do radical em função da concentração das nanoemulsões de eugenol (E) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P), e, a regressão da reta para o cálculo de EC50 ($r^2 = 0,9618$ e $0,9989$, respectivamente).

Tabela 23: Porcentagens de inibição do radical DPPH.

	Concentração da nanoemulsão (µL/mL)	Absorbância	% de Inibição do radical DPPH
NE	100	0,609 ± 0,003	19,87 ± 0,37
	200	0,495 ± 0,008	34,80 ± 1,02
	300	0,419 ± 0,003	44,87 ± 0,37
	400	0,366 ± 0,001	51,84 ± 0,19
	500	0,322 ± 0,003	57,62 ± 0,37
NP	100	0,714 ± 0,006	6,05 ± 0,75
	200	0,690 ± 0,007	9,20 ± 0,93
	400	0,656 ± 0,004	13,70 ± 0,56
	500	0,634 ± 0,006	16,51 ± 0,84
	1000	0,543 ± 0,007	28,46 ± 0,65

Legenda: (NE) Nanoemulsão de eugenol, (NP) Nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P).

Figura 66: Regressão linear para cálculo de EC50 pelo método de sequestro do radical livre DPPH.

A concentração de 500 µL/mL da nanoemulsão de eugenol inibiu $57,6 \pm 0,4\%$ do radical livre DPPH em 30 minutos, os compostos fenólicos são conhecidos pelo alto poder antioxidante e o eugenol puro é um dos mais potentes. Gülçin, Elmastas e Aboul-Enein (2012) encontraram o valor de EC50 de 21,50 µg/mL para óleo de cravo, com 83,6% de inibição na concentração de 45 µL/mL e consideraram a atividade antioxidante relevante. No presente trabalho, sugere-se que o eugenol nanoemulsionado teve sua atividade antioxidante potencializada, o valor de EC50 da nanoemulsão de eugenol foi de 388,38 µL/mL, valor que

pode ser considerado muito baixo e de grande interesse, pois, corresponde à concentração de 0,971 µg/mL de eugenol, indicando atividade antioxidante extremamente alta. Segundo Asnaashari et al. (2014), o eugenol age como co-tensoativo e se localiza na interface óleo-água, seguindo o paradoxo polar, assim como α -tocoferol, é mais eficiente quando emulsionado, pois sua parcial hidrofiliçidade garante que se localize na interface, protegendo o interior da gota.

7.7.1.2. Capacidade de seqüestro do radical ABTS•+

O teste de ABTS fornece informações da reatividade de um composto com um radical livre, a solução de radical ABTS•+ e persulfato de potássio diluída em etanol tem uma coloração azul/verde que vai se tornando mais clara na presença de um seqüestrador de radical livre, a capacidade antioxidante é expressa em Trolox equivalente, calculada pela curva padrão deste com a solução (FLOEGEL et al., 2011).

A Figura 67 demonstra a curva de calibração de Trolox® para cálculos de seqüestro do radical ABTS. Os resultados confirmaram a baixa atividade da nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) com valor de Trolox equivalente de $1535,3 \pm 74,3$ µM TEAC/L de nanoemulsão. A metodologia não se mostrou adequada para a nanoemulsão de eugenol, não foi possível obter reprodutibilidade, para uma mesma concentração, as triplicatas do teste demonstraram valores muito distintos de 10463,35, 26154 e 36353,4 µM TEAC/L. Em se tratando de nanoemulsões, as gotas podem se romper com mais facilidade em contato com algumas substâncias em função do princípio ativo, mas, não há como assegurar que a taxa de rompimento seja contínua, sugere-se que a liberação do eugenol das gotas tenha ocorrido de forma irregular na presença do radical ABTS.

Figura 67: Curva de calibração para cálculo de Trolox equivalente.

7.7.2. Atividade antibacteriana

O processo de obtenção das nanoemulsões não é estéril, portanto, preconiza-se que todo composto seja filtrado para eliminar contaminações externas ao teste, contudo, tendo em vista que as membranas têm porosidade próxima ao tamanho médio de gota havia o risco de perda de ativo. Para investigar a influência da filtração todas as análises foram realizadas com e sem passagem por filtro 0,22 μm .

7.7.2.1. Teste de susceptibilidade por poço-difusão

Há dois mecanismos de ação que explicam a atividade antimicrobiana de nanoemulsões, o mais comum e aceito é o mecanismo de inibição de crescimento microbiano por transferência de massa, que é facilitada pelo tamanho médio de gota e presença de tensoativos, o segundo mecanismo se baseia no fato das gotas atuarem como reservatórios de princípio ativo com liberação contínua na fase aquosa (DONSI et al., 2012; DONSI et al.,

2014). O teste de susceptibilidade é crucial como triagem e descoberta da existência ou não de atividade antibacteriana de um composto. O método de disco-difusão é amplamente aceito e reconhecido como satisfatório para avaliar a capacidade antibacteriana de uma substância, contudo, as normas internacionais de uso global fornecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS) ressaltam que a capacidade inibitória deve ser baseada, não só na concentração do ativo, mas, também na sua capacidade de se difundir pelo meio com a finalidade de prever sua dissolução em matrizes biológicas. Tendo em vista que as gotas da nanoemulsão poderiam ficar retidas no material celulósico dos discos normalmente utilizados, e com o intuito de prever sua capacidade de difusão, a técnica escolhida foi a de difusão em Agar pelo método de poço-difusão, metodologia que vem sendo adaptada para prever a atividade inibitória de forma mais precisa e próxima de sistemas reais.

Não houve formação de halos ao redor dos poços contendo nanoemulsão de eugenol (E) e nem nos poços contendo nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) em nenhuma das concentrações testadas. Nem mesmo as nanoemulsões não diluídas demonstraram atividade inibitória contra as cepas testadas.

A atividade antimicrobiana de espécies de pimenta é relatada por diversos autores com algumas diferenças entre as espécies, tal como os fenóis, em geral, tem sido relatada como tendo bom potencial antibacteriano (DONSI et al., 2011; DONSI et al. 2012; DONSI et al., 2014). Porém, no presente trabalho, ao testar os compostos: eugenol diluído em água ultrapura, eugenol diluído em óleo mineral, ambos na concentração de 0,25% (m/m), e extrato da pimenta dedo-de-moça diluído em óleo de soja na concentração de 2 e 100% (m/m), não houve inibição de crescimento nem mesmo da estirpe de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que foi escolhida por ser considerada relativamente sensível a uma ampla gama de antibióticos e compostos.

O extrato da pimenta dedo-de-moça na concentração de 100% não foi capaz de se difundir pelo meio de cultura, portanto, não é adequado assegurar que não há atividade nesta concentração, mas, que não foi possível aferir sua atividade antibacteriana pelo método escolhido (Figura 68). Já na concentração de 2% (m/m) ocorreu completa difusão pelo Agar, opostamente ao extrato puro que ficou retido no poço, já o extrato diluído teve difusão satisfatória, contudo, este também não demonstrou atividade inibitória para nenhuma bactéria testada. Pode-se atribuir este resultado a três hipóteses:

1 – ao se considerar apenas a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) pode-se atribuir sua falta de atividade pela baixa concentração da fase oleosa, contudo, Al-Adham et al. (2012) demonstraram que o processo de emulsificação por si só acarreta em atividade antibacteriana e quanto menor o tamanho médio de gota, maior a capacidade inibitória devido à maior área de superfície. Diferentes gorduras vegetais, puras ou combinadas, não exibiram nenhum potencial antibacteriano mesmo em altas concentrações, mas suas respectivas nanoemulsões sim (SPERANZA et al., 2014);

2 – ao se considerar o extrato dedo-de-moça diluído em óleo de soja com concentração de 2% (m/m), observa-se que o óleo de soja é o componente majoritário. O óleo de soja é considerado inerte, e, um estudo com nanoemulsões com cerca de 299 nm contendo apenas óleo de soja como fase oleosa, evidenciou sua falta de atividade antibacteriana, opostamente, quando a fase oleosa era constituída de óleo de limão foi possível observar boa atividade inibitória na mesma concentração e tamanhos médios de gota, sugere-se então, que o óleo de soja dificultou a ação dos princípios ativos (BURANASUKSOMBAT et al., 2011);

3 – contrariamente ao item 2, pode-se atribuir a falta de atividade antibacteriana à indisponibilidade dos compostos ativos às bactérias, como o extrato foi obtido em óleo de soja pela migração lenta dos compostos lipossolúveis da pimenta dedo-de-moça, foi possível

estabelecer ligações entre o óleo de soja e estes compostos, o que levou a mudanças químicas e de composição que tornaram o extrato de pimenta dedo-de-moça totalmente insolúvel em água, fato comprovado pela não difusão do extrato puro no meio de cultura rico em água, não descartando totalmente a possibilidade de que o extrato tenha atividade antibacteriana, mas, que os métodos empregados não permitiram sua mensuração ou as gotas não liberaram os princípios na fase contínua.

Figura 68: Teste de susceptibilidade de *S. aureus* ao extrato de pimenta dedo-de-moça.

Legenda: (+) Controle positivo cloranfenicol, (-) controle negativo óleo de soja.

Donsi et al. (2012) e Donsi et al. (2014) elucidaram que a maioria das nanoemulsões atua como carreador de princípio ativo, e que sua atividade antimicrobiana está relacionada a concentração do princípio ativo dissolvido na fase aquosa dentro de micelas de tensoativos, os compostos migram pela fase aquosa e atacam a parede celular bacteriana, porém, quando o princípio ativo apresenta alta afinidade pela fase oleosa no qual está dissolvido, este não migra para a fase aquosa, mesmo na presença de alguns tipos de tensoativo, ficando

fortemente protegido no interior das gotas. Este fato foi observado quando nanoemulsões de limoneno eram obtidas com o princípio ativo dissolvido em óleo de girassol. Zhang et al. (2014) observaram que nanoemulsões obtidas do mesmo composto, dissolvido em outros óleos nos quais não tinha tanta afinidade, resultou em atividade antibacteriana. Sugere-se que este seja o real motivo dos resultados apresentados para a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P).

No caso da nanoemulsão de eugenol (E) a literatura aponta o eugenol puro como um composto de comportamento anfifílico, com base neste fato, os testes de susceptibilidade do eugenol não emulsionado foram conduzidos com o composto na mesma concentração presente em sua nanoemulsão (0,25% m/m), mas, com solventes distintos, sendo testado diluído em água ultrapura e em óleo mineral com a finalidade de verificar a influência da fase na qual o mesmo está disperso (Figura 69). Assim como a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) e seu respectivo extrato, o eugenol diluído em água ultrapura ou óleo mineral e sua respectiva nanoemulsão não demonstraram atividade antibacteriana.

Figura 69: Teste de susceptibilidade de *S. aureus* ao eugenol em água e em óleo mineral 0,25% (m/m).

Três teorias podem tentar explicar este resultado:

1 - Assim como para a nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P), a concentração de eugenol pode ter sido muito baixa para exibir alguma atividade inibitória, o que pode ser suportado pela falta de atividade inibitória do eugenol não emulsionado, já que o mesmo é consolidado como sendo um fenol com atividade antibacteriana (ZHANG et al, 2009).

Terjung et al. (2012) testaram macro, micro e nanoemulsões de eugenol em diferentes concentrações contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e observaram que quando a concentração de eugenol era de 400-500 ppm as bactérias se mantinham na fase estacionária

por curtos períodos, retomando posteriormente o crescimento celular, já, na concentração de 600 ppm de eugenol, eram capazes de inativar inicialmente as células, mas, estas se recuperavam e voltavam a aumentar. Apenas concentrações acima de 600 ppm reduziram o número de células viáveis abaixo dos níveis detectáveis. O mecanismo de ação de fenóis está relacionado aos danos na integridade da membrana celular e sua funcionalidade, mas, microrganismos podem de se adaptar e se recuperar em baixas concentrações do princípio ativo que varia para cada composto fenólico, enquanto que para o eugenol foram necessários 800 ppm para inibir o crescimento de algumas bactérias, para o carvacrol bastaram 300 ppm.

O processo de emulsificação deveria promover a potencialização dos efeitos existentes, com concentrações muito menores que as usuais, mas, sendo um composto volátil a possibilidade de perdas pelo estresse mecânico e temperatura aumentada sempre foi considerada quando as nanoemulsões são obtidas por homogeneizador de alta pressão, diminuindo a concentração de princípio ativo ou alterando sua composição. Todavia, esta teoria foi descartada por Donsi et al. (2012) quando desenvolveram nanemulsões com tamanho médio de gota de 74 e 174 nm contendo diferentes concentrações de eugenol em homogeneizador de alta pressão Nano DeBEE e, ao final do processo, mensuraram a concentração do composto e concluíram que não houve perdas durante a emulsificação e que o eugenol foi extremamente estável ao calor e oxidação.

2 – a segunda hipótese, e, mais provável, envolve um sinergismo entre tamanho médio de gota e concentração de eugenol na nanoemulsão, refletindo diretamente no coeficiente de partição do eugenol na fase aquosa, que é determinante para que um princípio ativo expresse, ou não, sua atividade antimicrobiana. A ação do eugenol depende de sua migração pela fase aquosa para atacar membranas de microrganismos, o que pode não ocorrer se o tamanho médio de gota for pequeno, pois, tanto o tensoativo, quanto o eugenol, teriam todas as

moléculas fortemente presas na interface, sem micelas em excesso do tensoativo para transportar o eugenol, ou mesmo, sem eugenol suficiente para estabilizar a interface e ainda migrar para a fase aquosa.

Há duas variáveis que influenciam o coeficiente de partição do eugenol: a afinidade com o tensoativo e o óleo, e o tamanho médio de gota. Comparações com nanoemulsões de 100 e 200 nm contendo carvacrol, e, obtidas em homogeneizador de alta pressão Nano DeBEE demonstraram que parte do princípio ativo se localizava na fase oleosa e parte na fase aquosa sob a forma de micelas de tensoativos não iônicos como Tween, combinado ou não com glicerol, e, o mesmo não acontecia quando o tensoativo tinha estrutura protéica (DONSI et al., 2012), este estudo sugere maior afinidade de fenóis por tensoativos não iônicos, como os utilizados no presente trabalho, o que torna pouco provável que o tipo de tensoativo causou diminuição do coeficiente de partição.

Analizando a questão de tamanho médio de gota, pode-se sugerir que os pequenos tamanhos médios de gota obtidos no presente trabalho tenham impossibilitado que parte do eugenol estivesse na fase aquosa. Como a concentração utilizada na formulação foi muito baixa (0,25% m/m) todas as moléculas podem ter se localizado na interface não migrando para as micelas em excesso. Terjung et al. (2012) realizaram cálculos de integração matemática para prever a relação existente entre tamanho médio de gota e concentração de eugenol no sistema da emulsão e atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e concluíram que o tamanho médio de gota não teve influência quando a concentração estava abaixo de 400ppm (efeito *plateau*), emulsões com tamanho médio de 80nm intensificaram o crescimento bacteriano, enquanto que as de 3000 nm levaram à morte celular, independentemente de estar com concentrações suficientes de eugenol. Ainda segundo Terjung et al. (2012), o tamanho médio de gota é indiretamente responsável pela atividade antibacteriana. Se o número de gotas for muito alto e seu tamanho médio muito

baixo, a probabilidade de que existam micelas de tensoativo em excesso é muito pequena, pois, nestes casos a quantidade necessária de tensoativo para estabilizar todas as gotas é maior. A mesma formulação com 3000 nm possuía um aumento de 60% da concentração de eugenol na fase aquosa sob a forma de micelas de tensoativo em comparação a nanoemulsão de 80nm.

Opostamente às nanoemulsões de eugenol (E) e extrato de pimenta dedo-de-moça (P), era esperado que a nanoemulsão de triclosan (T) contendo 0,25% (m/m) de ativo exibisse atividade inibitória, contudo, os halos foram muito maiores que o controle positivo, o antibiótico cloranfenicol, com a formação de halos de inibição de mais de 20 mm mesmo na menor diluição, 3% (v/v) em água ultrapura, que corresponde a 0,075 mg/mL de triclosan, valor considerado muito baixo (Figura 70). A nanoemulsão de triclosan (T) não diluída teve halos de inibição maiores que 30 mm para todas as bactérias testadas, mesmo as Gram-negativas consideradas mais resistentes. Comparando diversos compostos, em muitos casos, há atividade inibitória apenas contra cepas Gram-positivas mesmo em concentrações próximas à 100 mg/mL (MARTIN et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2007).

Figura 70: Halos de inibição da nanoemulsão de triclosan (T), onde: A – *S. aureus*, B – halo referente a 6% contra *S. aureus*, C – *E. coli*, D – *S. enteritidis*. Legenda: Tamanhos de halo: 100% - entre 31 e 36 mm, 50% - entre 30 e 33 mm, 25% - entre 29 e 32 mm, 12% - entre 26 e 31 mm, 6% - entre 25 e 29 mm, 3% e 1,5% - entre 22 e 27 mm.

O triclosan é um composto sintético conhecido por ação bacteriostática em baixas concentrações (0,3%) e bactericida em maiores concentrações (1%), a maior parte dos anti-sépticos contendo triclosan na formulação não excedem 0,5%.

Na figura 71 observou-se o menor tamanho de halo de *E. coli* e os maiores de *S. aureus*, respectivamente, porém, não há diferenças significativas para os tamanhos de halos entre as bactérias testadas ($p>0,05$), ressalta-se que os valores foram expressivos mesmo na menor concentração.

Os resultados foram considerados positivos, pois, o teste comparativo com o triclosan não emulsionado na concentração de 0,25% (m/m) teve um halo de inibição menor que 20 mm, ou seja, menor que sua nanoemulsão diluída mais de 900 vezes. Concentrações inibitórias em concentrações menores que 1 mg/mL já são consideradas relativamente baixas e ideais como antibióticos (MARTIN et al., 2012). A potencialização do efeito inibitório é clara quando observa-se que o triclosan não emulsionado na concentração de 0,075 mg/mL não formou sequer halo de inibição contra nenhuma das bactérias testadas (Figura 66), incluindo a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 extremamente sensível.

Halos maiores que 12 mm já permitem aferir alta atividade bacteriostática ao composto (JOE et al., 2012). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) no tamanho dos halos de inibição entre as amostras filtradas e não filtradas.

Figura 71: Comparação entre a atividade inibitória da nanoemulsão de triclosan (T) (A) e do triclosan diluído não emulsionado (B).

Legenda: (A) barra vermelha = 25mm; (B) barra vermelha = 18mm.

7.7.2.2. Teste de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida

Após avaliar se os microrganismos alvos são susceptíveis ao composto testado, é necessário encontrar a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (ação bacteriostática). Os testes de diluição em caldo (macro e microdiluição) são consolidados por sua eficácia e eficiência. O teste de microdiluição em caldo consiste em testar diluições seriadas de um composto em placa de 96 poços e pela verificação visual determinar a menor concentração que não apresentou crescimento, sendo, esta a concentração inibitória mínima, como o controle visual pode ser dificultado pela turvação do meio de cultura na presença da nanoemulsão, após o tempo necessário para leitura visual, uma alíquota de corante de células foi colocada em todos os poços para facilitar a identificação de crescimento bacteriano, a concentração inicial escolhida foi a correspondente a diluição 3% (v/v) do teste de susceptibilidade por ser a mais baixa concentração testada e ter sido considerada satisfatória.

Na figura 72 é possível verificar que apenas o controle negativo no poço 11 (sem presença de nanoemulsão de triclosan (T)) demonstra crescimento, ocorreu inibição do crescimento desde a mais alta até a mais baixa concentração de 0,075 e 0,000147 mg/mL, a concentração mínima inibitória (CMI) é considerada como sendo a anterior à menor concentração sem crescimento (sub-CMI), sendo portanto de 0,293 µg/mL, correspondente a 0,018% (v/v) da nanoemulsão de triclosan (T) sem diluição. Valores de CMI entre 25 e 100 mg/mL de composto já podem ser relacionadas à alta atividade inibitória (DUARTE et al., 2003), Zhang et al. (2014) compararam D-limoneno puro e nanoemulsificado e provaram que a nanoemulsificação reduziu o valor de CMI para *E. coli* de mais de 5 mg/mL para 1 µg/mL, e o efeito de potencialização já foi considerado quando a redução contra outras bactérias reduziu de 1 para 0,6 µg/mL.

Figura 72: Avaliação visual de crescimento pela técnica de microdiluição seriada, onde poços de coloração roxa indicam crescimento bacteriano. Legenda: poço 11 – controle negativo, poço 12 – controle positivo, demais poços correspondem as diluições seriadas da nanoemulsão de triclosan, começando em 75 µg/mL no poço. A e B – *E. coli*, C e D – *S. enteritidis* e E e F – *S. aureus*.

Considerando que o objetivo principal da tese era obter uma nanoemulsão capaz de eliminar (destruir) toda população dos microrganismos testados, e não apenas estagnar seu crescimento, é de extrema importância esclarecer se o composto possui também atividade bactericida, e, se sim, qual sua concentração mínima bactericida, ou seja, a menor concentração capaz de destruir uma população conhecida do microrganismo alvo. Após semear as alíquotas de todos os poços em placas contendo meio Müller Hinton, e observar a ausência de crescimento, foi possível definir o valor de CIB como 37,5 µg/mL, valor este, considerado muito baixo, indicando alto potencial antibiótico, não só na assepsia, mas, também na total desinfecção de tecidos/superfícies, sendo, interessante não só para uso tópico, mas, como componente a ser incorporado em luvas ou embalagens externas.

Para elucidar se a cristalização do triclosan na nanoemulsão armazenada a 4 °C inviabiliza sua aplicação, e, para comprovar a estabilidade no mecanismo de ação antibacteriana da nanoemulsão armazenada em 25 °C, os testes de susceptibilidade,

concentração inibitória mínima (CMI) e concentração inibitória bactericida (CIB) foram repetidos nos mesmos intervalos de tempo do teste de estabilidade ao armazenamento ao longo do tempo, para as duas temperaturas de armazenamento, com e sem filtração. Nos testes de concentração inibitória mínima verificou-se que a atividade antibacteriana se mantém mesmo com a diminuição do tamanho médio de gota em decorrência da cristalização do triclosan armazenado a 4 °C. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos tamanhos dos halos ao longo de todo período de estocagem (90 dias), garantindo que o princípio ativo continua dentro da gota sendo liberado sem interferências, assim como, a nanoemulsão armazenada em temperatura ambiente também manteve os mesmos valores de halo de inibição por todo período testado, os valores de CMI se mantiveram inalterados, mas, ao final do tempo de armazenamento (90 dias), para a nanoemulsão de triclosan armazenada a 4 °C os valores de CIB diminuíram para 18,75 µg/mL (Figura 73).

A hipótese de difusão do princípio ativo pela fase contínua sob a forma de micelas poderia explicar esse aumento de atividade, pois, a gota atua como carreador, e, se o mecanismo de maturação de Ostwald causou a presença de pequenas gotas, consequentemente, potencializou a atividade antibacteriana em função da diminuição do tamanho médio de gota por possibilitar maior área de contato com a parede celular bacteriana. O aumento de ativo na forma de micelas de tensoativo auxilia no ataque direto à membrana celular. Estes resultados endossam a viabilidade do uso da nanoemulsão de triclosan como sanitizante e bactericida.

Figura 73: Visualização de crescimento dos poços de concentração inibitória mínima para determinar concentração mínima bactericida. Onde, poço 3 é equivalente à 18,75 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusões

8. Conclusão

- ✓ Nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça foram desenvolvidas por duas etapas de processos de alta energia (homogeneizador de alta velocidade e homogeneizador de alta pressão);
- ✓ Fase oleosa contendo tensoativos lipofílicos vertida sob fase aquosa contendo tensoativos hidrofílicos acarretou em emulsões com menor quantidade de espuma e melhor homogeneidade;
- ✓ Baixas quantidades de fase oleosa auxiliam na redução no tamanho médio de gota e a relação ideal tensoativo/óleo foi de 1:2 (m/m);
- ✓ Nanoemulsões contendo eugenol tiveram menor tamanho médio de gota, possibilitando a produção de uma nanoemulsão com tamanho médio de gota < 100 nm, devido às propriedades de co-tensoativo do eugenol;
- ✓ A escolha ideal da temperatura de pré-emulsificação foi fundamental a formação de emulsões brutas com menor cremeação e formação de espuma;
- ✓ Baixas temperaturas auxiliaram na redução do tamanho médio de gota de todas as nanoemulsões;
- ✓ A geometria do recipiente utilizado para pré-mistura em homogeneizador de alta velocidade influenciou diretamente na redução de espuma gerada durante o processo;

- ✓ O aumento gradual de tempo e velocidade de agitação em homogeneizador de alta velocidade foi crucial para reduzir o tamanho médio de gota de 1000 para 300 nm da emulsão bruta de todos os princípios ativos estudados;
- ✓ Foi possível produzir nanoemulsões com tamanho médio de gota < 300 nm com homogeneizador de alta velocidade, otimizando as variáveis de processo e de composição;
- ✓ As gotas das nanoemulsões de eugenol, triclosan e extrato de pimenta dedo-de-moça tiveram formato esférico e boa homogeneidade de tamanhos;
- ✓ O comportamento das nanoemulsões com o mesmo princípio ativo, mas, diferentes tamanhos médios de gota, foi distinto frente aos testes de estabilidade térmica;
- ✓ Todas as nanoemulsões foram estáveis à força centrífuga até 3050 G;
- ✓ O principal mecanismo de instabilidade das nanoemulsões foi o maturação de Ostwald, porém, a atividade antibacteriana da nanoemulsão de triclosan (T) se mantém alta por todo período estudado, mesmo com alterações no tamanho médio de gota;
- ✓ Todas as nanoemulsões foram estáveis pelo período de 90 dias quando armazenadas em temperatura ambiente;

- ✓ A nanoemulsão de extrato de pimenta dedo-de-moça (P) exibiu fraca atividade antioxidante e nenhuma atividade antibacteriana;
- ✓ A nanoemulsão de eugenol (E) exibiu alta atividade antioxidante e nenhuma atividade antibacteriana;
- ✓ A nanoemulsão de triclosan (T) exibiu forte atividade bacteriostática e bactericida em baixas concentrações, sendo de grande interesse para uso como antiséptico, desinfetante e antibiótico;
- ✓ O tamanho médio de gota da nanoemulsão de triclosan maior que 100 nm, armazenada em temperatura ambiente, não se alterou durante o período de 90 dias, sendo interessante por diminuir a chance de permeação cutânea;
- ✓ As nanoemulsões de eugenol (E) e de triclosan (T) têm potencial de aplicação nas indústrias de alimentos e sanitária;
- ✓ A elucidação de todas as etapas e variáveis que influenciaram a formação das nanoemulsões é de grande interesse para estudos futuros.

9. Sugestões para estudos futuros

- ✓ Incorporação da nanoemulsão de eugenol em biofilmes para uso como embalagem ativa com atividade antioxidante;
- ✓ Aplicação das embalagens ativas em produtos como carnes frescas e acompanhamento da oxidação no produto ao longo do tempo;
- ✓ Aplicação da nanoemulsão de eugenol em coberturas comestíveis;
- ✓ Testes de citotoxicidade na nanoemulsão de triclosan;
- ✓ Testes *in vivo* da nanoemulsão de triclosan com atividade antibacteriana;
- ✓ Testes de atividade antifúngica e antiviral das nanoemulsões desenvolvidas;
- ✓ Testes de eficiência de encapsulação dos sistemas;
- ✓ Uso de capsaicina pura como princípio ativo.

Referências Bibliográficas

10. Referências Bibliográficas

- AL-ADHAM, I. S. I. et al. The antimicrobial activity of oil-in-water microemulsion is predicted by their position within the microemulsion stability zone. **The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2012.
- ALVES, E. et al. Estudo comparative de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, M. K. **Avaliação da ação antiinflamatória e antidislipidêmica de capsicum baccatum var. pendulum L. (Solanaceae) – pimenta dedo-de-moça**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Porto Alegre, 2006.
- ANARJAN, N. et al. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 123, n. 2, p. 477-483, 2010.
- ANTON, N. ; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions : Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 978-985, 2011.
- AOKI, T.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 209-220, 2005.
- AQUINO, D. R. et al. Ação antimicrobiana do triclosan sobre microbiota cariogênica. **Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 1-2, p. 79-86, 2004.
- ASNAASHARI, M. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerol of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 159, p. 439-444, 2014.

AYOOLA, G. A. et al. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 7, n. 3, p. 1019-1024, 2008.

BERNARDI, D. S. et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 9, n. 44, p. 1-9, 2011.

BINKS, B. P.; RODRIGUES, J. A. Influence of tensoativo structure on the double inversion of emulsions in the presence of nanoparticles. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 345, p. 195-201, 2009.

BRAND-WILLIAMS, M. E. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BORTOLIN, R. C. et al. Effects of chronic elevated ozone concentration on the redox state and fruit yield of red pepper plant *Capsicum baccatum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heights, v. 100, p. 114-121, 2014.

BOYD, J. et al. Factors affecting emulsion stability and the HLB concept. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 41, n. 2, p. 359-370, 1972.

BRÖSEL, S.; SCHUBERT, H. Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using high-pressure homogenizer with an orifice valve. **Chemical Engineering and Processing**, Amsterdam, v. 38, p. 533-540, 1999.

BURANASUKSOMBAT, U. et al. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. **Food Science Biotechnology**, Korea, v. 20, n. 3, p. 793-800, 2011.

CHEONG, J. N. et al. α -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, London, v. 89, n. 2, p. 204-209, 2008.

CHOI, A. J. et al. Effects of surfactants on the formation and stability of capsaicin-loaded nanoemulsions. **Food Science and Biotechnology**, Korea, v. 18, n. 5, p. 1161-1172, 2009.

CLARES, B. et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 473, n. 1-2, p. 591-598, 2014.

COSTA, L. M. et al. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 51-59, 2009.

CUSTÓDIO, J. et al. Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. **Revista Ciências Médicas**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 7-11, 2009.

DALMAZZONE, D.; HAMED, N.; DALMAZZONE, C. DSC measurements and modeling of the kinetics of methane hydrate formation in water-in-oil emulsion. **Chemical Engineering Science**, Kidlington, v. 64, n. 9, p. 2020-2026, 2009.

DANTAS, T. N. C. et al. Application of Surfactants for Obtaining Hydraulics Fracturing Gel. **Petroleum Science and Technology**, Philadelphia, v. 21, n. 7-8, 2003.

DAVIS, C. B. et al. Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 15, p. 5925-5933, 2007.

DIAS, D. O. et al. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsion obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 154-162, 2014.

DONSI, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effects of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 159, p. 342-350, 2012.

DONSI, F. et al. Infusion of essential oils for food stabilization: unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science and Engineering Technologies**, Amsterdam, v. 22, p. 212-220, 2014.

DONSI, F.; WANG, Y.; HUANG, Q. Freeze-thaw stability of lecithin and modified starch-based nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, p. 1327-1336, 2011.

DUARTE, S. et.al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n.4, p. 527-531, 2003.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 193-206, 2007.

ESCOBAR, L. R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas e desventajas de su uso. **Revista Cubana de Estomatología**, Havana, v. 39, n. 2, p. 139-156, 2002.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABST/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

GAUTÉRIO, D. P. et al. Perfil de sensibilidade ao triclosan de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniazida. **Vitalle**, Rio Grande, RS, v. 20, n. 1, p. 99-105, 2008.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, 2004.

GONTARD, N.; RING, S. Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 11, p. 3474-3478, 1996.

GRIFFIN, W. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. **Atlas Powder Company**, New York, p. 249-256, 1954.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidante source. **Arabian Journal of Chemistry**, Arabian Saudita, v. 5, p. 489-499, 2012.

GULLAPALI, R. P.; SHETH, B. B. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 48, p. 233-238, 1999.

GUOJUNG, L. et al. Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the gydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 447, p. 8-13, 2014.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 75, n. 1, p. 50-57, 2010.

HSU, J.; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloids and Interface Science**, Maryland Heights, v.259, p. 374-381, 2003.

IRKIN, R.; KORUKLUOGLU, M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 12, n. 1, p. 193-197, 2009.

JAFARI, S. M. et al. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 22, p. 1191-1202, 2008.

JOE, M. M. et al. Development of surfactin based nanoemulsion formulation from selected cooking oils: evaluation for antimicrobial activity against selected food associated microorganisms. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Taiwan, v. 43, n. 2, p. 1-6, 2012.

JORGE, M. F. et al. Viscoelastic and rheological properties of nanocomposite-forming solutions based on gelatin and montmorillonite. **Journal of Food Engineering**, London, v. 120, p. 81-87, 2014.

KABALNOV, A. Ostwald ripening and related phenomena. **Journal of Dispersion Science and Technology**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2001.

KARJIBAN, R. A. et al. Structural properties of nonionic tween80 micelle in water elucidated by molecular dynamics simulation. **APCBEE Procedia**, [New York], v. 3, p. 287-297, 2012.

KENTISH, S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 170-175, 2008.

KLANG, V. et al. Electron microscopy of nanoemulsions: Na essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, Oxford, v. 43, n. 2-3, p. 85-103, 2012.

LANDRY, K. S. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfafa seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 187, p. 15-21, 2014.

LEE, S. J.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 24, n. 6-7, p. 560-569, 2010.

LEE, L.; NORTON, I. T. Comparing droplet break-up for a high-pressure valve homogenizer and a microfluidizer for the potential production of food-grade nanoemulsions. **Journal of Food Engineering**, London, v. 114, n. 2, p. 158-163, 2013.

LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 377-382, 2009.

LIMA, S. V.; OLIVEIRA, H. P. Determinação do ponto de névoa em surfactantes não iônicos por espectroscopia de impedância elétrica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1928-1932, 2010.

LITZ, V. M. et al. Anti-sepsia de mãos na indústria de carnes: avaliação da clorhexidina, triclosan e iodóforo na redução da contaminação microbiana em manipuladores. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 321-326, 2007.

LIU, A. et al. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 4, p. 1393-1403, 2010.

LÓPEZ-RUBIO, A. et al. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 357-387, 2004.

MARQUES, S. R. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 330-335, 2008.

MARTIN, J. G. P. et al. Antimicrobial potential and chemical compositions of agro-industrial wastes. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 5, p. 27-36, 2012.

MARTINS, R. M. et al. Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregando o óleo essencial extraído do cravo-da-índia. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 1, n. 3, p. 259-263, 2008.

MASON, T. G. et al. Nanoemulsions : formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, Bristol, v. 18, n. 41, p. 635-666, 2006.

McCLEMENTS, D. J. Colloidal basis of emulsion color. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, n. 7, p. 451-455, 2002.

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

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions : terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MIKULA, R. J.; MUNOZ, V. A. Characterization of emulsions and suspensions in the petroleum industry using cryo-SEM and CLSM. **Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 23-36, 2000.

MORAES, I. C. F. et al. Film forming solution based on gelatin and poly(vinil alcohol) blends : Thermal and rheological characterizations. **Journal of Food Engineering, London**, v. 95, n. 4, p. 588-596, 2009.

MORAIS., D. C. M. et al. Ação cicatrizante de substâncias ativas : d-pantenol, óleo de girassol, papaína, própolis e fator de crescimento de fibroblastos. **Foco**, Brasília, v. 4, n. 4, 2013.

MUN, S. et al. Influence of environmental stresses on the stability of W/O/W emulsions containing enzymatically modified starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 92, n. 2, p. 1503-1511, 2013.

NAZARZADEH, E. et al. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **Journal of Colloids and Interface Science**, Maryland Heights, v. 397, p. 154-162, 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard –Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 Wayne, USA, 2003.

NEVES, W. S. et al. Ação nematocida de extratos de alho, mostarda, pimenta malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsaicinóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica*, (treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 255-261, 2009.

ORDOÑEZ, G. et al. Efficacy of eugenol against a *Salmonella enterica* serovar Enteridis experimental commercial layers in production. **Journal of Applied Poultry Research**, Cary, v. 17, n. 3, p. 376-382, 2008.

PAL, R. Influence of interfacial rheology on the viscosity of concentrated emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 365, n. 1, p. 118-122, 2011.

PERESSINI, D. et al. Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. **Journal of Food Engineering**, London, v. 59, n. 1, p. 25-32, 2003.

PERSSON, K. et al. Creation of well-defined particle stabilized oil-in-water nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 459, p. 48-57, 2014.

PREETZ, C. et al. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 39, n. 1-3, p. 141-151, 2010.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992.

QIAN, C.; McCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsion stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 1000-1008, 2011.

QIU, J. et al. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 17, p. 5846-5851, 2010.

RALM-CHIQUÉ, K. et al. Nanoemulsion stability: experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 178, p. 1-20, 2012.

RAO, J.; McCLEMENTS, D. J. Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 268-276, 2012.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUEZ, M. G. et al. Uso de la crema repelente de *Pimenta dioica* por combatientes de una unidad militar. **Revista Cubana de Medicina Militar**, Cuba, v. 26, n. 2, p. 94-97, 1997.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 401-407, 2013.

SARANYA, S.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Antibacterial activity of eucalyptus oil nanoemulsion against *Proteus Mirabilis*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 4, n. 3, p. 668-671, 2012.

SAUPE, A.; GORDON, K. C.; RADES, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 314, n. 1, p. 56-62, 2006.

SAKAI, T. et al. Monitoring growth of surfactant-free nanodroplets dispersed in water by single-droplet detection. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 107, n. 13, p. 2921-2926, 2003.

SCHIMIDTS, T. et al. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 338, n. 1, p. 184-192, 2009.

SHANTILAL, J.; BHATTACHARYA, S. (Eds.). **Nanoparticles and nanotechnology in food, in conventional and advanced food processing technologies**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2014.

SHINODA, K. et al. The effect of the size and the distance of the oxyethylene chain lengths of nonionic emulsifier on the stability of emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 35, n. 4, p. 624-630, 1971.

SHINODA, K.; YONEYAMA, T.; TSUTSUMI, H. Evaluation of emulsifier blending. **Journal of Dispersion Science and Technology**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 1-12, 1980.

SILVA, D. J. F. et al. Determinação do potencial antioxidante do extrato filtrado de *Capsicum baccatum* (pimenta dedo-de-moça) através do método DPPH. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PUCRS, 10., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2009.

SILVA, H. D. et al. Nanoemulsions of b-carotene using high-energy emulsification-evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, London, v. 102, n. 2, p. 130-135, 2011.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 3, p. 854-867, 2012.

SILVA, R. C. S.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados por interesterificação química de banha e óleo de soja. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 330-335, 2008.

SOBRAL, P. J. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 15, n.4, p. 423-432, 2001.

SIVAKUMAR, M. et al. Cavitation technology – a greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 2069-2083, 2014.

SPERANZA, P. et al. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial activity of interesterified Amazonian oils. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 1, p. 207-212, 2015.

SURIYARAK, S.; WEISS, J. Cutoff Ostwald ripening stability of alkane-in-water emulsion loaded with eugenol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 446, p. 71-79, 2014.

TAKAMURA, A. et al. Effects of Tween and Span group emulsifiers on the stability of O/W emulsions. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 12, p. 2921-2926, 1979.

TANOMARU, J. M. G. et al. Antibacterial activity of four mouthrinses containing triclosan against salivary *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 569-572, 2008.

TEIXEIRA, P. et al. Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 15-19, 2007.

TERJUNG, N. et al. Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. **Food & Function**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 290-301, 2012.

VARGAS, M. et al. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 18, n. 12, p. 1146-1152, 2008.

VINCENT, R. R. R. et al. Simple transmission measurements discriminate instability processes in multiple emulsions. **Soft Matter**, Cambridge, v. 7, n. 6, p. 2697-2704, 2011.

VLACHOS, N. et al. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 573-574, p. 459-465, 2006.

YANG, Y.; McCLEMENTS, D. J. Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 712-720, 2013.

YOSSA, N. et al. Inactivation of *Salmonella* in organic soil by cinnamaldehyde, eugenol, ecotrol, and sporan. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 8, n. 2, p. 311-317, 2011.

YUAN, Y. et al. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, Kidlington, v. 41, n. 1, p. 91-68, 2008.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-197, 2009.

ZHANG, H. et al. Antimicrobial activity of a food-grade fully dilutable microemulsion against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 135, n. 3, p. 211-215, 2009.

ZHANG, H. et al. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 307-312, 2014.

ZHOU, H. et al. Preparation and characterization of lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, n. 1, p. 224-230, 2010.

WANG, X. Q. et al. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 419-424, 2008.

WEISS, J. et al. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.

WOOSTER, T. J. et al. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. **Langmuir**, Washington, v. 24, n. 22, p. 12758-12765, 2008.