



Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física

Frangé, R.C.C.¹; Garcia, M.T.J.^{1*}

¹ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Faculdade de Farmácia - Universidade de Uberaba - UNIUBE.

Recebido 03/02/2009 / Aceito 08/02/2010

RESUMO

Emulsões óleo de oliva/água, na presença de agentes emulsionantes não-iônicos, foram avaliadas quanto à estabilidade física. Assim, prepararam-se emulsões fazendo uso de diferentes emulsionantes, sendo um hidrofílico e o outro lipofílico, nas diferentes proporções. As emulsões mais estáveis, adicionaram-se agentes auxiliares da emulsificação, visando otimizar a estabilidade; e estudos de estabilidade foram conduzidos, submetendo as amostras em condições e períodos diversos de armazenamento. Para caracterização da estabilidade, as amostras foram examinadas macroscopicamente e submetidas às análises de pH, centrifugação, viscosidade, potencial zeta e distribuição de tamanho de partícula. Os resultados demonstraram que as emulsões óleo de oliva/água não apresentaram alteração, ou seja mantiveram-se estáveis, quanto às propriedades organolépticas, bem como físico-químicas, quando armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Das emulsões obtidas, as que apresentaram maior estabilidade provêm da associação de agentes emulsionantes que resultaram em equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) equivalente a 12. As emulsões provenientes da associação de agentes emulsionantes que possuem cadeias de ácidos graxos insaturados similares ao óleo de oliva produziram estabilidade máxima, demonstrando que a similaridade estrutural entre os componentes da fase oleosa e os agentes emulsionantes é essencial para a estabilidade da emulsão.

Palavras-chave: Emulsão O/A. Estabilidade. Óleo de Oliva. EHL. Emulsionante não-iônico.

INTRODUÇÃO

As emulsões são dispersões de duas fases líquidas imiscíveis entre si, usualmente água e óleo, estabilizadas pela presença de agentes emulsivos, localizados na interface óleo/água.

Os agentes emulsivos, com propriedade de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e a água, têm papel fundamental na estabilização de emulsões. Entretanto estes compostos não conseguem diminuir a tensão interfacial a ponto de contrariar totalmente a energia livre de superfície provocada pelo aumento da área interfacial. Desta forma as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e, no desenvolvimento tecnológico, procura-se utilizar de meios que possam retardar pelo maior tempo possível a separação das fases (Oliveira et al., 2004).

Presume-se que a estabilidade destas preparações depende do tipo de agente emulsionante utilizado e das características físicas da película interfacial formada. Esta película deve ser rígida e compacta (Prista et al., 1995), possuir certo grau de elasticidade superficial e não deve romper-se quando pressionada pelas gotículas, mas ao romper-se, deve ser capaz de formar-se rapidamente (Gennaro, 1999), impedindo a aproximação e conseqüente junção da fase dispersa.

Por vezes, um único emulsionante é capaz de originar o tipo de emulsão desejada, no entanto, emulsões mais estáveis são preparadas quando se utilizam misturas de emulsionantes, sendo um para a formação de emulsões O/A e outro para a formação de emulsões A/O (Prista et al., 1995; Gullapalli & Sheth, 1999). Postulam-se que os agentes emulsivos hidrofílicos e lipofílicos alinham-se um ao lado do outro, conferindo maior rigidez e resistência ao filme emulsivo, através de pontes de hidrogênio (Fox, 1986).

De acordo com Schulman & Cockbain (1940), esses agentes emulsionantes são capazes de formar entre si complexos interfaciais na superfície dos glóbulos dispersos. Esses complexos promovem a formação e a estabilização da emulsão porque diminuem a tensão interfacial mais acentuadamente do que quando se emprega um só agente emulsionante, além de originarem uma película compacta, mas flexível, na interface. Se o filme interfacial for eletricamente carregado, forças repulsivas, em consequência da formação da dupla camada elétrica, contribuirão para estabilidade do sistema (Aulton, 2005).

Para Gullapalli & Sheth (1997;1999), a estabilidade das emulsões O/A pode ser obtida pela otimização da mistura de emulsificantes hidrofílicos e lipofílicos. Segundo os autores, a similaridade estrutural dos agentes emulsificantes com a fase dispersa é essencial para a estabilidade da emulsão; e a estabilidade pode ser favorecida pelo complexo formado entre o agente de viscosidade

Autor correspondente: Maria Teresa Junqueira Garcia - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Faculdade de Farmácia - Universidade de Uberaba - UNIUBE Av. Nené Sabino, nº 1801, Bairro Universitário - CEP: 38055-550 - Uberaba Minas Gerais - Brasil - e-mail: mtjgarcia@yahoo.com

hidrofílico e tensoativo hidrofílico e pela interação do tensoativo hidrofílico com a fase oleosa.

Por outro lado, as emulsões instáveis se manifestam das seguintes formas (Silva & Soares, 1996): floculação, onde as gotículas se agregam em aglomerados frouxos, dentro da emulsão, conservando sua identidade individual, mas cada aglomerado comporta-se fisicamente como uma unidade única; coalescência que é caracterizada por uma larga distribuição de tamanho das gotículas, resultando na separação de fases de forma visível ao olho nu; creaming onde a fase dispersa, conforme sua densidade relativa à fase contínua, sobe até à superfície ou desce até o fundo da emulsão, formando uma camada de emulsão mais concentrada (Lieberman et al., 1988; 1989; Aulton, 2005); amadurecimento de Ostwald, onde as partículas maiores crescem de tamanho devido à dissolução das partículas menores (Welin-Berger & Bergenstahl, 2000).

A medida que as emulsões se tornam instáveis, suas características físico-químicas variam. Assim, para verificar tais variações pode-se determinar o valor do pH, viscosidade, a distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, entre outros (Brasil, 2004).

Logo, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a estabilidade física de emulsões óleo de oliva/água, empregando a associação de diferentes agentes emulsionantes não-iônicos, nas diferentes proporções.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Óleo de Oliva (Pharmaspecial) - índice de acidez 1%, Monoleato de Polioxietilenossorbitano (Tween 80, EHL= 15)(Synth), Álcool Cetoestearílico Etoxilado 20OE (EHL=15,4) (Pharmaspecial), Álcool Oleílico Etoxilado 3OE (EHL= 6,6) (Becto Research Chemical), Álcool Laurílico Etoxilado 2OE (EHL=6,2) (Chemistry), Glicerina (Galena), Metilparabeno (Pharmaspecial), Propilparabeno (Pharmaspecial), Carbopol 940 (Galena), Natrosol 250 HHR (Pharmaspecial), Butil Hidroxi Tolueno – BHT (Pharmaspecial), Solução de NaOH 20% (p/v) (Nuclear).

MÉTODOS

Determinação do Equilíbrio-Hidrofílico-Lipofílico (EHL) do óleo de oliva

Para o presente estudo, empregaram-se tensoativos com cadeias graxas e EHLs (Tween 80, EHL= 15; Álcool Cetoestearílico Etoxilado 20 OE, EHL=15,4; Álcool Oleílico Etoxilado 3OE, EHL= 6,6; Álcool Laurílico Etoxilado 2OE, EHL=6,2) distintos. Para a associação de tensoativos, teve-se como critério a polaridade dos mesmos, empregando um com características hidrofílicas e outro com características lipofílicas.

Para determinar o EHL do óleo de oliva, preparouse com ele uma série de emulsões contendo 5g de um par de emulsionantes (monooleato de polioxietilenossorbitano (Tween 80)/ Álcool Oleílico Etoxilado 3OE; monooleato de

polioxietilenossorbitano (Tween 80)/Álcool cetoestearílico 20OE; monooleato de polioxietilenossorbitano (Tween 80)/Álcool laurílico etoxilado 2OE; Álcool cetoestearílico etoxilado 20OE/Álcool laurílico etoxilado 2OE), misturados em proporções variáveis, de modo a originarem valores definidos, mas escalonados de EHL; 10g de óleo de oliva e água até completar 100g (Prista et al., 1996).

As emulsões foram preparadas aquecendo separadamente a fase aquosa e oleosa em banho-maria (Tecnal TE – 057) à 70°C. Após o aquecimento, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa, e o sistema foi mantido sob agitação a 15000 rpm (Ultra-Turrax®T25) por cinco minutos. Após agitação, as emulsões foram envasadas e acondicionadas em temperatura ambiente.

Decorridas 24 horas, procedeu-se ao exame de todas as emulsões, tomando-se como ponto de referência aquela que apresentou-se mais estável, isto é, que não tinha aspecto grumoso nem separação de fases e com alto índice de cremeação. Segundo Krishna et al., 1998, a estabilidade pode ser mensurada pelo percentual de cremeação.

O índice de cremeação foi determinado pela seguinte equação: $C = 100 \times (V_s/V_t)$, onde V_t corresponde ao volume total da amostra; V_s corresponde ao volume da fase emulsionada. De acordo com a equação, quanto maior o valor de C, maior a estabilidade do sistema.

Preparação das emulsões

As emulsões em estudo foram feitas empregando óleo de oliva (10% p/p), BHT (0,1% p/p) como antioxidante, álcool oleílico etoxilado 3EO (1,8% p/p) e Tween 80 (3,2% p/p) como emulsionantes, Carbopol 940 (0,4% p/p) e hidroxietilcelulose (0,2% p/p) como agentes de viscosidade e promotores da estabilidade, metilparabeno (0,18% p/p) e propilparabeno 0,02% (p/p) como conservantes microbiológicos. As emulsões foram preparadas aquecendo-se as fases separadamente à temperatura não superior a 70°C. Na fase aquosa solubilizou-se a glicerina, metilparabeno, Tween 80. Dipersou-se ainda nesta fase o Hidroxietilcelulose e o Carbopol 940, seguido do ajuste do pH (pH 5,5) com 0,5 mL de uma solução de NaOH 20% p/v. A este sistema verteu-se a fase oleosa, submetendo-o à agitação a 15000 rpm (Ultra-Turrax®T25) por 5 minutos.

Estudo de estabilidade das emulsões

O estudo de estabilidade foi baseado no método proposto no Guia de Estabilidade sugerido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2004), onde as amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer, permitindo, assim, obter informações sobre a estabilidade do produto em menor tempo possível.

Estabilidade preliminar das emulsões

As amostras (triplicatas) foram acondicionadas em frascos plásticos com tampa, a fim de garantir boa vedação. O volume total do frasco não foi completado para permitir possíveis trocas gasosas. A duração do estudo foi de 15 dias. As amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa à

50 ± 2°C, ao resfriamento em refrigeradores à -5 ± 2°C, à ciclos alternados de resfriamento e aquecimento (ciclos de 24 horas à 50 ± 2°C, e 24 horas à -5 ± 2°C), à exposição a luz solar e à temperatura ambiente sob ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas no tempo de 24 horas e aos 7° e 15° dias, quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor), ao pH, à viscosidade, bem como à separação de fase por centrifugação.

Estabilidade acelerada das emulsões

As amostras foram acondicionadas nas condições descritas anteriormente. A duração do estudo foi de 90 dias. As amostras (triplicadas) foram submetidas ao aquecimento em estufa à 50 ± 2°C, ao resfriamento em refrigeradores à -5 ± 2°C, à temperatura ambiente sob ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas no tempo de 24 horas e aos 15°, 60° e 90° dias. Os parâmetros avaliados foram: características organolépticas (aspecto, cor e odor), separação de fase por centrifugação, pH, viscosidade, distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta.

Ensaio Organolépticos

Observaram-se visualmente as características das amostras, verificando se ocorreram modificações macroscópicas, tais como: separação de fase, formação de grumos, precipitados; bem como a cor e o odor em relação ao padrão estabelecido.

Ensaio Físico-Químicos

Centrifugação

Em tubo de ensaio cônico graduado para centrifuga (Fanem Ltda–Mod. 206 R, Excelsa BABY II–440 watts) foi adicionado 1,0g de cada amostra, pesado em balança semi-analítica (Gehaka, Mod. BG 4000) e submetido ao ciclo de 3500 rpm (863g) durante trinta minutos à temperatura ambiente.

Determinação de pH

A determinação do pH foi baseada no método proposto por Borghetti & Knorst (2006), utilizando-se de amostras diluídas em água destilada (1:10 p/v), homogeneizadas e submetidas à leitura, à temperatura de 25°C ± 1, em peagômetro (Micronal - modelo B 474), previamente calibrado com soluções de pH 7,0 e 4,0. Os resultados correspondem a média de três determinações com os respectivos desvios padrão.

Determinação da viscosidade

A viscosidade foi determinada utilizando-se o viscosímetro de Brookfield, série LV. O “spindle” empregado foi o de nº4.

Para a realização da leitura, as amostras foram acondicionadas em tubo de ensaio, tomando-se o cuidado

necessário para que não houvesse incorporação de ar na amostra. O “spindle” foi incorporado à amostra de modo a evitar a formação de bolhas de ar em contato com a superfície do mesmo, para não ocasionar erros na leitura. As leituras foram realizadas nas velocidades de rotações de 0,3; 0,6; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 30,0 e 60,0 rpm de modo crescente e decrescente à temperatura de 25 ± 1°C. Os resultados correspondem à média de três leituras com os respectivos desvios padrão.

Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado pela mensuração da mobilidade eletroforética da partícula dispersa em um campo elétrico. Cem miligramas das amostras em estudo foram diluídos em 5 mL de água de deionizada, homogeneizados até à completa dispersão e submetidos à análise para a determinação do potencial zeta (Malvern Nano ZS). Os resultados correspondem à média de três leituras com os respectivos desvios padrão.

Análise da distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partícula foi determinada pela técnica de dispersão de luz laser, em que cem miligramas das amostras em estudo foram diluídos em 5 mL de água de deionizada, homogeneizados até à completa dispersão e submetidos à análise para a determinação da distribuição do tamanho de partículas (Beckman Coulter LS 13/320). Os resultados correspondem à média de três leituras.

Análise Estatística

Os resultados dos ensaios de estabilidade foram submetidos ao teste estatístico ANOVA – *Post test*: Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Instat, Version 3.01, 32 bit for Win95/NT.

RESULTADOS

Determinação do EHL

Os EHLs e os respectivos índices de cremeação das emulsões óleo de oliva/água na presença dos tensoativos álcool oleílico etoxilado/Tween 80 encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Os EHLs e o respectivos índices de cremeação (IC) das emulsões óleo de oliva/água na presença dos tensoativos álcool oleílico etoxilado/Tween 80, após 24 hs da preparação.

EHL	8	9	10	11	12	13	14	15
IC	87%	96%	96%	96%	98%	83%	81%	80%

EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

As associações de agentes emulsionantes, todos com o mesmo EHL (EHL 12), demonstraram um índice de cremeação equivalente à 96%, 94% e 79% para as associações Tween 80/álcool laurílico etoxilado 2OE, álcool cetosteárilico etoxilado 20OE/álcool oleílico etoxilado

3OE e álcool cetosteárico etoxilado 20OE/álcool laurílico etoxilado 2OE, respectivamente.

Estudo de estabilidade preliminar

A emulsão com estabilidade máxima nos estudos de EHL, acrescida dos auxiliares de emulsificação, foi submetida aos estudos preliminares de estabilidade, por um período de 15 dias (Brasil, 2004). As amostras foram examinadas macroscopicamente e submetidas às análises de pH, viscosidade e centrifugação. Os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados dos testes preliminares de estabilidade das emulsões óleo de oliva/água com a associação de tensoativos não iônicos (Tween 80/álcool oleílico etoxilado 3OE).

Aspecto*	pH	Viscosidade		Centrifugação			
		1°Dia	15°Dia	1°Dia	15°Dia		
Controle	N	5,40(±0,14)	5,51(±0,01)	140333,30 (±24090,11)	130000,00 (±12288,21)	N	N
Estufa	N	5,33(±0,05)	5,45(±0,05)	131333,30 (±21197,48)	166333,30 (±16041,61)	N	N
Ciclo	N	5,31(±0,02)	5,47(±0,07)	144333,30 (±9712,53)	148333,30 (±9504,38)	N	N
Refrigerador	N	5,38(±0,04)	5,42(±0,07)	142666,70 (±7023,77)	131333,30 (±8326,66)	N	N
Luz solar	N	5,44(±0,10)	5,48(±0,04)	138666,70 (±13428,82)	137666,70 (±3511,88)	N	N

Viscosidade referente à tensão de cisalhamento de 0,025 s⁻¹; Controle (amostras protegidas da luz e mantidas à temperatura ambiente); Estufa (amostras mantidas à temperatura de 50°C); Ciclos (amostras submetidas por períodos alternados à temperatura de -5°C e 50°C); Refrigerador (amostras mantidas à temperatura de -5°C); Luz solar (amostras expostas à luz solar).

* refere às propriedades organolépticas: cor, odor e aspecto.

N- normal.

Estudo de estabilidade acelerada

Diante da estabilidade apresentada nos estudos preliminares de estabilidade, a emulsão foi submetida aos estudos de estabilidade acelerada, por um período de 90 dias (Brasil, 2004). As amostras foram examinadas quanto ao aspecto, cor e odor; e submetidas às análises de pH, centrifugação, viscosidade, potencial zeta e distribuição de tamanho de partícula.

Ensaio Organolépticos

As emulsões submetidas aos ensaios de estabilidade demonstraram semelhança, no que se refere à cor, odor e aparência, em relação às emulsões recentemente elaboradas, independente das condições e períodos de armazenamento.

Centrifugação

As emulsões submetidas aos ensaios de estabilidade mantiveram-se estáveis nos ensaios de centrifugação, não apresentando cremação, tão pouco separação de fase.

Determinação do pH

O pH das emulsões em estudo foi ajustado para o pH 5,49 ± 0,03 e acompanhado durante os estudos de estabilidade. Os valores obtidos estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores dos pHs das emulsões óleo de oliva/água recentemente obtidas e armazenadas sob condições e períodos diversos.

	1° dia	15° dia	60° dia	90° dia
Controle	5,490 (±0,031)	5,565 (±0,015)	5,525(±0,095)	5,533(±0,095)
Estufa	-	5,633 (±0,040)	5,520(±0,240)	5,220(±0,028)
Refrigerador	-	5,583(±0,033)	5,487(±0,152)	5,370(±0,057)

Controle (armazenamento à temperatura ambiente sob ao abrigo da luz; Estufa (armazenamento em estufa à 50°C); Refrigerador (armazenamento em refrigerador à -5°C).

Distribuição do tamanho de partículas

O perfil de distribuição do tamanho de partículas das emulsões recentemente obtidas e das emulsões armazenadas sob condições e períodos diversos está representado na Figura 1.

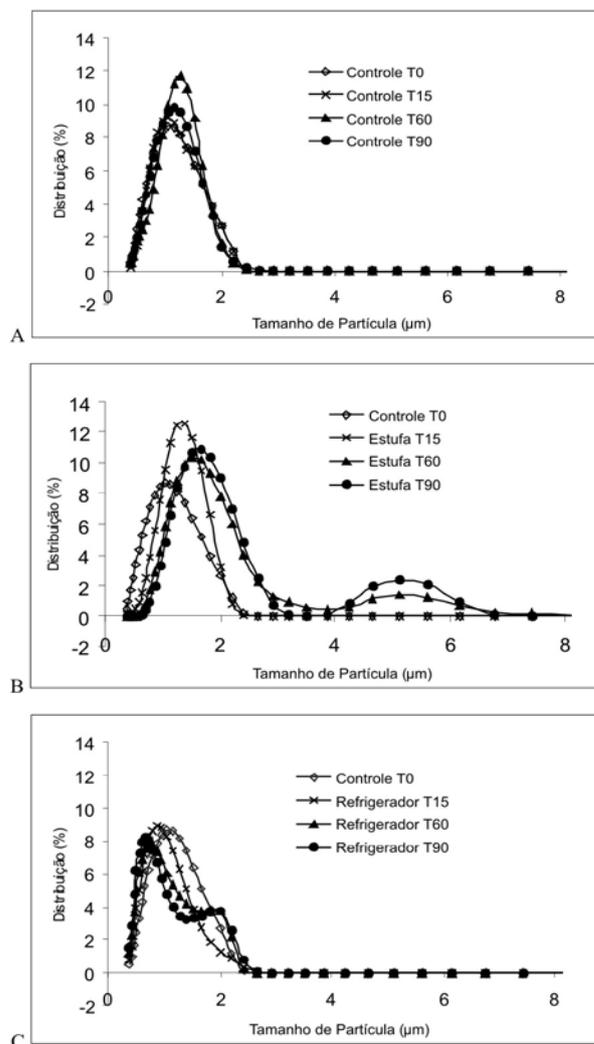


Figura 1 - Distribuição de tamanho de partículas das emulsões óleo de oliva/água armazenadas sob condições e períodos diversos. Controle T0 = emulsões recentemente obtidas. A. emulsões armazenadas à temperatura ambiente por 15, 60 e 90 dias. B. emulsões armazenadas em estufa à 50°C por 15, 60 e 90 dias. C. emulsões armazenadas em refrigerador à -5°C por 15, 60 e 90 dias.

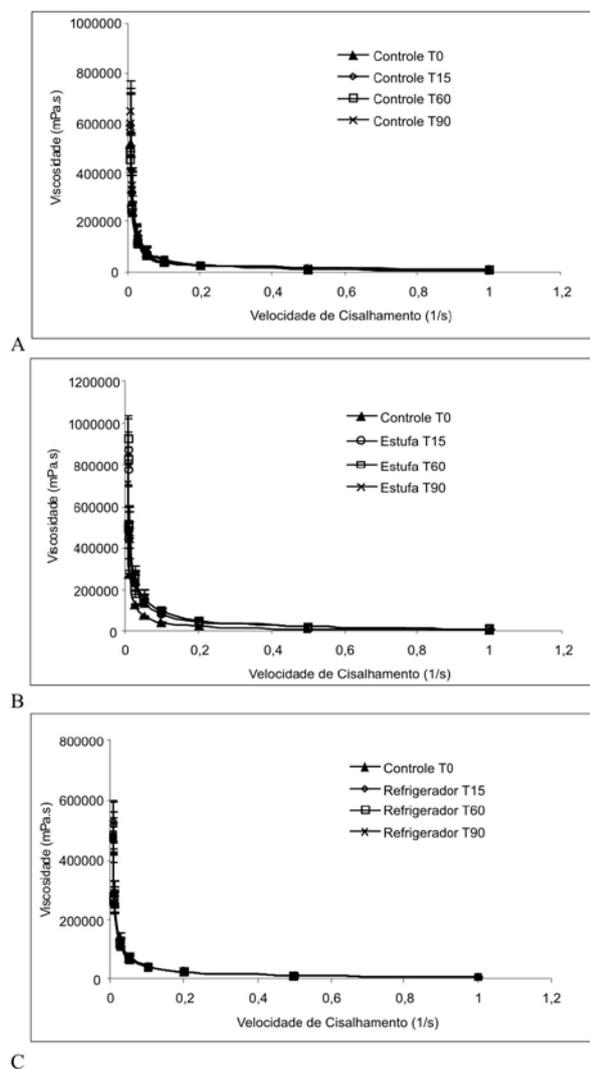


Figura 2 - Reogramas das emulsões óleo de oliva/água armazenadas sob condições e períodos diversos. Controle T0 = emulsões recentemente obtidas. A. emulsões armazenadas à temperatura ambiente por 15, 60 e 90 dias. B. emulsões armazenadas em estufa à 50°C por 15, 60 e 90 dias. C. emulsões armazenadas em refrigerador à -5°C por 15, 60 e 90 dias.

Determinação da Viscosidade

Determinou-se a viscosidade das amostras armazenadas sob condições e períodos diversos em

Tabela 4 – Valores de viscosidade (mPa.s) das emulsões óleo de oliva/água recentemente obtidas e armazenadas e condições e períodos diversos.

	T0		T15		T60		T90		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Controle	ida	72000,00	±8000,00	66500,00	±6363,96	64666,67	±5965,17	71500,00	±4596,19
	volta	72666,67	±8020,80	67500,00	±5656,85	66166,67	±6601,76	88500,00	±13332,29
Estufa	ida	70500,00	±2179,44	142666,67	±13428,82	159500,00	±14256,57	157666,67	±38135,72
	volta	69833,33	±1607,27	138666,67	±17953,64	159666,67	±13530,82	157000,00	±39281,03
Refrigerador	ida	74000,00	±5656,85	74833,33	±6525,59	71000,00	±5267,82	69666,67	±8519,58
	volta	67333,33	±12583,05	73666,67	±9305,016	69666,67	±5131,60	68000,00	±7549,83

Viscosidade referente à tensão de cisalhamento de 0,05 s⁻¹; Controle (amostras protegidas da luz e mantidas à temperatura ambiente); Estufa (amostras mantidas à temperatura de 50°C); Ciclos (amostras submetidas por períodos alternados à temperatura de -5°C e 50°C), Refrigerador (amostras mantidas à temperatura de -5°C). T0, T15, T60 e T90 correspondem ao 1°, 15°, 60° e 90° dia de armazenamento, respectivamente. Os resultados correspondem à média de três leituras com os respectivos desvios padrão.

diferentes tensões de cisalhamento, o que permitiu a construção do reograma representado na Figura 2. A Tabela 4 apresenta os valores de viscosidade referente à tensão de cisalhamento de 0,05 s⁻¹ das emulsões óleo de oliva/água recentemente obtidas e armazenadas sob condições e períodos diversos.

Potencial Zeta

A Tabela 5 apresenta os valores do potencial zeta das emulsões óleo de oliva/água recentemente obtidas e armazenadas sob condições e períodos diversos.

Tabela 5 - Valores do potencial zeta das emulsões óleo de oliva/água recentemente obtidas e armazenadas sob condições e períodos diversos.

	1° dia	15° dia	60° dia	90° dia
Controle	-36,4±0,4 mV	-40,2±0,8 mV	-52,1±2,8 mV	-49,6±0,6 mV
Estufa	-	-	-49,5±0,5 mV	-24,0±2,8 mV
Refrigerador	-	-	-51,7±2,9 mV	-22,8±0,7 mV

Controle (amostras protegidas da luz e mantidas à temperatura ambiente); Estufa (amostras mantidas à temperatura de 50°C); Ciclos (amostras submetidas por períodos alternados à temperatura de -5°C e 50°C), Refrigerador (amostras mantidas à temperatura de -5°C).

DISCUSSÃO

Emulsões fisicamente estáveis são melhores preparadas por meio da presença de uma camada condensada de emulsionante na interface óleo/água; e, os filmes interfaciais complexos, obtidos mediante a mistura de um agente emulsionante solúvel em água com outro solúvel em óleo, permitem obter emulsões com resultados mais satisfatórios (Aulton, 2005).

O método de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) tem se tornado uma ferramenta útil na escolha do agente emulsionante para uma determinada fase oleosa. O método parte do princípio que a emulsificação adequada se dá quando o agente emulsificante possui EHL igual ao da fase oleosa a ser emulsificada. Assim, preparou-se uma série de emulsões contendo 85% (p/p) de fase aquosa, 10% (p/p) de óleo de oliva e 5% (p/p) de uma mistura de tensoativos (Tween 80/álcool oleílico etoxilado 3OE; Tween 80/álcool laurílico etoxilado 2OE; álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE/álcool oleílico etoxilado 3OE; álcool cetosteárilico etoxilado 20OE/álcool laurílico etoxilado 2OE). Os

tensoativos foram associados em proporções variáveis, de modo a originarem valores definidos, mas escalonados de EHL (Prista et al., 1995). Os resultados (Tabela 1) demonstram que a emulsão (a base de óleo de oliva) mais estável corresponde ao índice de cremeação de 98%, cujo EHL é igual a 12. O valor de EHL do presente estudo se diferencia do obtido por Gullappali & Sheth (1999), os quais apresentam um valor igual a 10. Segundo Gennaro (1999), a presença ou ausência de qualquer polaridade no material a ser emulsificado pode afetar a polaridade exigida do agente emulsificante. O óleo de oliva é constituído por triglicerídeos. A hidrólise destes compostos pode ocasionar a formação de ácidos graxos livres (Driscoll et al., 2001), conferindo acidez ao óleo; modificando, conseqüentemente, as propriedades físico-químicas do mesmo. Considerando que o índice de acidez do óleo de oliva empregado no presente estudo é de 1%, logo a polaridade do presente óleo requer emulsificantes com polaridades específicas, justificando, assim, os distintos valores de EHLs observados. Entretanto, os resultados obtidos estão condizentes com a literatura, no que se refere ao EHL da família dos óleos vegetais, que está compreendido entre 7 e 12 (Prista et al., 1995).

As associações de agentes emulsionantes, todos com o mesmo EHL, resultam em emulsões com estabilidades distintas. As misturas, que contêm ao menos um emulsificante com cadeia de ácido graxo insaturado similar ao óleo de oliva (o qual possui em sua constituição principalmente ácido oléico (75%), bem como, ácido linoléico, ácido esteárico, ácido palmítico) produziram emulsões mais estáveis, demonstrando que a similaridade estrutural entre os componentes da fase oleosa e os agentes emulsificantes é essencial para a estabilidade da emulsão (Petrowski, 1976; Garti & Remon, 1984; Gullapalli & Sheth, 1999; Aulton, 2005).

Os colóides hidrofílicos têm sido freqüentemente utilizados como auxiliares de emulsificação em emulsões O/A, pois formam camadas multimoleculares ao redor das gotículas dispersas, bem como aumentam a viscosidade da fase contínua, retardando a separação gravitacional da fase dispersa, promovendo, assim, a estabilidade (Klinkesorn et al., 2004; Aulton, 2005). A estabilidade pode ser também favorecida pelo complexo formado entre o agente de viscosidade hidrofílico e tensoativo hidrofílico e pela interação do tensoativo hidrofílico com a fase oleosa. Segundo Gullapalli & Sheth (1997), a metilcelulose melhora a estabilidade de emulsões de óleos polares de forma mais efetiva que óleos apolares, em consequência da complexação da metilcelulose com o tensoativo hidrofílico não iônico e da interação entre o óleo polar com a cadeia apolar do tensoativo hidrofílico não iônico.

Assim, visando otimizar a estabilidade dos sistemas, incorporou-se à emulsão com estabilidade máxima (monoleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) e Álcool oleílico etoxilado 3OE), os colóides hidrofílicos constituídos de polímeros do ácido carboxivinílico (Carbopol 940) e de derivados da celulose (hidroxietilcelulose), como auxiliares de emulsificação. A adição de base inorgânica (solução de NaOH 20% p/v) à dispersão aquosa dos polímeros, até a obtenção de pH 5,5, otimizou o potencial de viscosidade do polímero do ácido carboxivinílico.

De acordo com a literatura, em uma emulsão estável as gotículas dispersas mantém suas características iniciais,

e permanecem uniformemente distribuídas por toda a fase contínua. Entretanto, podem ocorrer vários tipos de desvios deste comportamento, levando à cremeação, à floculação ou à separação.

Logo, um estudo aprofundado da estabilidade das emulsões foi conduzido, objetivando antever possíveis alterações das amostras ao armazená-las em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer; permitindo, assim, obter informações sobre a estabilidade do produto em menor tempo possível (Brasil, 2004).

A literatura apresenta diferentes métodos objetivando à caracterização da estabilidade das emulsões, dentro os quais podemos citar: exame macroscópico, pH, tamanho de partícula, centrifugação, viscosidade, potencial zeta e armazenamento sob condições adversas; que podem mostrar uma indicação rápida do grau de instabilidade.

A emulsão com estabilidade máxima nos estudos de EHL, acrescida dos auxiliares de emulsificação, foi submetida aos estudos preliminares de estabilidade, por um período de 15 dias (Brasil, 2004). Para caracterização da estabilidade, as amostras foram examinadas macroscopicamente e submetidas às análises de pH, viscosidade e centrifugação. Os resultados (Tabela 2) não demonstram alterações nos parâmetros avaliados.

Diante da estabilidade demonstrada nos estudos preliminares de estabilidade, a emulsão foi submetida aos estudos de estabilidade acelerada, por um período de 90 dias (Brasil, 2004). Para caracterização da estabilidade, as amostras foram examinadas quanto ao aspecto, cor e odor; e submetidas às análises de pH, centrifugação, viscosidade, potencial zeta e distribuição de tamanho de partícula.

Os ensaios organolépticos permitiram avaliar, de imediato, o estado em que se encontravam as amostras em estudo por meio de análises comparativas, com objetivo de verificar alterações (Brasil, 2004), no que se refere à cor, odor e aparência; constatando semelhanças das emulsões submetidas aos ensaios de estabilidade em relação às emulsões recentemente elaboradas, independente das condições e períodos de armazenamento.

Os ensaios de centrifugação das emulsões armazenadas em condições e períodos diversos, objetivando verificar possíveis instabilidade, como: separação de fase, coalescência, entre outras, pelo aumento da mobilidade das partículas em consequência do aumento da força da gravidade (Brasil, 2004); demonstraram estáveis, não apresentando cremeação, tão pouco separação de fase.

O pH de uma formulação deve garantir a estabilidade dos ingredientes da formulação, sua eficácia e segurança (Brasil, 2004), bem como ser compatível com os fluidos biológicos de acordo com a via de administração pretendida. A maior estabilidade dos sistemas dá-se quando estes são mantidos dentro de uma pequena variação de pH. Desta forma, a diminuição progressiva da estabilidade dá-se quando o pH se afasta de seu limite ótimo (Gennaro, 1999).

O pH das emulsões em estudo foi ajustado, com hidróxido de sódio 20% p/v, para o pH $5,49 \pm 0,03$, visando adequar o produto à via de administração, bem como otimizar a viscosidade do polímero derivado do ácido carboxivinílico; e acompanhado durante os estudos de estabilidade. Os resultados (Tabela 3) demonstram que as emulsões armazenadas em períodos (15, 60 e 90 dias) e em condições diversas de temperatura (ambiente,

50° e -5°C), não apresentam variação significativa de pH, quando comparadas com o pH das emulsões recentemente obtidas ($p > 0,05$). Entretanto, observa-se uma ligeira diminuição do pH dos sistemas armazenados em estufas e em refrigeradores, sendo indicativos de instabilidade. Segundo Masmoudi et al. (2005), a diminuição do pH pode representar uma oxidação da fase oleosa com formação de hidroperóxidos ou mesmo a hidrólise de triglicerídeos levando à formação de ácidos graxos (Masmoudi et al., 2005; Driscoll et al., 2001).

Segundo Aulton (2005), a instabilidade de uma emulsão resulta de qualquer processo que cause um progressivo aumento do tamanho das partículas, e um alargamento na distribuição de tamanhos, de forma que, por fim as partículas dispersas podem tornar-se tão grandes a ponto de separar-se como líquido livre. Logo, um método preciso para a determinação da estabilidade é avaliar o tamanho dos glóbulos com tempo.

A análise do perfil de distribuição do tamanho de partículas das emulsões recentemente obtidas demonstra uma distribuição monomodal, sugerindo uma distribuição uniforme de partículas (Figura 1). Comportamento semelhante apresentam as amostras armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz por 60 e 90 dias. Entretanto, as amostras armazenadas por 60 e 90 dias em estufa à 50° ou em refrigerador à -5°C apresentam distribuição bimodal, caracterizando instabilidade destas emulsões sob estas condições de armazenamento.

A avaliação da viscosidade ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada e pode indicar se a estabilidade é adequada, ou seja, fornece indicação do comportamento do produto ao longo do tempo (Brasil, 2004).

A reologia da emulsão é uma manifestação direta da interação das forças que ocorrem no sistema. As instabilidades provenientes da variação no tamanho e no número de partículas e na orientação ou migração do emulsionante durante um período de tempo podem ser detectadas por meio de alterações na viscosidade aparente do produto (Logaraj et al., 2008; Mostefa et al., 2006; Aulton, 2005; Tadros, 1999; 2004).

A avaliação do comportamento reológico em função da temperatura é fundamental para obter informações da estabilidade física e consistência do produto. Segundo Aulton, (2005), a solubilidade de emulsionantes não-iônicos muda com o aumento da temperatura e temperaturas acima de 70°C destrói a maioria das emulsões. Por outro lado, o gelo formado a baixas temperaturas provoca a quebra das emulsões por romper o filme interfacial.

As Figuras (Figura 2) representadas demonstram que as amostras em estudo apresentam fluxo pseudoplástico, com a viscosidade diminuindo com o aumento da tensão de cisalhamento aplicada.

Este tipo de comportamento é desejado em formulações farmacêuticas. É necessário ter uma viscosidade aparente elevada a baixas tensões de cisalhamento para impedir a mobilidade da fase dispersa, sendo importante que apresentem fluxo livre quando agitados, apresentando baixa viscosidade frente a altas tensões de cisalhamento, sendo essas alterações reversíveis após certo tempo de repouso, retardando a coalescência ou a cremeação (Aulton, 2005).

Os estudos reológicos das emulsões, que foram submetidas às condições e períodos diversos de armazenamento, demonstram que o comportamento reológico pseudoplástico não se modifica. Entretanto, observa-se que a viscosidade se altera dependendo destas condições de armazenamento (Tabela 4). As amostras armazenadas por 15, 60 ou 90 dias à temperatura ambiente ao abrigo da luz, ou sob refrigeração à -5°C, não apresentam alterações significativas em relação às recentemente obtidas. Entretanto, as emulsões em estudo apresentam variações representativas da viscosidade quando armazenadas à temperatura de 50°C. A viscosidade das amostras aumenta quando armazenadas sob estas condições. Observou-se um aumento da viscosidade (referente à viscosidade de ida), em relação às emulsões recentemente obtidas, de aproximadamente 2,0 ($p < 0,01$), 2,2 ($p < 0,001$) e 2,2 ($p < 0,001$) vezes, para a tensão de cisalhamento de 0,05 s^{-1} , das amostras armazenadas à 50°C por 15, 60 e 90 dias, respectivamente. Aumento semelhante da viscosidade foi observado por Leonardi et al. (2000) e Guaratini et al. (2006), os quais atribuíram tal observação à evaporação da água das formulações.

Os agentes emulsionantes atuam como uma barreira alterando a razão de coalescência da fase dispersa, ou criam um filme interfacial que produz forças eletrostáticas repulsivas entre as fases dispersas. Com o uso de agentes emulsionantes iônico, uma monocamada adsorve em volta da fase dispersa. A carga da superfície influencia a distribuição de íons no meio aquoso. Íons de carga oposta à superfície são atraídos em direção à superfície (denominados contra-íons), e íons de carga de mesmo sinal são repelidos para longe da superfície (denominados co-íons), resultando na formação de uma dupla camada elétrica em volta da fase dispersa. A dupla camada consiste da superfície carregada e de um excesso de neutralizante de contra-íons sobre co-íons, distribuídos de uma maneira difusa no meio aquoso. Se a concentração do contra-íon é baixa, a espessura da dupla camada é larga, a força repulsiva é alta, fazendo com que as fases dispersas se repelem entre si. Logo, o potencial produzido pela dupla camada ocasiona um efeito repulsivo entre as gotículas da fase dispersa, evitando a coalescência (Aulton, 2005; Lieberman et al., 1988; 1989).

A diferença de potencial entre a camada de íons próxima à superfície da partícula e a região eletroneutra da solução é denominada potencial zeta e pode ser mensurada por microeletroforese. Quando o potencial zeta é alto, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas de London, fazendo com as gotículas fiquem dispersas no sistema. Por outro lado, quando o potencial zeta é baixo, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, favorecendo a aproximação das partículas, podendo resultar em instabilidade da preparação (Aulton, 2005; Lieberman et al., 1988; 1989).

O uso de tensoativo não iônico resulta também na formação da dupla camada elétrica ao redor da gotícula dispersa. Segundo a literatura, tal observação se deve ao pH e à força iônica da fase aquosa (Ahmad et al., 1996; Ho & Ahmad, 1999; Hsu & Nacu, 2003). A carga elétrica mensurada em emulsões estabilizadas com tensoativos não iônicos tem sido atribuída à adsorção dos íons H_3O^+ (em pH baixo) ou OH^- (em pH alto) da água (Ho & Ahmad, 1999).

A fim de caracterizar o grau de repulsão das gotículas dispersas, as emulsões de óleo de oliva/água estabilizadas com a associação de tensoativos não iônicos (Tween 80/álcool oleílico etoxilado 3OE) foram analisadas quanto ao potencial zeta. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que as emulsões armazenadas em condições diversas apresentam diferenças absolutas do potencial zeta maiores que 10 mV. De acordo com Roland et al. (2003), quando a diferença absoluta do potencial zeta for ao menos de 10 mV, pode-se prever que amostras apresentam estabilidades distintas.

Os resultados demonstram, ainda, que houve uma redução da magnitude do potencial zeta nas emulsões armazenadas em estufa à 50°C ou sob refrigeração à -5°C por 90 dias, em relação às recentemente obtidas.

Segundo a literatura, os sistemas são considerados estáveis quando possuem um valor absoluto maior que 25 mV (Lieberman et al., 1989). Assim, quando o potencial zeta é relativamente alto, maior que 25 mV (valor absoluto), as forças repulsivas predominam em relação às atrativas de London, logo o sistema está disperso. Quando o potencial zeta é relativamente baixo, menor que 25 mV (valor absoluto), as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, as partículas se aproximam, floculando (Lieberman et al., 1989), podendo levar à separação de fases.

Logo, as emulsões armazenadas em estufa à 50°C ou sob refrigeração à -5°C por 90 dias apresentam valores de potencial zeta fora dos limites considerados estáveis.

Segundo a literatura, o pH, bem como a força iônica podem interferir no potencial zeta (Ahmad et al., 1996; Ho & Ahmad, 1999; Hsu & Nacu, 2003). Como previamente mencionado, os pHs dos sistemas foram ajustados para 5,490 ($\pm 0,031$), antes dos estudos de estabilidade, empregando 0,5 mL da solução de hidróxido de sódio a 20% p/v. Entretanto os resultados demonstram que os pHs dos sistemas submetidos ao aquecimento em estufa à 50°C ou a refrigeração à -5°C sofreram uma ligeira redução, possivelmente decorrente da degradação de algum componente da formulação, justificando, assim, a redução do potencial zeta. Alia-se à redução do potencial zeta, a diminuição da viscosidade aparente e o aumento da motilidade cinética nos sistemas armazenados sob aquecimento; e à cristalização de compostos da formulação nos sistemas armazenados sob aquecimento e refrigeração. O aumento da temperatura leva à diminuição da viscosidade aparente e ao aumento da motilidade cinética, tanto da fase dispersa, quanto do próprio agente emulsionante na interface óleo/água, fazendo com que a barreira energética seja facilmente vencida, aumentando, assim, o número de colisões entre as gotículas (Aulton, 2005). A cristalização de componentes da formulação, em consequência da refrigeração, ou da volatilização do solvente do sistema, exerce pressões anômalas sobre a fase dispersa e sobre a camada emulsionante, ou ainda leva à concentração de eletrólitos dissolvidos, afetando a densidade de cargas das gotículas (Aulton, 2005; Cortes-Munõz & Chevalier-Lucia; Dumay, 2009). Estes efeitos podem levar à desestruturação do meio, conduzindo à instabilidade das preparações, que pode ser observada pela distribuição bimodal de tamanho da partícula.

Por outro lado, os sistemas armazenados à temperatura ambiente em períodos diversos e protegidos da luz, não demonstram variação de pH e apresentam um potencial zeta favorável (menor que -25 mV), embora variável, possivelmente oriundo da acomodação dos sistemas até o estabelecimento do equilíbrio, característica, esta, que pode ser evidenciada pela distribuição de tamanho de partícula.

Diante resultados de estabilidade apresentados, pode-se concluir que as emulsões óleo de oliva/água mantêm-se estáveis quando armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz, empregando a associação de monooleato de polioxietilenossorbitano e álcool oleílico etoxilado 3OE (EHL 12), como agentes emulsivos, que possuem similaridade estrutural com a fase oleosa, e carbopol 940 e hidroxietilcelulose, como agentes de viscosidade e auxiliares da emulsificação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Uberaba - UNIUBE e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley e ao Farmacêutico José Orestes Del Ciampo pelo consentimento e a realização, respectivamente, das análises de potencial zeta e tamanho de partícula.

ABSTRACT

Development of olive oil-in-water emulsions: assessment of physical stability

Olive oil-in-water emulsions, developed with non-ionic emulsifiers, were assessed with regard to physical stability. Emulsions were prepared with two different emulsifiers, one of which was hydrophilic and the other lipophilic, in various proportions. To improve emulsion stability, auxiliary emulsifiers were added to the stablest emulsions and stability studies were carried out, in which the samples were stored for different periods and under various conditions. To test emulsion stability, the samples were examined macroscopically and various physicochemical properties, such as pH, centrifugation, viscosity, zeta potential and particle size distribution, were assessed. The results showed that olive oil-in-water emulsions are organoleptically and physicochemically stable, when stored at room temperature and protected from the light. Out of the emulsions developed, the most stable was based on an emulsifier blend that resulted in a hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of 12. A blend of emulsifiers with unsaturated fatty acids of similar chain length to that of olive oil produced the stablest emulsions, showing that structural similarity between the hydrocarbon moieties of the oil phase and the surfactant is essential to successful emulsion stabilization.

Keywords: O/W emulsion. Stability. Olive oil. HLB. Non-ionic emulsifier.

REFERÊNCIAS

- Ahmad K, Ho CC, Fong WK, Toji D. Properties of palm oil-in-water emulsions stabilized by nonionic emulsifiers. *Colloid Interface Sci.* 1996; 181:595–604.
- Aulton, ME. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. 677p.
- Borghetti GS, Knorst MT. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtro solares. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2006; 42(4):531-7.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA; 2004. 52p. (Séries Temáticas. Qualidade, v.1). [citado 2008 dez 6] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm.
- Cortes-Munõz M, Chevalier-Lucia D, Dumay E. Characteristics of submicron emulsion prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage. *Food hydrocoll.* 2009; 23:640-54.
- Driscoll, DF, Giampietro K, Wichelhaus DP, Peterss H, Nehne J, Niemann W, Bistrrian BR. Physicalchemical stability assessments of lipids emulsions of varying oil composition. *Clin Nutr.* 2001; 20(2):151-7.
- Fox C. Rationale for the selection of emulsifying agents. *Cosmet Toiletries* 1986; 101:25-44.
- Garti N, Remon GF. Relationship between nature of vegetable oil, emulsifier and the stability of w/o emulsion. *J Food Technol.* 1984; 19:711-7.
- Gennaro AR. *Remington: a ciência e a prática da farmácia* 20.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999. 2208p.
- Guaratini T, Gianeti MD, Maia Campos PMBG. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: chemical and physical aspects. *Int J Pharm.* 2006; 327(1/2):12-6.
- Gullapalli RP, Sheth BB. Effect of methylcellulose on the stability of oil-in-water emulsion: influence of the disperse phase. *Int J Pharm.* 1997; 151:249-53.
- Gullapalli RP, Sheth BB. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999; 48(3):233-8.
- Ho CC, Ahmad K. Electrokinetic behavior of palm oil emulsions in dilute electrolyte solutions. *J Colloid Interface Sci.* 1999; 216:25–33.
- Hsu JP, Nacu A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *J Colloid Interface Sci.* 2003; 259:374–81.
- Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, McClements DJ. Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. *Food Res Int.* 2004; 37(9):851-9.
- Krishna G, Wood GC, Sheth BB. Improving emulsification efficacy of lecithin by formulation design. I. Effect of adding a secondary surfactant. *PDA J Pharm Sci Technol.* 1998; 52:331–336.
- Leonardi GR, Beraldi P, Freitas PCD, Campos PMM. Produto de uso tópico com Aloe vera. *Cosmet Toiletries* 2000; 12(5):44-53.
- Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*. New York: Marcel Dekker; 1988. v.1.
- Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*, New York: Marcel Dekker; 1989. v.2.
- Logaraj TV, Bhattacharya S, Udaya Sankar K, Venkateswaran G. Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage. *Food Chem.* 2008; 106:937–43.
- Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim Nova* 2004; 7(1): 131-8.
- Petrowski GE. Emulsion stability and its relation to foods. In: Chichester CO, Mrak EM, Stewart GF, editors. *Advances in Food Research*. New York: Academic Press; 1976. v.22 p. 310-60.
- Prista LN, Alves AC, Morgado R. *Tecnologia farmacêutica*. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian; 1995. v.1.
- Masmoudi H, Le Dréau Y, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm.* 2005; 289(1/2):117-31.
- Mostefa, NM, Sadok, AH, Sabri N, Hadji A. Determination of optimal cream formulation from longterm stability investigation using a surface response modeling. *Int J Cosmet Sci.* 2006; 28(3):211-8.
- Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *Int J Pharm.* 2003; 263(1-2):85-94.
- Schulman JH, Cockbain EG. Molecular interactions at oil/water interfaces. Part I. Molecular complex formation and the stability of oil in water emulsions. *Trans Faraday Soc.* 1940;36:651-61.
- Silva EC, Soares IC. *Tecnologia de emulsões*. *Cosmet Toiletries* 1996; 8(5):37-46.
- Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004; 108/109:227-58.
- Tadros TF. *Fundamental principles of emulsion rheology and their applications*. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp.* 1999; 91:39-55.
- Welin-Berger K, Bergenståhl B. Inhibition of Ostwald ripening in local anesthetic emulsions by using hydrophobic excipients in the disperse phase. *Int J Pharm.* 2000; 200:249-60.

