

## AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE PESCADO COM QUITOSANA

KELI ARRUDA DA SILVA<sup>1</sup>; VANESSA MENDONÇA ESQUERDO<sup>2</sup>; LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande – [keliarruda@hotmail.com](mailto:keliarruda@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande – [nessafurg@gmail.com](mailto:nessafurg@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande – [dqmpinto@furg.br](mailto:dqmpinto@furg.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Uma emulsão pode ser definida como um material que contém pequenas gotículas de óleo dispersas em um meio aquoso (emulsão óleo em água), ou pequenas gotas de água dispersas em um meio lipídico (emulsão água em óleo), no qual as fases são imiscíveis. As nanoemulsões consistem em dispersões nanométricas de gotículas oleosas em uma fase aquosa, estabilizadas por um sistema tensoativo. As nanoemulsões vêm ganhando destaque por sua capacidade de veicular substâncias lipofílicas em um sistema disperso aquoso (McCLEMENTS, 2012).

O óleo de pescado apresenta uma composição única, diferente de óleos derivados de outros animais, devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados (AGI) associados a benefícios a saúde humana (WALKER et al., 2015). No entanto, a produção de alimentos enriquecidos com esses óleos é tarefa difícil, devido à sua baixa solubilidade em água, instabilidade química e baixa biodisponibilidade (KOMAIKO et al., 2016). Uma forma de tornar esses compostos mais estáveis e disponíveis é incorporá-los a nanoemulsões.

Muitas substâncias podem ser usadas para revestir ou encapsular ácidos graxos insaturados. No entanto, apenas um número limitado de materiais possui certificados para aplicações em alimentos (GRAS) (FATHI et al., 2014). Dependendo das propriedades do material de parede utilizado, é possível a elaboração de nanocápsulas com diferentes características (KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016). A quitosana e a gelatina podem ser utilizadas para preparar nanocápsulas com diferentes formas e tamanhos, contribuindo para a vida útil do produto, textura e estabilidade através de suas propriedades de superfície (OWENS et al., 2018).

As nanoemulsões não são termodinamicamente estáveis e sua formação depende da temperatura, da pressão, da composição das fases e dos procedimentos experimentais utilizados para sua preparação (McCLEMENTS; WEISS, 2005). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar estabilidade física de nanoemulsões de óleo de pescado com quitosana preparados em presença de tensoativos puros (tween 80) e suas misturas (tween 80+gelatina). Foram variadas as concentrações de quitosana na fase dispersa, para verificar a sua influência nas características das nanoemulsões formadas.

### 2. METODOLOGIA

#### Material

O óleo bruto foi extraído das vísceras de carpa comum (*Cyprinus carpio*) pelo método termomecânico. O óleo bruto passou pelas etapas do processo de

refino químico (degomagem, neutralização, lavagem, secagem e branqueamento) (CREXI et al., 2010) para a obtenção do óleo de pescado branqueado.

A quitosana foi produzida a partir de resíduos de camarão (*Penaeus brasiliensis*) (Rio Grande, RS, Brasil), os quais foram submetidos a reações de desmineralização, desproteínização e desodorização para a extração da quitina (WESKA et al., 2007). A quitina foi convertida em quitosana através de reação de desacetilação, seguida de purificação e secagem (DOTTO et al. 2011), obtendo-se ao fim do processo a quitosana em pó (grau de desacetilação de  $85 \pm 2\%$  e massa molar de  $155 \pm 2$  kDa).

A gelatina de pele suína (tipo A), grau alimentício/farmacêutico, o surfactante Tween 80 (Polyoxyethylen-20-sorbitan-monooleate, molecular weight of 1310 g mol<sup>-1</sup>) e todos os outros reagentes utilizados para os experimentos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck, Brasil). Todas as diluições foram realizadas utilizando água ultrapura.

### Elaboração e caracterização das nanoemulsões

O método de emulsão óleo-água foi usado para obter as emulsões. Inicialmente foram preparadas duas fases. Na fase aquosa, foram preparadas soluções de concentração 1, 2 e 3% (m/v) de quitosana. Na fase oleosa, os concentrados de AGI (1% m/v) e o tensoativo Tween 80 (2 gotas) foram vertidos na fase aquosa. Foi testada a adição de gelatina como co-surfactante (0,3 % m/v). As soluções foram homogeneizadas em agitador mecânico (Dremel, 1100-01, São Paulo, Brasil) a 10.000 rpm por 20 min.

A estabilidade das emulsões foi determinada pelo índice de separação segundo ROLAND et al., (2003), em provetas durante 15 dias. A distribuição de tamanho e índice de polidispersão foram determinadas utilizando o método de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, UK) logo após o preparo (dia 0) e após 15 dias. A análise do potencial Zeta foi utilizada para refletir o potencial de superfície das partículas. O pH foi determinado com o auxílio de um pHmetro.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

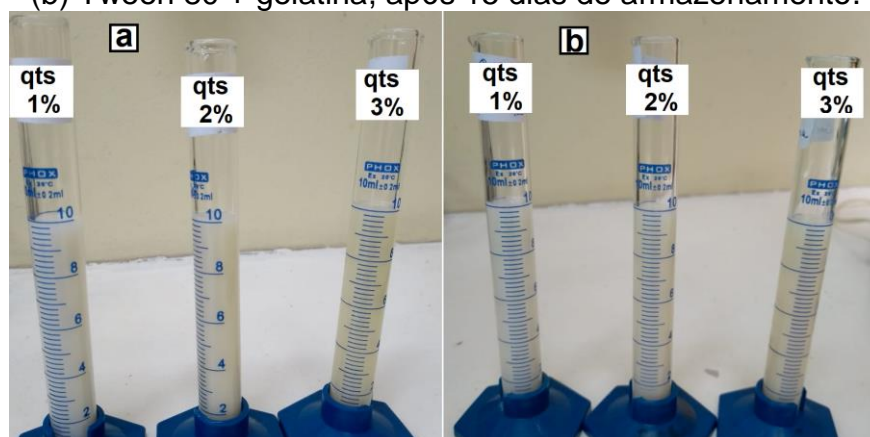
Todas as nanoemulsões formadas se mantiveram visualmente estáveis após 15 dias (Figura 1), sem separação de fases. Após o armazenamento, quando existe separação de fases, as emulsões ficam visualmente separadas em uma camada opaca na superfície, uma camada com alta turbidez ao meio e/ou uma camada ligeiramente turva na parte inferior. Devido ao seu pequeno tamanho de gotículas, as nanoemulsões aumentaram a estabilidade à separação ou agregação gravitacional.

A Tabela 1 apresenta a distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão (IPD) após a elaboração (dia zero) e após 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente (25 °C), além do potencial Zeta e pH. A estabilidade física, comportamento reológico e outras propriedades das emulsões foram determinados pelo tamanho das gotas da fase dispersa. Como pode ser observado na Tabela 1, para todas as amostras, a menor concentração de quitosana proporcionou menores tamanhos de partículas. Isso demonstra que o tamanho de gotículas produzidas depende da composição (concentração) das fases. O uso de biopolímeros naturais (polissacarídeos e proteínas) como co-tensoativos pode ajudar a estabilizar as nanoemulsões por adsorção à superfície das gotículas, protegendo o óleo da agregação e atuando como material de

parede. Em alguns casos, a concentração de polímero pode aumentar o tamanho das partículas. No presente trabalho, as médias dos tamanhos de partícula variaram entre 294 e 845 nm, sendo que, durante o período de 15 dias não foram verificadas diferenças entre as amostras. Um fator que auxilia na estabilidade das nanoemulsões é a associação entre o pequeno tamanho das partículas e seu movimento browniano característico, o que leva a uma diminuição da atuação da força da gravidade reduzindo processos de instabilidade.

Os valores de IPD indicam a homogeneidade de sistemas coloidais e variam de 0 a 100%, sendo que no presente trabalho esses valores apresentaram médias entre 19,0 e 24,5%, sem diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ). Sistemas com valores baixos de IPD ( $\leq 30\%$ ) são menos susceptíveis ao fenômeno de Ostwald, considerado o maior mecanismo de instabilidade de sistemas na escala nano.

**Figura 1** – Nanoemulsões formadas utilizando como surfactante (a) Tween 80 e (b) Tween 80 + gelatina, após 15 dias de armazenamento.



**Tabela 1** - Tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD), potencial Zeta e pH das nanoemulsões com diferentes concentrações de quitosana e tensoativos.

Conc. quitosana (m/v)	Tenso ativo	Tamanho (nm)* (dia 0)	PDI* (%) (dia 0)	Tamanho (nm) (15 dias)	PDI* (%) (15 dias)	Potencial Zeta (mV)*	Turbidez
1%	T	294,3 ± 4,9 <sup>e</sup>	21,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	296,3 ± 12,6 <sup>e</sup>	20,2 ± 4,5 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
2%	T	410,7 ± 2,4 <sup>d</sup>	20,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	400,3 ± 12,8 <sup>d</sup>	19,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
3%	T	535,3 ± 7,8 <sup>b</sup>	22,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	545,1 ± 9,4 <sup>b</sup>	21,5 ± 3,1 <sup>a</sup>	10,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
1%	T+G	483,3 ± 9,5 <sup>c</sup>	24,5 ± 1,5 <sup>a</sup>	490,9 ± 3,7 <sup>c</sup>	19,0 ± 4,2 <sup>a</sup>	11,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,4 <sup>a</sup>
2%	T+G	489,7 ± 6,7 <sup>c</sup>	21,6 ± 3,5 <sup>a</sup>	487,9 ± 11,4 <sup>c</sup>	23,4 ± 5,7 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
3%	T+G	833,3 ± 8,1 <sup>a</sup>	23,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	845,7 ± 14,6 <sup>a</sup>	18,7 ± 3,4 <sup>a</sup>	10,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,3 <sup>a</sup>

\* média ± desvio padrão (n=3). T: Tween 80, G: gelatina.

O potencial Zeta reflete a composição interfacial das nanoemulsões em relação ao surfactante ou a presença de moléculas com carga. O potencial Zeta das nanoemulsões apresentou valores positivos, que podem ser atribuídos à quitosana que apresenta uma carga positiva na molécula quando em um meio ácido (pH ~ 4,3). Não houve diferenças significativas nos valores de pH das

nanoemulsões. O valor do pH é um importante parâmetro de monitoramento da estabilidade de emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto.

#### 4. CONCLUSÕES

As nanoemulsões de óleo de peixe formuladas com quitosana apresentaram excelente estabilidade física durante o armazenamento por 15 dias. Além disso, o aumento da concentração de quitosana e a adição de gelatina levaram ao aumento do tamanho das partículas em emulsão. Assim, pode-se afirmar que estes resultados são de grande importância para definição da aplicação destas nanopartículas, uma vez que sistemas instáveis podem interferir na qualidade final dos produtos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CREXI V. T.; MONTE, M. L.; SOUZA-SOARES, L. A.; PINTO, L.A.A. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. **Food Chemistry**, v. 119, p. 945–950, 2010.
- DOTTO, G. L.; SOUZA, V. C.; PINTO, L. A. A. Drying of chitosan in a spouted bed: The influences of temperature and equipment geometry in powder quality. **LWT -Food Science and Technology**, v. 44, p. 1786-1792, 2011.
- FATHI, M.; MART, A.; McCLEMENTS D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, p. 18–39, 2014.
- KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Enhancing omega–3 fatty acids nanoemulsion stability and in–vitro digestibility through emulsifiers. **Journal of Food Engineering**, v. 187, p. 92–105, 2016.
- KOMAIKO, J.; SASTROSUBROTO, A.; McCLEMENTS D. J. Encapsulation of  $\alpha$ -3 fatty acids in nanoemulsion–based delivery systems fabricated from natural emulsifiers: Sunflower phospholipids. **Food Chemistry**, v. 203, p. 331–339, 2016.
- McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719–1729, 2012.
- McCLEMENTS D. J.; WEISS, J. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, Sixth Edition, Six Volume. John Wiley & Sons, Inc., 2005
- OWENS, C., GRIFFIN, K., KHOURYIEH, H., WILLIAMS K. Creaming and oxidative stability of fish oil–in–water emulsions stabilized by whey protein–xanthan–locust bean complexes: Impact of pH. **Food Chemistry**, v. 239, p. 314–322, 2018.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD. B. Systematic characterization of oil-in water emulsions for formulations design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 85-94, 2003.
- WALKER, R.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Development of food–grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega–3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. **Food & Function**, v. 6, p. 42–55, 2015.
- WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; BATISTA, L. M.; RIZZI, J.; PINTO L. A. A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 749–753, 2007.