



INFLUÊNCIA DA ORDEM DE ADIÇÃO DAS FASES SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE NANOEMULSÕES DUPLAS

Brunna M. B. Borges¹; Guilherme P. Biazoto²; Diego Boldo²; Diego G. Meaurio²; Adriana P. Duarte², Marco A. U. Martinez^{1,2}

1 - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

2 - Instituto de Química (INQUI), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

brunna.borges@ufms.br

Palavras-Chave: Emulsão Dupla; Estabilidade Coloidal; Sistema Nanoestruturado

Introdução

As nanoemulsões são sistemas coloidais constituídos por duas fases líquidas imiscíveis, nas quais uma fase se encontra dispersa em outra fase contínua, sendo estabilizadas por tensoativos, cujas gotículas apresentam dimensões na escala nanométrica, sendo frequentemente descritas na faixa de 20 a 200 nanômetros (nm), embora possam apresentar valores superiores conforme a composição e a organização estrutural do sistema. Devido às suas propriedades, como elevada área superficial, capacidade de encapsulação e estabilidade cinética, esses sistemas têm despertado crescente interesse nas áreas farmacêutica, cosmética, alimentícia e biotecnológica. Tais características favorecem a proteção e dispersão de compostos de interesse, contribuindo para o desenvolvimento de formulações mais estáveis e eficientes (Nasr *et al.*, 2022; Alshahrani, 2019; Ponphaiboon; Limmatvapirat; Limmatvapirat, 2024).

Dentre os diferentes sistemas nanoemulsionados, destacam-se as nanoemulsões duplas, caracterizadas pela presença de uma fase aquosa interna incorporada em uma fase oleosa, posteriormente dispersa em uma fase aquosa externa. Essa organização estrutural possibilita a incorporação de compostos hidrofílicos, ampliando suas aplicações em sistemas de liberação e proteção de substâncias bioativas. Entretanto, devido à maior complexidade estrutural em comparação às emulsões convencionais, a obtenção desses sistemas apresenta desafios relacionados à manutenção da organização das fases internas. A formação das emulsões duplas envolve etapas sucessivas de emulsificação, nas quais diferentes parâmetros do processo podem influenciar diretamente a formação e organização das gotículas. Fatores como composição da formulação, energia aplicada, proporção entre as fases e sequência de incorporação dos componentes podem modificar características estruturais do sistema, refletindo em parâmetros como tamanho médio de gotícula, distribuição de tamanho e carga superficial (Tewes *et al.*, 2007).



Embora diferentes estratégias de preparo sejam descritas na literatura para obtenção desses sistemas, ainda são limitados os estudos que avaliam isoladamente o efeito da sequência de incorporação das fases, mantendo constante a composição da formulação. Dessa forma, a compreensão da influência desse parâmetro pode contribuir para o aprimoramento dos protocolos de obtenção, favorecendo maior reprodutibilidade e controle das características do sistema.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo comparar duas estratégias de preparo de uma mesma nanoemulsão dupla, variando exclusivamente a ordem de adição das fases durante a etapa secundária de emulsificação, por meio da avaliação do tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e comportamento das formulações durante o armazenamento.

Material e Métodos

As nanoemulsões duplas (W1/O/W2) foram obtidas por metodologia de dupla emulsificação adaptada de Tewes *et al.* (2007), utilizando homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax®. Inicialmente, foram preparadas as fases aquosa interna (W1), orgânica (O) e aquosa externa (W2). A fase W1 foi constituída por solução aquosa de PEG-6000 (0,3% m/v); a fase orgânica (O) por Kollicoat® MAE100P solubilizado em mistura acetona:etanol, contendo ácido oleico e Span 80; e a fase W2 por solução aquosa de PVA (0,6% m/v) contendo Tween 80. A emulsão primária (W1/O) foi obtida pela adição da fase orgânica à fase aquosa interna sob agitação a 10.000 RPM.

Posteriormente, a emulsão primária (W1/O) foi submetida a duas estratégias de emulsificação secundária, diferenciadas pela ordem de adição da fase aquosa externa (W2). Na primeira estratégia, a fase aquosa externa (W2) foi adicionada gradualmente à emulsão primária (W1/O), enquanto na segunda estratégia, a emulsão primária (W1/O) foi adicionada gradualmente à fase aquosa externa (W2). Em ambos os procedimentos, a emulsificação foi realizada a 10.000 RPM por 10 minutos, resultando na formação de W1/O/W2. Após o preparo, as formulações permaneceram sob agitação magnética (500 RPM) overnight para remoção dos solventes orgânicos residuais e foram armazenadas a 4 °C.

A caracterização físico-química foi realizada por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) em equipamento *Zetasizer Nanoseries (Malvern Panalytical)*, determinando-se o tamanho médio de partícula, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta. A estabilidade físico-química foi acompanhada durante 20 dias, utilizando amostras aclimatadas a 25 °C e diluídas na proporção de 25 µL de nanoemulsão para 25 mL de água destilada. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

Resultados e Discussão



A Tabela 1 apresenta a caracterização físico-química da nanoemulsão dupla obtida pela estratégia de adição da fase aquosa externa (W2) à emulsão primária (W1/O) durante o período de armazenamento, sob a condição analítica de diluição.

Tabela 1 - Caracterização físico-química da nanoemulsão dupla obtida pela estratégia de adição da fase aquosa externa (W2) à emulsão primária (W1/O) durante 20 dias de armazenamento.

Tempo (dias)	Tamanho Médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1	163,1 ± 2,60	0,215 ± 0,010	-
2	185,3 ± 0,12	0,345 ± 0,009	-
3	173,9 ± 2,58	0,307 ± 0,025	-
4	159,2 ± 2,08	0,223 ± 0,011	-
5	194,0 ± 2,09	0,345 ± 0,028	-29,6 ± 1,14
10	201,3 ± 1,75	0,370 ± 0,058	-32,3 ± 1,53
15	197,7 ± 1,92	0,358 ± 0,040	-30,9 ± 1,34
20	183,1 ± 3,59	0,338 ± 0,016	-29,7 ± 1,79

Legenda: Os valores representam a média ± desvio padrão. O símbolo - indica a ausência de dados.

Fonte: Autoria Própria - Borges, B.M.B. (2026)

A formulação obtida por inversão de fases apresentou tamanho médio inicial de 163,1 ± 2,60 nm e PDI de 0,215 ± 0,010, indicando distribuição relativamente homogênea das gotículas. No segundo dia observou-se aumento do tamanho médio (185,3 ± 0,12 nm) e do PDI (0,345 ± 0,009), sugerindo um rearranjo inicial da organização estrutural do sistema após a emulsificação. Entre o terceiro e o quarto dia ocorreu redução desses parâmetros, atingindo 159,2 ± 2,08 nm e PDI de 0,223 ± 0,011, seguida por discreto aumento entre os dias 5 e 10. Nos dias 15 e 20, tanto o tamanho médio quanto o índice de polidispersão permaneceram relativamente constantes, evidenciando manutenção da distribuição das gotículas durante o período de monitoramento.

O potencial zeta foi determinado a partir do quinto dia, mantendo-se entre -29,6 ± 1,14 mV e -32,3 ± 1,53 mV, com pequenas variações até o vigésimo dia. Valores absolutos próximos ou superiores a 30 mV são frequentemente associados à adequada estabilidade eletrostática de sistemas coloidais, uma vez que favorecem a repulsão entre as partículas e reduzem sua tendência à agregação. Além disso, a manutenção do PDI abaixo de 0,40 durante todo o período indica a manutenção de uma distribuição de tamanho moderadamente



polidispersa, porém aceitável para sistemas coloidais ao longo do período. Esses resultados corroboram os achados de Tewes *et al.* (2007), que demonstraram a influência da metodologia de dupla emulsificação sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões, e estão de acordo com Nasr *et al.* (2022), que relacionam elevados valores absolutos de potencial zeta à maior estabilidade cinética desses sistemas.

A Tabela 2 apresenta a caracterização físico-química da nanoemulsão dupla obtida pela estratégia de adição da emulsão primária (W1/O) à fase aquosa externa (W2) durante o período de armazenamento, sob a condição analítica de diluição.

Tabela 2 - Caracterização físico-química da nanoemulsão dupla obtida pela estratégia de adição da emulsão primária (W1/O) à fase aquosa externa (W2) durante 20 dias de armazenamento.

Tempo (dias)	Tamanho Médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1	238,8 ± 1,23	0,341 ± 0,023	-22,5 ± 0,57
2	183,2 ± 2,37	0,296 ± 0,042	-
3	176,2 ± 0,92	0,241 ± 0,004	-34,6 ± 0,47
4	172,6 ± 1,36	0,244 ± 0,017	-30,4 ± 0,67
5	184,8 ± 1,14	0,334 ± 0,010	-18,0 ± 0,57
10	189,8 ± 1,25	0,356 ± 0,013	-18,5 ± 0,62
15	186,2 ± 1,19	0,302 ± 0,115	-11,4 ± 0,59
20	182,7 ± 1,22	0,248 ± 0,012	-4,27 ± 0,60

Legenda: Os valores representam a média ± desvio padrão. O símbolo - indica a ausência de dados.

Fonte: Autoria Própria - Borges, B.M.B. (2026)

A formulação obtida sem inversão de fases apresentou tamanho médio inicial de 238,8 ± 1,23 nm, reduzindo para 183,2 ± 2,37 nm no segundo dia e permanecendo entre aproximadamente 172 e 190 nm durante o restante do monitoramento. O índice de polidispersão variou entre 0,241 e 0,356, mantendo-se abaixo de 0,40 em todo o período avaliado, indicando distribuição relativamente homogênea das gotículas. Em relação ao potencial zeta, observou-se que a formulação apresentou um valor inicial de -22,5 ± 0,57 mV, registrando -18,0 ± 0,57 mV no quinto dia, seguido por uma redução progressiva do módulo da carga superficial ao longo do armazenamento, atingindo -4,27 ± 0,60 mV no vigésimo dia.



A diminuição gradual do potencial zeta sugere redução da repulsão eletrostática entre as gotículas, o que pode favorecer processos de agregação e comprometer a estabilidade coloidal ao longo do tempo. Apesar desse comportamento, o tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão permaneceram compatíveis com sistemas nanoemulsionados descritos na literatura, indicando que a formulação conservou características físico-químicas adequadas durante o período avaliado, conforme relatado por Alshahrani (2019) e Ponphaiboon, Limmatvapirat e Limmatvapirat (2024).

A comparação entre as metodologias demonstra que a ordem de incorporação das fases influenciou diretamente as propriedades físico-químicas das nanoemulsões duplas. Embora ambas tenham produzido sistemas com tamanho médio de partícula compatível com a escala nanométrica durante os 20 dias de armazenamento, a metodologia com inversão de fases apresentou menor tamanho médio inicial, menores valores de índice de polidispersão e maior manutenção do potencial zeta em valores absolutos próximos de 30 mV. Em contraste, a metodologia sem inversão de fases apresentou redução progressiva do módulo do potencial zeta ao longo do armazenamento, indicando menor estabilidade eletrostática do sistema. Esses resultados reforçam que a estratégia baseada na inversão de fases favorece a organização estrutural das gotículas e contribui para maior estabilidade coloidal das nanoemulsões duplas, corroborando os mecanismos descritos por Tewes *et al.* (2007).

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que ambas as metodologias foram capazes de produzir nanoemulsões duplas com tamanho médio de partícula compatível com a escala nanométrica durante os 20 dias de armazenamento, mantendo índices de polidispersão característicos de sistemas com distribuição relativamente homogênea das gotículas. Entretanto, a comparação entre as metodologias evidenciou que a ordem de adição das fases exerceu influência direta sobre as propriedades físico-químicas das formulações. A metodologia com inversão de fases apresentou menor tamanho médio inicial de partícula, menores valores de índice de polidispersão e manutenção de maiores valores absolutos de potencial zeta ao longo do período avaliado, indicando maior homogeneidade e estabilidade eletrostática do sistema. Em contrapartida, embora a metodologia sem inversão de fases tenha produzido nanoemulsões com diâmetro médio dentro da faixa nanométrica, observou-se redução progressiva do módulo do potencial zeta durante o armazenamento, sugerindo menor estabilidade coloidal.

Dessa forma, os resultados indicam que a metodologia com inversão de fases representa uma estratégia com desempenho superior para a obtenção de nanoemulsões duplas com maior estabilidade físico-química, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de sistemas de liberação de compostos bioativos em estudos futuros.



Agradecimentos

Os autores agradecem à UFMS. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001, com bolsa de Mestrado concedida a B.M.B.B.

Referências

- ALSHAHRI, S. M. Preparation, Characterization and *in vivo* Anti-inflammatory Studies of Ostrich Oil Based Nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**, v. 68, n. 3, p. 203–208, 2019.
- NASR, A. M. *et al.* Quaternized Chitosan Thiol Hydrogel-Thickened Nanoemulsion: A Multifunctional Platform for Upgrading the Topical Applications of Virgin Olive Oil. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 1319–1319, 22 jun. 2022.
- PONPHAIBOON, J.; LIMMATVAPIRAT, S.; LIMMATVAPIRAT, C. Development and Evaluation of a Dry Emulsion of Ostrich Oil as a Dietary Supplement. **Foods**, v. 13, n. 16, p. 2570, 17 ago. 2024.
- TEWES, F. *et al.* Comparative study of doxorubicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 66, n. 3, p. 488-492, 2007.