

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA**  
**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Cássia Antunes Glasser**

**Otimização da metodologia de preparação de emulsões do tipo  
A/O/A integrando nanogotas lipídicas com núcleo aquoso,  
para estabilização proteica**

**Sorocaba/SP**  
2016

**Cássia Antunes Glasser**

**Otimização da metodologia de preparação de emulsões do tipo A/O/A integrando nanogotas lipídicas com núcleo aquoso, para estabilização proteica**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão  
**Co-orientador:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marta Maria Duarte Carvalho Vila

**Sorocaba/SP  
2016**

**Cássia Antunes Glasser**

**Otimização da metodologia de preparação de emulsões do tipo A/O/A integrando nanogotas lipídicas com núcleo aquoso, para estabilização proteica**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão  
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Haroldo Lhou Hasegawa  
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud  
Universidade de Sorocaba

## DEDICATÓRIA

*Ao meu filho Vinícius, que é a razão de todo o meu esforço e dedicação, e aos meus pais, Carlos e Maria, que são a minha base e sem os quais nada seria possível!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por aqueles momentos em que só Ele me escutou com todo o amor e paciência!

Ao meu querido orientador, Professor Victor Manuel C. F. Balcão, pela paciência e compreensão que teve comigo durante esse tempo em que passamos juntos, obrigada por toda a dedicação.

À minha Co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Maria Duarte Carvalho Vila, obrigada pela colaboração e apoio contínuo.

Agradeço também aos outros Professores da Uniso, em especial ao Professor Marco Chaud, pelo incentivo e colaboração.

Agradeço aos meus queridos colegas e colaboradores na UNISO, principalmente à Alessandra Rios, Franciely Cristina Lopes, Thaís Francine Alves, Márcia Rebelo, Elis Granato e Karin Jodar, pelo apoio e colaboração nessa jornada.

Ao Doutor Rodrigo Villares Portugal e ao Doutor Marcelo Alexandre de Farias, por toda a disponibilidade e ajuda na realização das análises por microscopia eletrônica de transmissão no LNNano - Laboratório Nacional de Nanotecnologia do CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (Campinas).

Agradeço ainda a todos os meus amigos, que me apoiaram, em especial à minha querida amiga Cristiane Rodrigues, que me ajudou diretamente na realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida no âmbito do programa PROSUP.

À Universidade de Sorocaba, pela disponibilização de todas as infraestruturas necessárias à boa execução do trabalho de pesquisa realizado.

À Fabiana Favoretto, IQ-UNICAMP, pelo apoio na realização das análises FTIR, DRX, TGA e DSC.

Ao Prof. Júlio César Pereira, UFSCAR-Sorocaba, pela ajuda na realização de todas as análises estatísticas.

*A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu ainda,  
mas pensar o que ninguém pensou sobre algo que todos veem.”*

Arthur Schopenhauer (1788-1860)

## RESUMO

**Introdução:** A estabilização de entidades bioativas assume particular relevância em função das diversas aplicações em distintas áreas como a farmacêutica, a alimentar, a de cosméticos, a (bio)médica e a biotecnológica. Especificamente, a estabilização de entidades proteicas com vista à preservação tanto da estrutura como da funcionalidade durante o armazenamento, sendo essa estabilização conseguida principalmente através do estabelecimento de um equilíbrio termodinâmico entre as (bio)entidades e o seu (micro)ambiente. Um sistema nanoestruturado do tipo emulsão A/O/A preparado com vista a estabilização de entidades proteica é por natureza um sistema termodinamicamente instável. A otimização, por via de um planeamento fatorial estatístico, das várias variáveis processuais que permita a produção de tal sistema com características estáveis ao longo de um período alargado de armazenamento é, por isso, de suma importância. Existe um delicado equilíbrio entre a estabilidade e a flexibilidade necessárias à função das biomoléculas, a que se soma o aumento do conhecimento da importância da superfície das moléculas proteicas para a sua estabilidade, uma vez que é através desta interface que a entidade proteica interage com o "mundo externo". É geralmente aceite que a importância funcional dos resíduos de aminoácidos está relacionada com a sua acessibilidade a solventes na superfície da proteína, enquanto que a importância estrutural desses resíduos de aminoácidos está relacionada com a sua localização como parte do núcleo (hidrofóbico) da proteína. **Objetivos:** O objetivo principal deste trabalho de pesquisa aplicada consistiu no desenvolvimento de um sistema nanoestruturado do tipo emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A) e na sua otimização estatística para encapsulação de uma entidade proteica, uma vez que, devido à sua estrutura interna compartimentalizada, as nanoemulsões do tipo A/O/A apresentam claras vantagens para a estabilização estrutural e funcional dessas biomoléculas. **Métodos:** Foi desenhado um planeamento fatorial experimental completo do tipo  $2^3 \times 3^1$  (3 fatores em 2 níveis, inferior e superior, e 1 fator em três níveis), para avaliar a influência de quatro fatores nas propriedades físico-químicas de emulsões do tipo A/O/A. Os fatores (variáveis independentes) sob escrutínio foram (i) concentração de proteína modelo (colágeno) em dois níveis, baixo (-1) e alto (+1); concentração de surfactante lipofílico (lecitina de soja) em dois níveis, baixo (-1) e alto (+1); concentração de surfactante hidrofílico (poloxâmero 188) em dois níveis, baixo (-1) e alto (+1); e velocidade de homogeneização em três níveis, baixo (7500 rpm), médio (10000 rpm) e alto (12500 rpm). As variáveis dependentes avaliadas foram o tamanho hidrodinâmico (HS) médio de partícula, o índice de polidispersão (PI) e o Potencial Zeta (ZP). A combinação dos quatro fatores resultou num total de 24 "tratamentos" (24 misturas). Adicionalmente, os pontos centrais dos três primeiros fatores foram também inseridos, os quais, combinados com os três níveis de velocidade de homogeneização, resultaram em três tratamentos adicionais que foram replicados três vezes cada. O planeamento fatorial desenhado originou assim a produção de um total de 33 emulsões do tipo A/O/A, por combinação dos quatro fatores, as quais foram caracterizadas físico-quimicamente através da

determinação, ao longo do tempo de armazenamento, do tamanho hidrodinâmico de partícula (HS), distribuição de tamanhos de partícula (PI) e carga superficial das partículas através da determinação do Potencial Zeta (ZP). As variáveis HS, PI e ZP foram medidas em triplicata, para cada mistura, e os valores médios foram considerados para as análises estatísticas dos resultados. Para a formulação ótima, foram ainda realizadas análises por FTIR, DRX, crio-MET, TGA e DSC. Foi ainda determinada a eficiência de encapsulação da emulsão otimizada estatisticamente, bem como analisada estatisticamente a sua estabilidade ao longo de um período de armazenamento de um ano. **Resultados e Discussão:** As concentrações de proteína e dos emulsificantes lipofílico e hidrofílico, e a velocidade de homogeneização, foram estabelecidas como as quatro variáveis independentes, enquanto que HS, ZP e PI foram estabelecidas como variáveis dependentes. O desenho fatorial  $2^3 \times 3^1$  construído levou à otimização dos níveis alto (+1) e baixo (-1), com testes em triplicata para o nível central (0), produzindo assim trinta e três formulações e levando à seleção dos parâmetros processuais otimizados como sendo 0,015% (m/m) de entidade proteica (nível alto, +1), 0,75% (m/m) de emulsificante lipofílico (lecitina de soja) (nível alto, +1) e 0,50% (m/m) de emulsificante hidrofílico (poloxâmero 188) (nível baixo, -1). Assim, o planejamento fatorial estatístico levou à produção de uma emulsão ótima possuindo partículas essencialmente homogêneas com tamanho hidrodinâmico médio ( $n=3$ ) de  $(186,2 \pm 2,6)$  nm e potencial Zeta médio igual a  $(-36,5 \pm 0,9)$  mV, e exibindo um índice de polidispersividade igual a  $0,206 \pm 0,014$ . Estes valores foram obtidos para um parâmetro processual de velocidade de homogeneização de 12500 rpm. Estas variáveis foram críticas para a produção de dispersões estáveis de nanogotas lipídicos com núcleo aquoso, permitindo a estabilização da emulsão por 180 dias em armazenamento a 4 °C. As variáveis de resposta HS, PI e ZP não exibiram qualquer correlação entre elas, como pode ser concluído a partir dos coeficientes de correlação e *p*-valores obtidos para PI vs. ZP ( $r = 0,205$ ,  $p$ -valor = 0,338;  $p$ -valor > 0,05, pelo que não existe correlação significativa entre PI e ZP), PI vs. HS ( $r = 0,277$ ,  $p$ -valor = 0,191;  $p$ -valor > 0,05, pelo que não existe correlação significativa entre PI e HS) e HS vs. ZP ( $r = -0,360$ ,  $p$ -valor = 0,084;  $p$ -valor > 0,05, pelo que não existe correlação significativa entre HS e ZP). Desta forma, estas variáveis puderam ser analisadas individualmente, isto é, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada uma delas. Caso contrário, se tivessem sido encontradas quaisquer correlações entre estas variáveis de resposta, teria de ser realizada uma análise de variância multivariada (MANOVA). **Conclusões:** A partir das análises estatísticas realizadas, pode ser concluído que a formulação ótima para a encapsulação de entidades proteicas foi a emulsão ME25 (ou ME03/12500rpm).

**Palavras-chave:** Emulsões do tipo A/O/A. Entidades proteicas. Estabilização estrutural e funcional. Planejamento fatorial. Otimização. Análise de variância (ANOVA).

## ABSTRACT

**Introduction:** The stabilization of bioactive entities is particularly relevant in the light of various applications in different areas such as pharmaceutical, food, cosmetics, (bio)medical and biotechnological. Specifically, the stabilization of protein entities for the preservation of both structure and functionality during storage, with such stabilization being achieved primarily through the establishment of a thermodynamic equilibrium between the (bio)entities and their (micro)environment. A nanostructured system of the type W/O/W emulsion prepared with a view to stabilizing protein entities is by nature a thermodynamically unstable system. Optimization, by means of a statistical experimental design, of the multiple process variables which enables production of such a system with stable characteristics over an extended storage period is therefore of paramount importance. There is a delicate balance between stability and flexibility necessary for the function of the biomolecule, added to the increased knowledge of the importance of the surface of the protein molecules to their stability, since it is through this interface that the protein moiety interacts with the "outside world". It is generally accepted that the functional importance of amino acid residues is related to their accessibility to solvent on the surface of the protein, whereas the structural importance of these amino acid residues is related to their location as part of the (hydrophobic) core of the protein. **Objectives:** The main objective of this applied research work consisted in the development of a nanostructured system of the type water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion and its statistical optimization for encapsulation of a protein entity, since, due to their compartmentalized internal structure, nanoemulsions of the type W/O/W possess clear advantages for the structural and functional stabilization of these biomolecules. **Methods:** A full experimental factorial design of the type  $2^3 \times 3^1$  (3 factors into two levels, low and high, and one factor in three levels) to evaluate the influence of four factors on the physicochemical properties of W/O/W emulsions. The factors (independent variables) under scrutiny were (i) concentration of model protein (collagen) on two levels, low (-1) and high (+1); concentration of lipophilic surfactant (soya lecithin) on two levels, low (-1) and high (+1); concentration of hydrophilic surfactant (poloxamer 188) on two levels, low (-1) and high (+1); and homogenization stirring speed on three levels, low (7500 rpm), medium (10,000 rpm) and high (12,500 rpm). The dependent variables evaluated were the average particle hydrodynamic size (HS), the polydispersity index (PI) and Zeta Potential (ZP). Combination of the four factors resulted in a total of 24 "treatments" (24 mixtures). Additionally, the center points of the first three factors were also inserted, which, combined with the three levels of homogenization stirring speed, resulted in three additional treatments that were replicated three times each. The designed factorial planning thus originated the production of a total of 33 emulsions of the type W/O/W, via combination of the four aforementioned factors, which were characterized physico-chemically by determining, throughout storage time, the average particle hydrodynamic size (HS), the particle size distribution (PI), and surface charge of the particles by measuring the Zeta Potential (ZP). The variables HS, PI and ZP were measured in triplicate for each

mixture, and the average values were considered for performing the statistical analysis of the results. For the optimal formulation, additional analyzes were also carried out via FTIR, XRD, cryo-TEM, TGA and DSC. The encapsulation efficiency of the statistically optimized emulsion was also determined, and its stability over a storage period of one year was also fully statistically analyzed.

**Results and Discussion:** The concentrations of protein and both hydrophilic and lipophilic emulsifiers, and the homogenization stirring speed, were set as the four independent variables, whereas HS, ZP and PI were established as dependent variables. The  $2^3 \times 3^1$  factorial design built led to the optimization of high (+1) and low (-1) levels, with tests in triplicate for the central level (0), thus producing thirty-three formulations and leading to the selection of optimized process parameters as 0.015% (w/w) protein moiety (high level, +1), 0.75% (w/w) lipophilic emulsifier (soya lecithin) (high level, +1) and 0.50% (w/w) hydrophilic emulsifier (poloxamer 188) (low level, -1). Thus, the statistical experimental design led to the production of an optimal emulsion possessing essentially homogeneous particles with an average (n=3) hydrodynamic size of  $(186.2 \pm 2.6)$  nm and an average Zeta potential equal to  $(-36.5 \pm 0.9)$  mV, and exhibiting a polydispersity index of  $0.206 \pm 0.014$ . These values were obtained for a homogenization stirring speed processing parameter of 12,500 rpm. These variables were critical for producing stable dispersions with aqueous-core lipid nanodrops, allowing the stabilization of the emulsion for 180 days of storage at 4 °C. The response variables HS, ZP and PI exhibited no correlation whatsoever between them, as can be concluded from the correlation coefficients and *p*-values obtained for PI vs. ZP ( $r = 0.205$ ,  $p = 0.338$ ;  $p$ -value > 0.05, so there is no significant correlation between PI and ZP), PI vs. HS ( $r = 0.277$ ,  $p = 0.191$ ;  $p$ -value > 0.05, so there is no significant correlation between PI and HS) and HS vs. ZP ( $r = -0.360$ ,  $p$ -value = 0.084;  $p$ -value > 0.05, so there is no significant correlation between HS and ZP). Thus, these variables could be analyzed individually, i.e., an analysis of variance (ANOVA) was performed for each one of them. Otherwise, if any correlations whatsoever had been found between these response variables, a multivariate analysis of variance (MANOVA) would be in order. **Conclusions:** From the statistical analyzes performed, it can be concluded that the optimal formulation for encapsulation of protein entities was ME25 emulsion (or ME03/12500rpm).

**Keywords:** W/O/W emulsions. Protein entities. Structural and functional stabilization. Factorial design. Optimization. Analysis of variance (ANOVA).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática de uma emulsão do tipo A/O/A, mostrando as fases aquosas interna e externa, assim como a provável localização dos surfactantes.	27
Figura 2.	Representação esquemática de uma gotícula oleosa numa emulsão do tipo A/O/A, mostrando o núcleo aquoso onde entidades bioativas podem ser aprisionadas.	28
Figura 3.	Representação esquemática do método de emulsificação em dois passos para a produção de emulsões do tipo A/O/A.	30
Figura 4.	Representação esquemática das metodologias de emulsificação comumente utilizadas para a produção de emulsões do tipo A/O/A: <b>(a)</b> agitação/homogeneização de alta velocidade, <b>(b)</b> homogeneização por alta pressão, e <b>(c)</b> emulsificação por membrana.	31
Figura 5.	Representação esquemática dos processos de instabilidade que ocorrem numa emulsão O/A.	37
Figura 6.	Configuração experimental utilizada no preparo das emulsões do tipo A/O/A, consistindo num homogeneizador UltraTurrax acoplado a uma placa de aquecimento com banho-maria a 39 °C.	49
Figura 7.	Preparação da emulsão primária água-em-óleo (A/O), mostrando a fusão dos componentes da fase oleosa e termostatização da fase aquosa interna <b>(a)</b> , e produção da emulsão primária A/O <b>(b)</b> .	50
Figura 8.	Preparação da emulsão do tipo (A/O)/A, mostrando a emulsão no final do segundo ciclo de homogeneização a alta velocidade <b>(a)</b> , e a adição dos restantes 50% da fase aquosa externa à temperatura ambiente <b>(b)</b> .	51
Figura 9.	Dispositivo utilizado para a determinação da viscosidade das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas, com utilização da equação de escoamento de Hagen-Poiseuille.	53
Figura 10.	Diagrama de sequências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.	59
Figura 11.	Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A recém-produzidas.	65
Figura 12.	Gráficos de dispersão (médias de determinações em triplicata) mostrando a ausência de correlação entre PI vs. ZP <b>(a)</b> , HS vs. PI <b>(b)</b> e HS vs. ZP <b>(c)</b> .	66
Figura 13.	Gráficos de interação (médias de determinações em triplicata) para a variável PI, mostrando as contribuições das interações entre Proteína, Lecitina, P188 e RPM para os valores de PI.	70

- Figura 14. Gráficos tridimensionais de resposta de superfície para PI vs. RPM e P188 **(a)**, PI vs. RPM e Lecitina **(b)**, PI vs. P188 e Lecitina **(c)**, PI vs. RPM e Proteína **(d)**, PI vs. P188 e Proteína **(e)**, e PI vs. Lecitina e Proteína **(f)**. 71
- Figura 15. Evolução do tamanho hidrodinâmico médio de partícula (HS) **(a)**, índice de polidispersão (PI) **(b)** e potencial Zeta **(c)** dos nanobalões lipídicos contendo entidades proteicas encapsuladas, integrantes da emulsão do tipo A/O/A otimizada (ME03/12500 RPM), ao longo do período de armazenamento (médias de três replicatas e desvios-padrão associados). 77
- Figura 16. Espectros de infravermelho de amostras de proteína **(a)**, emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente sem proteína encapsulada **(b)**, e emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente contendo proteína encapsulada **(c)**. Os espectros FTIR de infravermelho foram recolhidos na região de números de onda de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , num espectrofotômetro FTIR da Agilent (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.). 80
- Figura 17. Difractogramas de raios-X (DRX) de amostras de proteína **(a)**, amostras das emulsões do tipo A/O/A estatisticamente otimizadas contendo proteína encapsulada **(b)**, e amostras das emulsões do tipo A/O/A estatisticamente otimizadas sem proteína encapsulada **(c)**. 80
- Figura 18. Imagem (congelada) de alta resolução da emulsão do tipo A/O/A estatisticamente otimizada contendo proteína encapsulada, capturada por uma câmera sCMOS de alta resolução, após irradiação da amostra com um feixe laser de luz-UV a 405 nm, usando um dispositivo NanoSight NS300 da Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, Reino Unido). 81
- Figura 19. Curvas termogravimétricas **(a)** e primeira derivada das curvas de perda de peso **(b)** de amostras da emulsão do tipo A/O/A estatisticamente otimizada contendo entidade proteica encapsulada (linhas azuis) e da emulsão do tipo A/O/A estatisticamente otimizada sem entidade proteica encapsulada (linhas laranja). As análises foram realizadas num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.), usando cadinhos de alumina para conter as amostras de emulsão do tipo A/O/A sob atmosfera inerte (árgon). 84
- Figura 20. Termogramas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) de amostras da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente contendo entidades proteicas aprisionadas (linhas azuis) e da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente sem proteína aprisionada (linhas laranja). As análises foram realizadas num microcalorímetro diferencial exploratório da TA Instruments (modelo MDSC 85

2910, New Castle, E.U.A.), usando cadinhos de alumínio de alta-pressão devidamente selados por pressão.

- Figura 21. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão após coloração negativa com acetato de uranila, mostrando duas magnificações diferentes. 87
- Figura 22. Condições de armazenamento das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, mantidas armazenadas a uma temperatura de 4 °C durante aproximadamente 12 meses. 89
- Figura 23. Evolução, ao longo do tempo de armazenamento, do tamanho hidrodinâmico médio de partícula (HS, nm) das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para uma velocidade de homogeneização de **(a)** 10000 rpm, **(b)** 7500 rpm, e **(c)** 12500 rpm. 90
- Figura 24. Evolução, ao longo do tempo de armazenamento, do potencial Zeta (ZP, mV) das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para uma velocidade de homogeneização de **(a)** 10000 rpm, **(b)** 7500 rpm, e **(c)** 12500 rpm. 91
- Figura 25. Evolução, ao longo do tempo de armazenamento, do índice de polidispersão (PI) das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para uma velocidade de homogeneização de **(a)** 10000 rpm, **(b)** 7500 rpm, e **(c)** 12500 rpm. 92
- Figura 26. Gráficos de interações (médias de dados) para HS, mostrando as contribuições das interações entre Proteína, Lecitina, P188 e RPM para os valores de HS. 96
- Figura 27. Gráficos de interações (médias de dados) para PI, mostrando as contribuições das interações entre Proteína, Lecitina, P188 e RPM para os valores de PI. 100
- Figura 28. Gráficos dos principais efeitos (médias ajustadas) para a variável HS. 102
- Figura 29. Gráficos dos principais efeitos (médias ajustadas) para a variável PI. 105

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Planejamento fatorial experimental completo $2^3 \times 3^1$ , fornecendo os valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada variável.	46
Quadro 2.	Composição química (% m/m) das 11 formulações de emulsões do tipo A/O/A produzidas a partir do planejamento fatorial desenhado.	48
Quadro 3.	Valores de resposta (HS, PI e ZP, média (n=3) $\pm \sigma$ ) dos três fatores explicitados na Quadro 1, para as onze formulações produzidas (emulsões do tipo A/O/A, ME <sub>i</sub> ) de acordo com o planejamento fatorial (três variáveis (proteína, PROT; lecitina, LEC; poloxâmero 188, P188) em dois níveis, inferior e superior, com triplicata para o nível central, e uma variável em três níveis).	63
Quadro 4.	Valores de viscosidade média (n=3) e pH e desvios-padrão associados, obtidos para as diferentes emulsões produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado.	64
Quadro 5.	Análise estatística de variância para a variável HS, usando soma dos quadrados ajustada.	67
Quadro 6.	Análise estatística de variância para a variável PI, usando soma dos quadrados ajustada.	69
Quadro 7.	Análise estatística de variância para a variável ZP, usando soma dos quadrados ajustada.	73
Quadro 8.	Valores de resposta (HS, PI e ZP, médias (n=3) $\pm \sigma$ ) dos três fatores (Proteína, Lecitina, Poloxâmero P188) para as onze formulações produzidas a uma velocidade de agitação de 12500 rpm, e valores ponderados de HLB associados a cada formulação.	75
Quadro 9.	Análise estatística de variância para a variável HS no 180° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.	95
Quadro 10.	Predições dos modelos ajustados para HS, incluindo e excluindo a Proteína, considerando apenas os efeitos significativos e também o efeito principal quando o fator está envolvido numa interação significativa.	97
Quadro 11.	Análise estatística de variância para a variável ZP no 180° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.	98

Quadro 12.	Análise estatística de variância para a variável PI no 180° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.	99
Quadro 13.	Análise estatística de variância para a variável HS no 90° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.	101
Quadro 14.	Análise estatística de variância para a variável ZP no 90° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.	103
Quadro 15.	Análise estatística de variância para a variável PI no 90° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.	104
Quadro 16.	Diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero.	106
Quadro 17.	Diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero.	107
Quadro 18.	Diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero.	108
Quadro 19.	Diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias.	109
Quadro 20.	Diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias.	110
Quadro 21.	Diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias.	111
Quadro 22.	Diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias.	112
Quadro 23.	Diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias.	113
Quadro 24.	Diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais	114

tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias.

Quadro 25.	Médias (n=3) de HS, PI e ZP, e desvios-padrão associados, para a emulsão ME25 (t19), utilizadas no teste de Tukey ao nível de significância de 5%, para os tempos de armazenamento de 0, 90 e 180 dias.	115
Quadro 26.	Quadro matricial das diferenças de médias de HS entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.	115
Quadro 27.	Quadro matricial das diferenças de médias de PI entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.	116
Quadro 28.	Quadro matricial das diferenças de médias de ZP entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O/A	Água-em-óleo-em-água
(A/O)/A	(Água-em-óleo)-em-água
O/A/O	Óleo-em-água-em-óleo
A/O	Água em óleo
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina Sérica Bovina
D	Coefficiente de difusão ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )
DF	Número de graus de liberdade
DLS	Espalhamento dinâmico de luz-laser ( <i>Dynamic Laser light Scattering</i> )
DMS	Diferença Mínima Significativa
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
$\eta$	Viscosidade dinâmica ( $\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$ )
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
FTIR	Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier
$\phi$	Diâmetro interno do tubo de escoamento (m)
g	Aceleração da gravidade ( $\text{m}/\text{s}^2$ )
h	Altura de fluido (m)
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HS	Tamanho hidrodinâmico de partícula
$k_B$	Constante de Boltzmann
L	Altura do tubo de escoamento (m)
LEC	Lecitina
MANOVA	Análise de variância multivariada
ME	Emulsão múltipla do tipo A/O/A
CRIO-MET	Crio-microscopia eletrônica de transmissão
NS-MET	Microscopia eletrônica de transmissão com coloração negativa
MS	Quadrado médio
NS	Coloração negativa
NTA	Análise por rastreamento de nanopartículas
O/A	Óleo em água
P188	Poloxâmero P188
PI	Índice de polidispersão
PROT	Proteína
$\rho$	Densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

r	Raio hidrodinâmico (m)
RPM	Velocidade de agitação (rotações por minuto)
$\sigma$	Desvio padrão
SS	Soma dos quadrados
T	Temperatura absoluta (K)
t	Tempo de escoamento (s)
TGA	Termogravimetria
$\mu$	Viscosidade (kg/s•m)
V	Volume escoado (m <sup>3</sup> )
DRX	Difração de raios-X
ZP	Potencial Zeta
W/O/W	Water-in-Oil-in-Water

# SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b>	24
<b>1.1. INTRODUÇÃO</b>	24
<b>1.2. Estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas</b>	25
<b>1.3. Emulsões do tipo A/O/A</b>	27
1.3.1. Características de uma emulsão do tipo A/O/A	27
1.3.2. Principais processos de produção de emulsões do tipo A/O/A	29
1.3.3. Composição das fases da emulsão do tipo A/O/A	33
1.3.3.1. Fases aquosas interna (discreta, núcleos internos) e externa (contínua)	34
1.3.3.2. Fase oleosa	34
1.3.3.3. Fração de emulsão A/O dispersa	34
1.3.3.4. Emulsificantes	35
1.3.4. Desestabilização espontânea de emulsões do tipo A/O/A	36
1.3.4.1. Fenômenos de desestabilização de emulsões simples	37
1.3.5. Aumento da estabilidade de emulsões do tipo A/O/A	39
1.3.6. Características físico-químicas das emulsões do tipo A/O/A	40
1.3.6.1. Distribuição de tamanhos hidrodinâmicos de gotículas oleosas	40
1.3.6.2. Eficiência de encapsulamento	41
1.3.7. Cinética da liberação de entidades solúveis em água aprisionadas no núcleo aquoso (interno) de uma emulsão do tipo A/O/A	42
1.3.8. Potenciais aplicações práticas das emulsões do tipo A/O/A	42
<b>2. OBJETIVOS</b>	44
<b>2.1. Objetivo geral</b>	44
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	44
<b>3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	45
<b>3.1. Material</b>	45
3.1.1. Reagentes	45
3.1.2. Equipamento analítico	45
<b>3.2. Procedimentos experimentais</b>	46
3.2.1. Planejamento fatorial experimental para otimização das condições processuais conducentes a uma emulsão ótima do tipo A/O/A	46
3.2.2. Preparação de emulsões do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) com entidades proteicas encapsuladas	48
3.2.2.1. Preparação da emulsão primária A/O	49
3.2.2.2. Preparação da emulsão do tipo (A/O)/A	50

3.2.3. Caracterização físico-química das várias emulsões do tipo água-em-óleo-em- água (A/O/A) contendo entidades proteicas encapsuladas, produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado	51
3.2.3.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)	52
3.2.3.2. Avaliação das características reológicas	52
3.2.3.3. Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A produzidas	53
3.2.4. Análise estatística para determinação da emulsão do tipo A/O/A ótima	53
3.2.5. Caracterização físico-química da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente, com e sem proteína encapsulada	54
3.2.5.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)	54
3.2.5.2. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	55
3.2.5.3. Análises por difração de raios-X (DRX)	55
3.2.5.4. Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA)	55
3.2.5.5. Análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)	56
3.2.5.6. Determinação da eficiência de encapsulação da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente	56
3.2.5.7. Análises micro-estruturais e morfológicas por crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET)	57
3.2.6. Análise estatística dos parâmetros HS, ZP e PI ao longo de um período de armazenamento prolongado a 4 °C, para inferência da estabilidade das várias emulsões do tipo A/O/A	58
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	59
<b>4.1. Otimização estatística das condições processuais conducentes a uma emulsão ótima do tipo A/O/A</b>	60
<b>4.2. Caracterização físico-química das várias emulsões do tipo água-em-óleo- em-água (A/O/A) contendo entidades proteicas encapsuladas, produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado</b>	61
4.2.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)	61
4.2.2. Avaliação da viscosidade e do pH das várias emulsões do tipo A/O/A	63
4.2.3. Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A	64
<b>4.3. Análise estatística</b>	65
4.3.1. Análise estatística da variável HS (tamanho hidrodinâmico de partícula)	67
4.3.2. Análise estatística da variável PI (índice de polidispersão)	68
4.3.3. Análise estatística da variável ZP (potencial Zeta)	72
<b>4.4. Caracterização físico-química da emulsão do tipo A/O/A otimizada</b>	73

<b>estatisticamente, com e sem entidade proteica encapsulada</b>	
4.4.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)	74
4.4.2. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	78
4.4.3. Análises por difração de raios-X (DRX)	80
4.4.4. Análises por rastreamento de nanopartículas (NTA)	81
4.4.5. Análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)	82
4.4.6. Aspecto macroscópico da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente com entidade proteica aprisionada	86
4.4.7. Análises micro-estruturais e morfológicas por crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET)	87
4.4.8. Determinação da eficiência de encapsulação da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente	88
<b>4.5. Caracterização, por DLS, das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, ao longo de um período alargado de armazenamento a 4 °C</b>	88
<b>4.6. Análise estatística da estabilidade das várias emulsões do tipo A/O/A ao longo de um período de armazenamento de seis meses a 4 °C</b>	93
4.6.1. Análise gráfica de HS, PI e ZP ao longo do tempo	93
4.6.2. Análise de variância da variável HS no 180° dia de armazenamento	94
4.6.3. Análise de variância da variável ZP no 180° dia de armazenamento	98
4.6.4. Análise de variância da variável PI no 180° dia de armazenamento	99
4.6.5. Análise de variância da variável HS no 90° dia de armazenamento	100
4.6.6. Análise de variância da variável ZP no 90° dia de armazenamento	102
4.6.7. Análise de variância da variável PI no 90° dia de armazenamento	103
4.6.8. Comparação das médias da ME25 com as demais no instante zero pelo Teste de Tukey	105
4.6.8.1. Comparação das médias de HS	106
4.6.8.2. Comparação das médias de PI	107
4.6.8.3. Comparação das médias de ZP	108
4.6.9. Comparação das médias da ME25 com as demais no instante 90 dias pelo Teste de Tukey	109
4.6.9.1. Comparação das médias de HS	109
4.6.9.2. Comparação das médias de PI	110
4.6.9.3. Comparação das médias de ZP	110
4.6.10. Comparação das médias da ME25 com as demais no instante 180 dias pelo Teste de Tukey	111
4.6.10.1. Comparação das médias de HS	111

4.6.10.2. Comparação das médias de PI	112
4.6.10.3. Comparação das médias de ZP	113
4.6.11. Comparação das médias do tratamento t19 (emulsão ME25) entre os tempos 0, 90 e 180 dias, pelo Teste de Tukey	114
4.6.11.1. Comparação das médias de HS	115
4.6.11.2. Comparação das médias de PI	116
4.6.11.3. Comparação das médias de ZP	116
<b>5. CONCLUSÕES</b>	118
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	119
<b>REFERÊNCIAS</b>	120
<b>ANEXOS</b>	136

## APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa intitulado “**Otimização da metodologia de preparação de emulsões do tipo A/O/A integrando nanogotas lipídicas com núcleo aquoso, para estabilização proteica**” é parte integrante de um projeto de pesquisa mais abrangente, intitulado “*PneumoPhageKill - Desenvolvimento de sistema terapêutico contendo bacteriófagos nanoencapsulados líticos para Pseudomonas aeruginosa, para tratamento de pneumonia bacteriana por aerossolização*” financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), com a ref<sup>o</sup> FAPESP 2013/03181-6, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Maria Duarte Carvalho Vila, da Universidade de Sorocaba.

O trabalho de pesquisa aqui apresentado visou a otimização estatística de uma emulsão do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) para estabilização de entidades proteicas, usando o colágeno como proteína modelo, constituindo assim a primeira fase do referido projeto de pesquisa. Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho de pesquisa foram apresentados em 5 Congressos Científicos Internacionais, sendo o XIV SLAP / XII CIP – XIV Latin American Symposium on Polymers / XII Ibero American Congress on Polymers (Porto de Galinhas PE, 12 a 16 de Outubro de 2014) (**ANEXO A**), o I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental, realizado no Parque Tecnológico de Sorocaba (Sorocaba SP, 26 a 28 de Novembro de 2014) (**ANEXO B**), o 5th ANM - International Conference on Advanced Nanomaterials (Aveiro, Portugal, julho de 2014) (**ANEXO C**), o 6th ANM - International Conference on Advanced Nanomaterials (Aveiro, Portugal, julho de 2015) (**ANEXO D**), e o 10th CIFARP (Ribeirão Preto, Brasil, setembro de 2015) (**ANEXO E**).

Adicionalmente, os resultados obtidos deram ainda origem à publicação de um capítulo no livro **Microencapsulation and Microspheres for Food Applications**, Leonard Sagis (Ed.), Ch. 6, pp. 95-129; Elsevier, ISBN: 978-0-12-800350-3 (**ANEXO F**), à publicação de um artigo científico na revista internacional Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (**ANEXO G**) e à preparação de dois manuscritos científicos que se encontram atualmente em processo de submissão para publicação em revistas científicas internacionais indexadas com arbitragem por pares (Cássia A. Glasser, Marta M. D. C. Vila, Julio C. Pereira, Marco V. Chaud, José M. Oliveira Júnior, Matthieu Tubino and Victor M. Balcão (2016) Development of a water-in-oil-in-water multiple emulsion system integrating biomimetic aqueous-core lipid nanodroplets for protein entity stabilization. Part I: experimental factorial design; Cássia A. Glasser, Marta M. D. C. Vila, Julio C. Pereira, Marco V. Chaud, José M. Oliveira Júnior, Matthieu Tubino and Victor M. Balcão (2016) Development of a water-in-oil-in-water multiple emulsion system integrating biomimetic aqueous-core lipid nanodroplets for protein entity stabilization. Part II: process and product characterization). Estes trabalhos comprovam a qualidade e importância dos resultados obtidos no trabalho de pesquisa aqui descrito.

# 1. REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1. Introdução

Uma emulsão simples (A/O ou O/A) é preparada pela dispersão de um líquido imiscível em outro e, em seguida, se utiliza um agente emulsificante para estabilizar a emulsão (WALSTRA, 1985). No entanto, outros tipos de emulsão são sistemas bem mais complexos, conhecidos por "emulsões de emulsões" (GARTI; BISPERINK, 1998; KHAN et al., 2006; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012; BALCÃO et al., 2014, 2015), nos quais a fase dispersa na emulsão é em si já uma emulsão simples; essas emulsões mais complexas podem ser classificadas em dois tipos principais: emulsões do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) e emulsões do tipo óleo-em-água-em-óleo (O/A/O). Em particular, as emulsões do tipo A/O/A consistem em sistemas nanovesiculares em que pequenas gotas de água são aprisionadas no interior do núcleo de gotas oleosas, com tais gotas oleosas sendo dispersas em uma outra fase aquosa (RAYNAL et al., 1993; KHAN et al., 2006; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012), constituindo assim sistemas ideais para a encapsulação de entidades proteicas com conseqüente estabilização da estrutura e função de tais biomoléculas.

Os parâmetros (tanto a composição como a forma de processamento) para a preparação de uma emulsão do tipo A/O/A são de vital importância, e irão afetar diretamente tanto o tamanho hidrodinâmico das partículas como a interface para adesão do agente emulsificante, características fundamentais para as propriedades e estabilidade de emulsões do tipo A/O/A.

Considerando os fatos mencionados, e dada a crescente importância da estabilização de entidades proteicas para aplicações (bio)farmacêuticas, pretendeu-se nesta proposta de trabalho de pesquisa aplicada otimizar a metodologia de preparação de emulsões do tipo A/O/A integrando nanobalões lipídicos com núcleo aquoso, para encapsulação e estabilização proteica. A estratégia de nanoencapsulação visa a proteção das partículas proteicas, estabilizando-as estruturalmente e funcionalmente, através da manutenção de um equilíbrio termodinâmico entre a biomolécula e o seu microambiente, concomitantemente com o aumento da viscosidade rotacional, translacional e vibracional da biomolécula.

No desenvolvimento experimental foi utilizado um planejamento estatístico fatorial completo do tipo  $2^3 \times 3^1$  e uma entidade proteica pura, para efeitos de otimização da formulação A/O/A. As várias emulsões produzidas de acordo com o planejamento fatorial foram armazenadas a 4 °C e seguidas ao longo do tempo de armazenamento em termos de determinação do tamanho hidrodinâmico médio de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão, para avaliação estatística de sua estabilidade.

## 1.2. Estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas

Dentro do contexto da biomedicina, indústrias de alimentos e cosméticos, e ciências farmacêuticas, a questão da estabilização de biomoléculas assume particular relevância. Em especial, a estabilização de entidades proteicas com vista à preservação tanto da sua estrutura como da sua funcionalidade durante o armazenamento (BALCÃO; VILA, 2015), sendo essa estabilização conseguida principalmente através do estabelecimento de um equilíbrio termodinâmico entre as (bio)entidades e o seu (micro)ambiente. Existe um delicado equilíbrio entre a estabilidade e a flexibilidade necessárias à função das biomoléculas (BRODIN; FRANK, 1978), a que se soma o aumento do conhecimento da importância da superfície das moléculas proteicas para a sua estabilidade (BECHER, 1965; FLORENCE; WHITEHILL, 1982), uma vez que é através desta interface que a entidade proteica interage com "mundo externo" (BALCÃO; VILA, 2015). É geralmente aceite que a importância funcional dos resíduos de aminoácidos reside no seu papel como resíduos acessíveis a solventes na superfície da proteína, enquanto que a importância estrutural desses resíduos de aminoácidos reside provavelmente na sua função como parte do núcleo (hidrofóbico) da proteína (DAVIS; HADGRAFT; PALIN, 1985; BRODIN; FRANK, 1978; DICKINSON; STAINSBY, 1988).

De acordo com Jaenicke (1991) e Vieille e Zeikus (1996), o empacotamento do núcleo (enovelado) em moléculas nativas de proteína é tão eficaz que virtualmente todas as moléculas de solvente são essencialmente excluídas, tornando o núcleo da proteína mais como um sólido cristalino que um fluido não polar. Mais de 95% de todos os resíduos de aminoácidos carregados encontram-se localizados na superfície da proteína (PETERSEN et al., 1998), que consiste principalmente de unidades hidrofílicas, enquanto a grande maioria dos resíduos hidrofóbicos estão localizados profundamente no núcleo da molécula proteica (BECKTEL; SCHELLMAN, 1987; XIE; TIMASHEFF, 1997; JYOTHI et al., 2007). Assim, e porque as condições estáticas ou dinâmicas do microambiente físico-químico que rodeia a proteína são detectadas intrinsecamente através desses resíduos de aminoácidos carregados à superfície da molécula, a superfície da proteína constitui um grande desafio sendo um alvo de eleição para a engenharia de proteínas com o objetivo de promover a sua estabilização estrutural e funcional (Ó'FÁGÁIN, 2003; FOSS et al., 2005; BALCÃO; VILA, 2015).

A água é o solvente universal e natural para as proteínas, ditando tanto os movimentos moleculares como a estrutura e função dessas biomoléculas (SCHARNAGL; REIF; FRIEDRICH, 2005; BALCÃO; VILA, 2015). As proteínas globulares são apenas marginalmente estáveis, e tal meta-estabilidade faz com que as proteínas sejam difíceis de lidar experimentalmente (ARAKAWA et al., 1993, 2001; MOUTINHO et al., 2012; MYERS; TREVINO, 2012). A estabilidade da proteína está diretamente relacionada com a capacidade das moléculas de água, que constituem a camada de hidratação da biomolécula, flutuarem entre diferentes estruturas de equilíbrio da biomolécula e, além

disso, as moléculas internas de água também contribuem para a estabilidade da proteína proporcionando a flexibilidade necessária para a atividade biológica, atuando como lubrificante e conferindo à proteína um certo nível de plasticidade (SCHARNAGL; REIF; FRIEDRICH, 2005; ILLANES et al., 2012; DOSTER; SETTLES, 2005). Uma molécula de proteína só pode mover-se se as moléculas vizinhas mais próximas também se moverem, um fenômeno coletivo semelhante a uma busca contínua para escapar de uma gaiola em vez de um salto descontínuo através de uma barreira energética (DOSTER; SETTLES, 2005). A gaiola (líquida, aquosa) se torna uma armadilha quando a densidade atinge um estado crítico, um momento em que o líquido é aprisionado à escala macroscópica. A água, portanto, funciona como um plastificante para os movimentos proteicos, expandindo o espaço conformacional da proteína por redução da fricção (DOSTER; SETTLES, 2005), alterando o relacionamento do tipo ligações de hidrogênio entre doadores e receptores (LUZAR, 1996). A plasticidade estrutural é assim dominada por interações polares (DOSTER; SETTLES, 2005).

Estabilizar uma biomolécula envolve eliminar os seus movimentos moleculares, e isto pode ser conseguido através da redução da atividade química da água presente no seu microambiente. Assim, a estabilidade da proteína está inversamente correlacionada com a sua flexibilidade, com os fragmentos flexíveis nas proteínas sendo tipicamente as áreas sensíveis (WANG, 1999; VIEILLE; ZEIKUS, 1996; TANG; DILL, 1998). Uma proteína enovelada em ambiente aquoso (solução) tem regiões hidrofóbicas sequestradas do, e áreas hidrofílicas em contato com o, ambiente aquoso. Mas, quando a polaridade de um solvente aquoso diminui através da adição de um solvente não-aquoso, os núcleos hidrofóbicos das proteínas tendem a dissipar em contato com o solvente não-aquoso, o que provoca a ruptura da camada de hidratação da proteína, com consequente desestabilização e desenovelamento da macromolécula (WANG, 1999; MIYAWAKI; TATSUNO, 2011). Emulsões do tipo A/O/A constituem, assim, sistemas muito atrativos para a estabilização estrutural e funcional de biomoléculas no interior dos núcleos aquosos aprisionados em suas gotículas oleosas.

O aprisionamento de uma entidade proteica em emulsões A/O/A conduz à estabilidade termodinâmica da proteína, que pode ser correlacionada com uma mudança nas condições termodinâmicas do microambiente em torno de cada biopartícula, uma vez que os movimentos das moléculas de solvente (aquoso) na sua microvizinhança ficam seriamente reduzidos pelo efeito de estarem contidas no interior do núcleo aquoso da emulsão primária A/O. Em função de estarem aprisionadas em ambientes muito confinados, os movimentos moleculares das moléculas de água são alterados devido à sua natureza dipolar, forçando-as a abrandar (BALCÃO; VILA, 2015). O resultado é que a viscosidade rotacional, translacional e vibracional da entidade proteica torna-se aumentada, levando a uma arquitetura tridimensional mais rígida com a concomitante diminuição de entropia e aumento de estabilização. Devido ao aumento da viscosidade (translacional, vibracional e rotacional) e confinamento entrópico (aprisionamento físico), as entidades proteicas podem ser totalmente estabilizadas para armazenamento (BALCÃO; VILA, 2015).

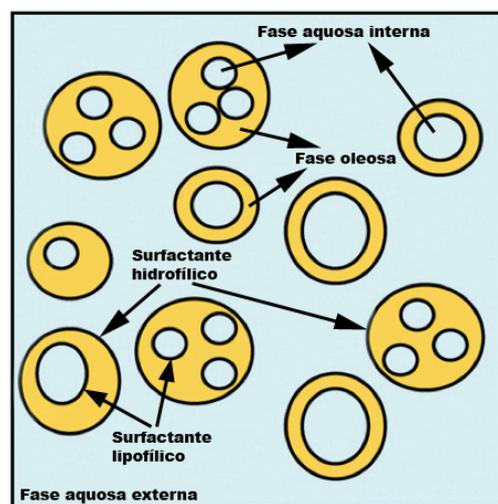
### 1.3. Emulsões do tipo A/O/A

As emulsões, considerando nanoemulsões e microemulsões, são sistemas formados quando óleo e água são misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado com um álcool de cadeia carbonada média. Devido à sua estrutura interna compartimentalizada, emulsões do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) apresentam vantagens sobre emulsões simples óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O) para encapsulação de biomoléculas, tais como a capacidade de carrear moléculas hidrofílicas ou lipofílicas, e permitindo um melhor controle sobre a liberação de moléculas bioativas (PAYS et al, 2002; DAVIS; WALKER, 1987; OKOCHI; NAKANO, 2000; KHAN et al, 2006; MARCATO; DURÁN, 2008).

#### 1.3.1. Características de uma emulsão do tipo A/O/A

Uma emulsão simples (A/O ou O/A) é preparada pela dispersão de um líquido imiscível em outro, e, em seguida, se utiliza um emulsificante para estabilizar a dispersão (WALSTRA, 1985). No entanto, outros tipos de emulsões constituem sistemas muito mais complexos, conhecidos por "emulsões de emulsões" (GARTI; BISPERINK, 1998; KHAN et al., 2006; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012), nos quais a fase dispersa na emulsão já é em si uma emulsão; essas emulsões mais complexas podem ser classificadas em dois tipos principais: emulsões do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) e emulsões do tipo óleo-em-água-em-óleo (O/A/O). Em particular, emulsões do tipo A/O/A são sistemas vesiculares em que pequenas gotas de água são aprisionadas no interior do núcleo de gotículas oleosas, com essas gotículas oleosas sendo dispersas em outra fase aquosa (RAYNAL et al., 1993; KHAN et al., 2006; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012; BALCÃO et al., 2015) (ver Figura 1).

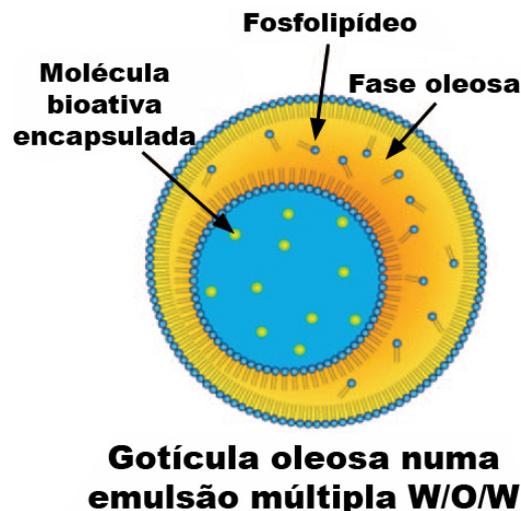
**Figura 1.** Representação esquemática de uma emulsão do tipo A/O/A, mostrando as fases aquosas interna e externa, assim como a provável localização dos surfactantes.



**Fonte:** adaptado de Balcão et al. (2015).

Emulsões do tipo A/O/A são, por isso, emulsões dentro de emulsões, com as gotículas da fase dispersa (uma emulsão simples A/O) contendo pequenas gotas aquosas no núcleo, sendo tradicionalmente estabilizadas por emulsificantes monoméricos tanto na interface interna como externa. Os surfactantes hidrofóbicos situam-se no interior da interface água/óleo, enquanto que os surfactantes hidrofílicos se encontram no exterior das interfaces óleo/água (RAYNAL et al., 1993; SHIMA et al., 2004c; TIRNAKSIZ; KALSIN, 2005; SU, 2008; SCHMIDTS et al., 2009) (ver Figura 2).

**Figura 2.** Representação esquemática de uma gotícula oleosa numa emulsão do tipo A/O/A, mostrando o núcleo aquoso onde entidades bioativas podem ser aprisionadas.



**Fonte:** adaptado de Balcão et al. (2015).

As emulsões do tipo foram descritas pela primeira vez em 1925 (SEIFRIZ, 1925), mas estudos mais detalhados desses sistemas atraíram atenção apenas nas últimas duas décadas. Estes sistemas têm sido estudados na tentativa de encontrar aplicações industriais para a nanoencapsulação em várias áreas, como produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentares (SHIMIZU; NAKANE, 1995; OKOCHI; NAKANO, 2000; FARAHMAND; TAJERZADEH; FARBOUD, 2006; YENER; BAITOKOVA, 2006; SCHMIDTS et al., 2009; AKHTAR et al., 2010; GHOSH, 2011; JIGAR et al., 2011; LOVELYN; ATTAMA, 2011; KUMAR, R; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012; SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012; SCHMIDTS et al., 2012). A entidade bioativa (proteínas, peptídeos, partículas fágicas, pigmentos antioxidantes) aprisionada no núcleo de nanobalões lipídicos torna-se assim uma fase independente dentro de uma matriz alimentar/farmacêutica/cosmética, com a vantagem adicional de estar protegida e ter a sua vida ativa útil estendida. Biomoléculas encapsuladas podem ainda ser consideradas como estando localizadas em uma região definida do espaço, limitada por uma barreira imaginária ou física que permite a separação física entre a biomolécula e a matriz alimentar/farmacêutica/cosmética, e entre a biomolécula e o sistema imunológico/digestivo (BALCÃO; VILA, 2015). Cada gotícula oleosa dispersa na emulsão do tipo A/O/A forma uma

estrutura vesicular com compartimentos aquosos singulares ou múltiplos separados da fase aquosa externa por uma camada de fase oleosa. Na Figura 2 encontra-se representada esquematicamente uma gotícula oleosa em uma emulsão do tipo A/O/A.

### 1.3.2. Principais processos de produção de emulsões do tipo A/O/A

Diferentes métodos estão disponíveis para a produção de emulsões do tipo A/O/A, e todos eles partilham uma característica comum: todos começam com a formação de uma emulsão simples (primária) A/O por aplicação de energia mecânica (agitação) (GARTI; ASERIN, 1996a, b; URSICA et al., 2005; CAI et al., 2010; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN 2012; BALCÃO et al., 2015). Consequentemente, a interface entre as duas fases imiscíveis (água e óleo) é deformada, formando uma película líquida entre os dois líquidos imiscíveis (SU, 2008). Através da aplicação contínua de energia mecânica, as gotículas oleosas formadas são subsequentemente quebradas em gotículas menores. Durante o processo de emulsificação, as moléculas de surfactante são transportadas a partir da solução para a interface da emulsão primária A/O estabilizando, assim, as gotículas oleosas formadas; além disso, a disrupção adicional das gotículas oleosas maiores em gotículas menores ocorre apenas quando tal transporte é mais rápido do que a deformação das gotículas (GARTI; ASERIN, 1996a; BENICHO; ASERIN; GARTI, 2001; SU, 2008; PENG et al., 2010). Existem duas principais metodologias para a produção de emulsões do tipo A/O/A: **(i)** emulsificação de um passo, e **(ii)** emulsificação de dois passos (JAGER-LEZER et al., 1997; BENICHO; ASERIN; GARTI, 2001; ALLOUCHE, et al., 2003; ERDAL; ARAMAN, 2006; LEAL-CALDERON et al., 2012; ATUL; MITALI, 2012; MUN et al., 2013; SCHUCH et al., 2013; MUN et al., 2014). Resumidamente, o método de emulsificação de um passo envolve forte agitação mecânica e inversão de fases (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; SEVCIKOVÁ et al., 2012). Uma solução aquosa (A) de um emulsificante hidrofílico é vigorosamente misturada com a fase oleosa (O) que contém uma maior quantidade de emulsificante hidrofóbico, formando assim inicialmente uma emulsão primária A/O; subsequentemente, parte da emulsão A/O sofre inversão e forma uma emulsão do tipo A/O/A (ELEY; HEY; SYMONDS, 1988; MATSUMOTO; KANG, 1989). Os métodos de inversão de fase envolvem a adição progressiva de uma solução aquosa de emulsificante hidrofílico (a fase aquosa externa) a uma emulsão primária A/O previamente formada. Tal como no método de agitação mecânica, apenas uma parte da emulsão primária A/O se converte em emulsão do tipo A/O/A, sendo que a extensão da inversão parece estar diretamente dependente da natureza química do agente emulsionante hidrofílico (DICKINSON; McCLEMENTS, 1996). Por outro lado, os métodos de emulsificação em dois passos envolvem a produção de uma emulsão primária A/O seguida da dispersão dessa emulsão primária em uma solução aquosa contendo um emulsionante hidrofílico (isto é, a fase aquosa externa) (LEAL-CALDERON et al., 2012; SCHUCH et al., 2013; MUN et al., 2014) (ver Figura 3).

**Figura 3.** Representação esquemática do método de emulsificação em dois passos para a produção de emulsões do tipo A/O/A.

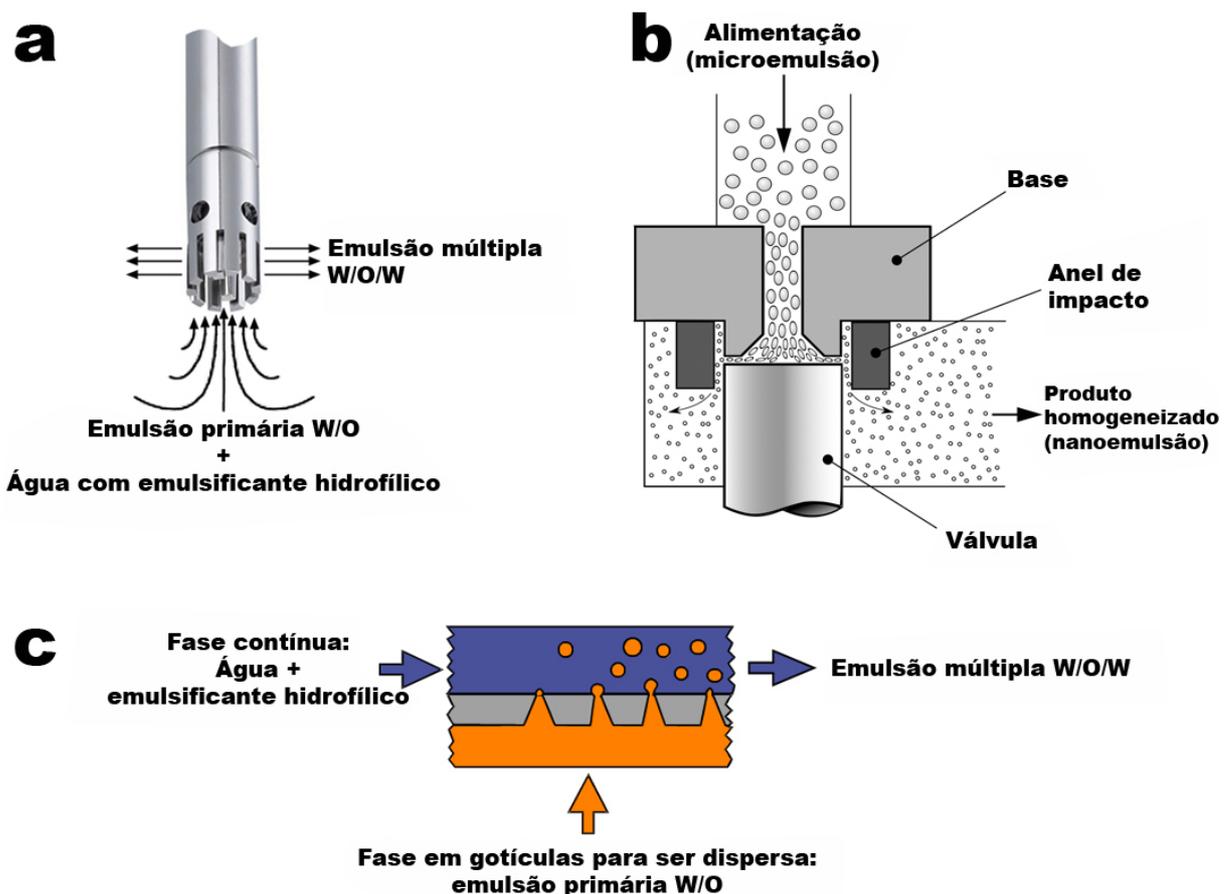


Fonte: adaptado de Balcão et al. (2015).

A eficácia deste método de produção depende fortemente da estabilidade intrínseca da emulsão primária A/O (DICKINSON; McCLEMENTS, 1996; CSÓKA; ERÖS, 1997; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; KUMAR, R; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012; BALCÃO et al., 2015), pelo que é de vital importância que os distúrbios hidrodinâmicos produzidos durante o segundo estágio de emulsificação não produzam ruptura significativa da emulsão primária A/O (DICKINSON; McCLEMENTS, 1996; VAN DER GRAAF; SCHROEN; BOOM, 2005; SU, 2008). Ao comparar o método de dois passos com o método de um passo, o primeiro pode ser utilizado de forma sistemática para a obtenção de emulsões do tipo A/O/A estáveis de composição bem definida e distribuição de tamanhos de gotículas reproduzível (FLORENCE; WHITEHILL, 1985; MATSUMOTO, 1985; LEAL-CALDERON et al., 2012), enquanto que o segundo método é pouco reproduzível. Na grande maioria dos estudos recentes, as emulsões do tipo A/O/A são preparadas utilizando um processo de emulsificação em dois passos com dois conjuntos de emulsificantes: um emulsificante hidrofóbico (para a emulsão primária A/O) e um emulsificante hidrofílico (para a emulsão do tipo (A/O)/A). Vários métodos têm sido usados nos processos de emulsificação em dois passos, sendo que cada método introduz energia no sistema de uma forma diferente, resultando em diferentes microestruturas das emulsões. Para uma dada formulação, a microestrutura da emulsão do tipo A/O/A final é ditada pelo processo de produção, que contribui grandemente tanto para a vida útil da emulsão como para o mecanismo da sua desestabilização (LIU; McGRATH, 2005; SCHERZE; KNOTH; MUSCHIOLIK, 2006; SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012). Os dispositivos convencionais mais importantes para

emulsificação são **(a)** agitadores (de alta velocidade), **(b)** homogeneizadores de alta pressão (PERRECHIL; CUNHA, 2010) e **(c)** sistemas de membrana (SCHUBERT; ARMBRUSTER, 1992; VLADISAVLJEVIC; SHIMIZU; NAKASHIMA, 2006) (ver Figura 4). Os parâmetros (tanto a composição como o método de processamento) para a produção de uma emulsão do tipo A/O/A são de vital importância uma vez que irão afetar diretamente tanto o tamanho hidrodinâmico médio de partícula como a decoração interfacial com o emulsificante, características de extrema importância para as propriedades e estabilidade das emulsões do tipo A/O/A (SRINIVASAN; SINGH; MUNRO, 1996; BENICHO; ASERIN; GARTI, 2001; SOURDET et al., 2002; SHIMA et al., 2004; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; JIAO; BURGESS, 2008; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012; BALCÃO et al., 2013, 2015).

**Figura 4.** Representação esquemática das metodologias de emulsificação comumente utilizadas para a produção de emulsões do tipo A/O/A: **(a)** agitação/homogeneização de alta velocidade, **(b)** homogeneização por alta pressão, e **(c)** emulsificação por membrana.



Fonte: adaptado de Balcão et al. (2015).

Na metodologia de emulsificação de dois passos para a produção de emulsões do tipo A/O/A, a emulsão primária A/O é preparada sob condições de alto cisalhamento (homogeneização por agitação

a alta velocidade), enquanto que a etapa de emulsificação secundária (que conduz à obtenção de uma emulsão do tipo (A/O)/A) é geralmente realizada sem qualquer mistura severa (já que, nesta fase, uma agitação de alta velocidade poderia promover a ruptura das gotículas da emulsão primária A/O, resultando na coalescência das fases aquosas interna e externa, e produzindo uma emulsão simples O/A). No entanto, muito recentemente, vários pesquisadores têm usado dois ciclos de homogeneização/agitação de alta velocidade para produzir emulsões do tipo A/O/A, e as emulsões do tipo A/O/A resultantes apresentaram tamanhos hidrodinâmicos de partícula bastante homogêneos associados a baixos índices de polidispersão (BALCÃO et al., 2013, 2014).

Na agitação/homogeneização a alta velocidade, utiliza-se um agitador de alta velocidade (ver Figura 4a), que provoca o rompimento da fase dispersa pela tensão de cisalhamento a alta turbulência, sendo a principal causa de ruptura do fluido, conduzindo assim à formação de pequeníssimas gotículas. Vários autores argumentam que é importante não usar estresse de alto cisalhamento quando se deseja preparar emulsões do tipo A/O/A, pois isso pode levar à ruptura da emulsão interna com consequente coalescência de seu núcleo aquoso interno com a fase aquosa externa (VAN DER GRAAF; SCHROEN; BOOM, 2005), mas, na verdade, mais recentemente, Balcão e co-autores (BALCÃO et al., 2013, 2014) demonstraram que o uso de dois ciclos de agitação de alta velocidade era adequado para a produção de emulsões do tipo A/O/A encapsulando entidades proteicas (tanto lactoferrina bioativa como partículas bacteriofágicas) no seu núcleo aquoso interno, que se mantiveram estáveis ao longo de mais de três meses de armazenamento.

No caso do (clássico) sistema de homogeneização a alta pressão, a mistura de emulsão primária A/O e fase aquosa externa é forçada a passar através de um canal estreito (ou válvula de orifício) a alta pressão ( $5 \times 10^6 - 3,5 \times 10^7$  Pa), desviada em ângulo reto e forçada a colidir contra um anel de impacto (ver Figura 4b), promovendo uma súbita queda de pressão (com consequente dissipação de energia) e fazendo com que as gotículas oleosas na fase aquosa (externa) sejam rompidas e ainda mais emulsionadas (BURGAUD; DICKINSON; NELSON 1990; FLOURY; LEGRAND; DESRUMAUX, 2004; PERRIER-CORNET; MARIE; GERVAIS, 2005). Neste processo a alta pressão, a emulsificação é causada pela turbulência, efeitos de cavitação e altas forças de cisalhamento (BURGAUD; DICKINSON; NELSON 1990; STANG; SCHUCHMANN; SCHUBERT, 2001; FREUDIG; TESCH; SCHUBERT, 2003; FLOURY; LEGRAND; DESRUMAUX, 2004; PERRIER-CORNET; MARIE; GERVAIS, 2005).

A emulsificação por membrana é um método relativamente recente, usado para preparar emulsões do tipo A/O/A (ver Figura 4c). Neste método as misturas de emulsão primária A/O são forçadas a passar, sob pressão elevada, através de aberturas estreitas de algumas centenas de microns de diâmetro em uma membrana microporosa. Uma combinação de turbulência e fluxo laminar de cisalhamento provoca a ruptura das gotículas, levando à obtenção de emulsões finas monodispersas com boa estabilidade contra cremação e fenômenos de floculação (KOBAYASHI; NAKAJIMA, 2002; KOBAYASHI et al., 2005). As vantagens desta técnica de produção, tais como baixo consumo

de energia, um melhor controle tanto do tamanho como da distribuição de tamanhos das gotículas, e a suavidade do processo (SHIMA et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2005; MINE; SHIMIZU; NAKASHIMA, 1996; KOBAYASHI et al., 2001; SUGIURA; NAKAJIMA; SEKI, 2002) só são superadas pelas principais desvantagens, tais como consumo de tempo e baixa produtividade (MUSCHIOLIK, 2007).

### 1.3.3. Composição das fases da emulsão do tipo A/O/A

A estabilidade das gotículas oleosas após a produção de uma emulsão do tipo A/O/A é determinada pela composição correta da emulsão (TAISNE; WALSTRA; CABANE, 1996; GHEORGHE; STOICA; FLOAREA, 2008). Os principais componentes de uma emulsão do tipo A/O/A são a fase aquosa interna, o(s) emulsificante(s) hidrofóbico(s), a fase oleosa, o(s) emulsificante(s) hidrofílico(s) e a fase aquosa externa. A composição da emulsão do tipo A/O/A é assim de vital importância, uma vez que diferentes surfactantes em conjunto com a natureza e concentração da fase oleosa podem afetar a estabilidade da emulsão (DAVIS; HADGRAFT; PALIN, 1985; GARTI; ASERIN, 1996a,b; GHEORGHE; STOICA; FLOAREA, 2008). Surfactantes iônicos e não-iônicos têm sido utilizados para diferentes aplicações em emulsões do tipo A/O/A, de acordo com restrições de saúde (GARTI; ASERIN, 1996a,b). Está, no entanto, bem estabelecido, que combinações de emulsificantes na fase aquosa externa exercem um efeito benéfico sobre a estabilidade de uma emulsão do tipo A/O/A, e que o emulsificante hidrofóbico na interface interna da fase oleosa deve ser utilizado em grande excesso (10-30% (m/m) da emulsão primária A/O interna), enquanto que o emulsificante hidrofílico deve ser usado em concentração baixa (0,5-5%, m/m) (GARTI; ASERIN, 1996a,b). O Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL (ou HLB), ou uma medida do grau em que um surfactante é hidrofílico ou lipofílico) (GRIFFIN, 1949, 1954; BOYD; PARKINSON; SHERMAN, 1972; LO et al., 1977; PRINDERRE et al., 1998; ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002; SHIMA et al., 2004c; GUO; RONG; YING, 2006; PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008; PENG et al., 2010; SCHMIDTS et al., 2010b; CORIN; O'CONNOR, 2014) da emulsão do tipo ((A/O)/A) é um EHL ponderado com as contribuições dos dois tipos de emulsificantes (FRENKEL; SHWARTZ; GARTI, 1983; GARTI; FRENKEL; SCHWARTZ, 1983; GUTIÉRREZ et al., 2008; SCHMIDTS et al., 2009, 2010b). Adicionalmente, parâmetros processuais tais como o volume da fase oleosa e a natureza das entidades bioativas aprisionadas na fase aquosa interna, também desempenham um papel decisivo na manutenção da estabilidade das emulsões do tipo A/O/A (GARTI; ASERIN, 1996a,b; GHEORGHE; STOICA; FLOAREA, 2008).

### 1.3.3.1. Fases aquosas interna (discreta, núcleos internos) e externa (contínua)

A fase aquosa desempenha dois papéis distintos em emulsões do tipo A/O/A: é, por um lado, a fase dispersa na emulsão primária A/O e, por outro lado, a fase contínua (externa) numa emulsão do tipo (A/O)/A. Enquanto que a(s) fase(s) aquosa(s) interna(s) discreta(s) são geralmente soluções de entidades bioativas encapsuladas, tais como peptídeos, proteínas, ou partículas bacteriofágicas (GARTI; ASERIN, 1996a,b; PUAPERMPOONSIRI; SPENCER; VAN DER WALLE, 2009; BALCÃO et al., 2013, 2014), a fase aquosa externa (contínua) é geralmente uma solução de emulsificantes (por exemplo poloxâmeros) e estabilizantes (por exemplo, polissacarídeos) (SU, 2008; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008). A fração volúmica dos dois tipos de fases aquosas, e a adição de materiais a elas, exerce um grande efeito sobre a estabilidade de uma emulsão do tipo A/O/A.

### 1.3.3.2. Fase oleosa

A estabilidade de uma emulsão do tipo (secundária) (A/O)/A depende fortemente de uma emulsão primária A/O estável, que por sua vez é fortemente correlacionada com a hidrofobicidade da fase oleosa (KANOUNI; ROSANO; NAOULI, 2002; SU, 2008; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012). A natureza da fase oleosa em emulsões do tipo A/O/A exerce uma influência direta tanto sobre a eficiência de aprisionamento do núcleo aquoso interno retido na emulsão do tipo A/O/A final, como na taxa de transporte de entidades aprisionadas através da fase oleosa (OMOTOSHO et al., 1986; WEISS; SCHERZE; MUSCHIOLIK, 2005; SU, 2008; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; MUN et al., 2013; SCHUCH et al., 2013; MUN et al., 2014). A produção de emulsões do tipo A/O/A estáveis necessita (idealmente) de uma fase oleosa com baixa viscosidade e baixa solubilidade em água (HAMILTON, 1993; GARTI, 1997a, b; PRINDERRE et al., 1998; SU, 2008; SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012).

### 1.3.3.3. Fração de emulsão A/O dispersa

Para o estabelecimento de uma fração mássica ótima da fase dispersa (emulsão primária A/O) numa emulsão do tipo A/O/A, é preciso tomar em consideração tanto a estabilidade como a eficiência de aprisionamento (ZHENG et al., 1993; DICKINSON; McCLEMENTS, 1996; DICKINSON et al., 1994; SU, 2008; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012; MUN et al., 2013; SCHUCH et al., 2013). Demonstrou-se que uma fração mássica ótima entre a fase dispersa (A/O) e a fase contínua (aquosa, externa) deve ficar entre 0,20-0,30 (m/m). Para conteúdos fracionais

superiores da fase dispersa (emulsão primária A/O), as emulsões do tipo A/O/A tornam-se mais condensadas, com viscosidade aumentada (devido ao maior teor de óleo), com tamanhos de gotícula maiores, tudo levando à instabilidade da emulsão do tipo A/O/A (DANNER; SCHUBERT, 2001). Por outro lado, uma emulsão do tipo A/O/A com um pequeno volume fracional de fase dispersa (A/O) irá apresentar uma baixa eficiência de aprisionamento, o que neutraliza quaisquer potenciais aplicações comerciais (DICKINSON et al., 1993,1994; SU, 2008; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012; MUN et al., 2013).

#### 1.3.3.4. Emulsificantes

Os emulsificantes são substâncias que possuem dois grupos distintos na mesma molécula, nomeadamente um grupo hidrofóbico (com afinidade para a fase oleosa) e um grupo hidrofílico (com afinidade para a água) (GARTI, 1997a, b; KANOUNI; ROSANO; NAOULI, 2002) e, por esta razão, são designados por moléculas anfífilas. Estas moléculas anfífilas baixam a tensão interfacial e assim facilitam a ruptura das gotículas (resultando em gotículas menores), determinando, desta forma, qual é a fase contínua e qual é a fase dispersa (FENNEMA, 1996; BENICHO; ASERIN; GARTI, 2001). Os emulsionantes são frequentemente classificados pelo seu valor de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), o qual varia desde zero até mais de 20 (mas menos do que 30). Tal escala HLB permite retirar conclusões acerca da atração global relativa do emulsificante para óleo ou água (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002; GUO; RONG; YING, 2006; PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008; SCHMIDTS et al, 2009, 2010b; KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, 2012). Um valor baixo de índice HLB indica um emulsificante fortemente lipofílico, enquanto um índice de HLB elevado indica um emulsificante fortemente hidrofílico. O índice HLB também é útil como um indicador geral da solubilidade de um emulsificante em óleo e em água (GRIFFIN, 1949,1954; FENNEMA, 1996; GUO; RONG; YING, 2006; PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008; SCHMIDTS et al., 2009). Em estudos iniciais sobre emulsões do tipo A/O/A, foram utilizados vários emulsificantes monoméricos iônicos e não iônicos mas, ao longo do tempo, emulsões clássicas do tipo A/O/A começaram a ser preparadas com dois conjuntos de emulsificantes monoméricos (hidrofóbico (p.ex. Span 80), para estabilizar a interface A/O interna, e hidrofílico (p.ex. Tween 80), para estabilizar a interface O/A externa) (GARTI; ASERIN, 1996a,b; SCHMIDTS et al, 2009, 2010). Mais recentemente, emulsificantes poliméricos ou anfífilos macromoleculares têm substituído progressivamente os emulsificantes monoméricos, sendo capazes de formar películas fortes e mais rígidas, na(s) interface(s) (BOBIN; MICHEL; MARTINI, 1999; BENICHO; ASERIN; GARTI, 2001, 2002, 2004, 2007; ALLOUCHE et al., 2003; VASILJEVIC et al., 2006, 2009). Adicionalmente, os emulsificantes poliméricos e não-iônicos podem formar interfaces entre cruzadas após a adsorção. Estes complexos interfaciais poliméricos são capazes de resistir a extensos adelgaçamentos (causados

pelo influxo de água promovido pela pressão osmótica), com conseqüente intumescimento dos núcleos aquosos internos (GARTI; ASERIN, 1996a, b; BENICHO; ASERIN; GARTI, 2002; SCHMIDTS et al., 2009; KHATRI et al., 2011; LEAL-CALDERON et al., 2012). Os componentes funcionais da lecitina são os fosfolípidos, os quais têm uma cabeça polar hidrofílica e duas caudas de ácidos graxos hidrofóbicos. Os fosfolípídeos estabilizam as emulsões principalmente fornecendo barreiras de repulsão eletrostática às gotículas da emulsão (AKHTAR; DICKINSON, 2001; ADACHI et al., 2003; CAPEK, 2004; KNOTH; SCHERZE; MUSCHIOLIK, 2005; MUSCHIOLIK et al., 2006; SCHMIDTS et al., 2009), reduzindo assim (em direção a valores mais negativos) o Potencial Zeta e proporcionando uma boa estabilidade à emulsão do tipo A/O/A. A lógica subjacente aos principais mecanismos de estabilização de emulsões do tipo A/O/A por moléculas anfífilas poliméricas envolve, aparentemente, repulsões eletrostáticas entre gotículas oleosas portadoras da mesma carga elétrica e estabilização estérica resultante de biopolímeros adsorvidos na interface (BENICHO; ASERIN; GARTI, 2004; CAPEK, 2004). Durante as condições altamente dinâmicas da homogeneização na produção de emulsões do tipo A/O/A, a maior parte da proteína é transportada por convecção (em vez de difusão) para a interface óleo-água. A taxa de adsorção da proteína na interface é determinada tanto pelo seu tamanho como pelos locais de ligação imediatamente disponíveis na molécula (DICKINSON; GOLDING, 1997; DICKINSON, 1998). Como mencionado anteriormente, as interações eletrostáticas e a estabilização estérica são os principais mecanismos postulados pelos quais ocorre a estabilização de emulsões estabilizadas por proteína. Copolímeros sintéticos em bloco baseados em esqueleto de silício e cadeias laterais de óxido de polietileno, ou poloxâmeros (copolímeros tribloco não iônicos com um núcleo hidrofóbico central de polioxipropileno flanqueado por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno) também foram estudados (BOYD; PARKINSON; SHERMAN, 1972; GARTI; ASERIN, 1996a,b; CHO, H. K.; CHO, J. H.; CHEONG, 2007; BALCÃO et al., 2013, 2014, 2015) para a produção de emulsões do tipo A/O/A.

#### 1.3.4. Desestabilização espontânea de emulsões do tipo A/O/A

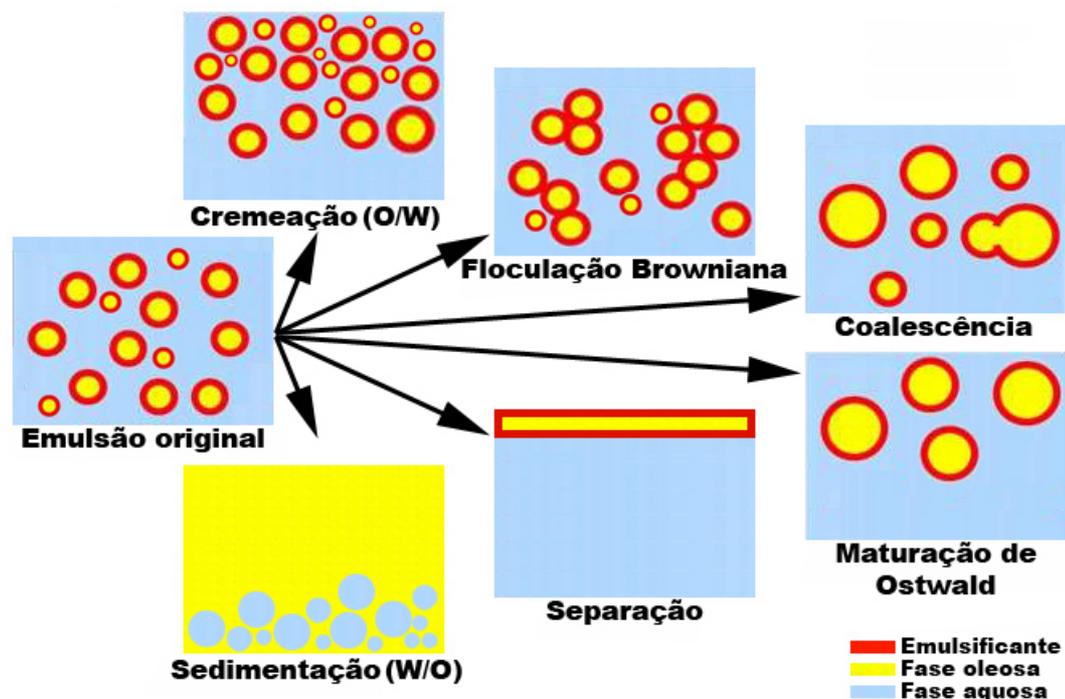
As emulsões do tipo são termodinamicamente instáveis por natureza, coalescem rapidamente, e também liberam rapidamente as entidades aprisionadas, sendo estas as duas principais desvantagens das emulsões do tipo A/O/A que têm impedido aplicações comerciais bem sucedidas. Os dois problemas mais relevantes e intrínsecos relacionados com emulsões do tipo A/O/A, são a instabilidade termodinâmica derivada do tamanho hidrodinâmico das gotículas oleosas que integram as emulsões, e a liberação descontrolada de entidades aprisionadas no interior da fase aquosa interna, com a abordagem experimental para contrariar tais problemas a incluir o design, produção e utilização de emulsificantes poliméricos (BOBIN; MICHEL; MARTINI, 1999; ALLOUCHE et al., 2003; VASILJEVIC et al., 2006, 2009). A instabilidade termodinâmica inerente às emulsões do tipo A/O/A

restringe em grande parte suas aplicações em matrizes alimentares, farmacêuticas e cosméticas (DICKINSON; McCLEMENTS, 1996; GARTI; ASERIN, 1996a,b; EINHORN-STOLL; WEISS; KUNZEK, 2002; PAYS et al., 2001, 2002; AKHTAR; YAZAN, 2005; TIRNAKSIZ; KALSIN, 2005; ERDAL; ARAMAN, 2006; YENER; BAITOKOVA, 2006; TAL-FIGIEL, 2007; GUTIÉRREZ et al., 2008; AKHTAR et al., 2010; GHOSH, 2011; LOVELYN; ATTAMA, 2011; JIGAR et al., 2011; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013).

#### 1.3.4.1. Fenômenos de desestabilização de emulsões simples

Emulsões simples O/A podem sofrer vários tipos de fenômenos físicos, como ilustrado na Figura 5. A única diferença relativa para emulsões A/O, é que pode ocorrer sedimentação ao invés de cremação (ver Figura 5). Cremação, floculação Browniana e coalescência podem ocorrer em paralelo ou em sequência, em cada tipo de emulsão, e todas essas alterações físicas levarão eventualmente à ruptura da emulsão e consequente separação de fases (FENNEMA, 1996). Todos estes fenômenos físicos serão discutidos de seguida em mais detalhe.

**Figura 5.** Representação esquemática dos processos de instabilidade que ocorrem numa emulsão O/A.



Fonte: adaptado de Balcão et al. (2015).

Cremação é a ascensão de gotículas oleosas dispersas, que permanecem separadas quando tocam umas nas outras. Este fenômeno tem lugar em qualquer fase aquosa contínua, se a fase dispersa não tiver exatamente a mesma densidade. Quanto mais pequenas forem as gotículas oleosas dispersas, mais resistentes elas são à cremação (DICKINSON; GALAZKA; ANDERSON, 1991b), e por isso a taxa de cremação pode ser reduzida (i) através da diminuição das dimensões hidrodinâmicas das gotículas na emulsão, (ii) por igualização das densidade das duas fases, e (iii) aumentando a viscosidade da fase aquosa contínua (DICKINSON; GALAZKA; ANDERSON, 1991a,b; GARTI; ASERIN, 1996a,b). No caso de emulsões A/O, em vez do fenômeno de cremação teríamos sedimentação sob a ação da gravidade, com as gotículas aquosas também a permanecerem separadas quando tocam umas nas outras.

Floculação Browniana consiste na agregação de gotículas em suspensão, com conseqüente formação de aglomerados tridimensionais. Este é um processo físico, no qual a agregação das gotículas oleosas dispersas ocorre em resultado de colisões em combinação com forças adesivas intergotículas. A floculação Browniana é, portanto, um fenômeno complexo que é causado pelo movimento Browniano e movimentos de cisalhamento das gotículas oleosas dispersas. Em sistemas emulsificados termodinamicamente instáveis, a floculação Browniana pode ser evitada se existir uma barreira de energia livre suficientemente elevada entre as gotículas, derivada de forças interfaciais tais como as forças de longo alcance de van der Waals e interações eletrostáticas (CAPEK, 2004). O resultado global destes dois conjuntos de interações influencia o comportamento das gotículas da emulsão em relação à floculação Browniana e coalescência adicional (DICKINSON; GALAZKA; ANDERSON, 1991a,b; GARTI; ASERIN, 1996a,b; KHATRI et al., 2011).

A coalescência é também um fenômeno físico, induzido pela ruptura dos filmes finos (lamelas) entre gotículas oleosas (ou aquosas) muito próximas, que conduz à fusão das gotículas por contato, com grande aumento nos tamanhos hidrodinâmicos das gotículas. Neste processo, tanto a tensão interfacial como a área de superfície das gotículas são muito reduzidas (GARTI; ASERIN, 1996a,b) pelo grande aumento nos tamanhos hidrodinâmicos. Quanto mais tempo as gotículas permanecerem próximas umas das outras, maior será a probabilidade de que ocorra coalescência. A coalescência é, assim, um processo de primeira ordem, no qual a probabilidade de que ocorra a ruptura dos filmes de gotículas oleosas próximas é proporcional à sua área de contato. A coalescência é menos provável de ocorrer em gotículas oleosas pequenas e muito pequenas, ou em gotículas com uma película espessa de emulsificante, uma vez que tais gotículas minúsculas têm uma área de película menor entre elas, enquanto que as gotículas com uma espessa película de emulsificante exibem forças repulsivas mais fortes entre elas (FENNEMA, 1996). Como mencionado acima, a coalescência leva à formação de gotículas maiores e, eventualmente, à separação de fases (ver Figura 5).

Em relação ao fenômeno chamado de "Ostwald ripening", ou amadurecimento de Ostwald, este ocorre em emulsões com tamanhos de gotículas polidispersas, e também leva à desestabilização da emulsão (CAPEK, 2004; PORRAS et al., 2008). No amadurecimento de Ostwald, colisões entre duas

gotículas oleosas (ou aquosas) pode levar a uma gotícula maior e a uma gotícula menor, com as gotículas menores eventualmente a tornarem-se muito pequenas e a permanecerem solubilizadas na fase aquosa contínua, conduzindo assim a uma diminuição do índice de polidispersão do sistema (SOMA; PAPADOPOULOS, 1996; CAPEK, 2004). O fenômeno do amadurecimento de Ostwald ocorre mais frequentemente em emulsões A/O, quando a fase aquosa está suficientemente solubilizada na fase oleosa contínua. A principal força motriz para o amadurecimento de Ostwald é geralmente aceita por ser a pressão de Laplace (isto é, a diferença de pressão entre o interior e o exterior de uma superfície curva, causada pela tensão superficial na interface), e pode ser contrariada através do aumento da pressão osmótica por adição de um soluto adequado à fase aquosa, retardando assim a taxa de amadurecimento de Ostwald. Após a adição de um soluto adequado, e assim que uma pequena gotícula encolher, haverá um aumento tanto na concentração de sal como na pressão osmótica, produzindo uma força motriz para o transporte de água na direção oposta. O resultado líquido será uma distribuição estável de tamanhos de gotículas (FENNEMA, 1996; JAGER-LEZER et al., 1997; ROSANO; GANDOLFO; HIDROT, 1998; KOROLEVA; YURTOV, 2003; LIU et al., 2007; FRASCH-MELNIK; SPYROPOULOS; NORTON, 2010; LEAL-CALDERON et al., 2012).

### 1.3.5. Aumento da estabilidade de emulsões do tipo A/O/A

Em estudos mais recentes de emulsões do tipo A/O/A o foco principal tem sido melhorar a sua estabilidade e também controlar a liberação de entidades bioativas e água aprisionadas (SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; SCHMIDTS et al, 2010). A composição e as condições de processamento, que influenciam diretamente as propriedades de emulsões do tipo A/O/A, têm sido alvo de várias modificações que visam atingir uma estabilidade melhorada (GARTI; ASERIN, 1996a,b; BENICHO; ASERIN; GARTI, 2004; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; GUTIÉRREZ et al., 2008; BONNET et al., 2009). Podemos pensar em várias (novas) abordagens para melhorar tanto a estabilidade como a liberação controlada em emulsões do tipo A/O/A: **(i)** estabilização da emulsão interna (primária) A/O, **(a)** reduzindo o(s) tamanho(s) da(s) gotícula(s), **(b)** formando microesferas, **(c)** aumentando a viscosidade da fase aquosa interna; **(ii)** modificando a natureza da fase oleosa, **(d)** aumentando a sua viscosidade, **(e)** adicionando carreadores, **(f)** adicionando complexantes; **(iii)** estabilizando a emulsão interna e/ou externa, via **(g)** utilizando emulsificantes poliméricos (BOBIN; MICHEL; MARTINI, 1999; ALLOUCHE et al., 2003; VASILJEVIC et al., 2006, 2009), ou **(h)** adicionando partículas sólidas coloidais para formar uma película mais forte e mais rígida na interface (GARTI; ASERIN, 1996a,b). Tem também sido sugerido o uso de emulsificantes poliméricos para estabilizar as interfaces tanto internas como externas (BOBIN; MICHEL; MARTINI, 1999; VASILJEVIC et al., 2009). Tanto macromoléculas naturais (gomas e proteínas) como sintéticas (copolímeros anfifílicos em bloco), podem ser consideradas (GARTI; BISPERINK, 1998; SU;

FLANAGAN; SINGH, 2008). Uma extensa revisão sobre o uso de tais emulsificantes poliméricos pode ser encontrado na literatura (GARTI; ASERIN, 1996b).

### 1.3.6. Características físico-químicas das emulsões do tipo A/O/A

Emulsões do tipo A/O/A são sistemas complexos por natureza e são termodinamicamente instáveis, com tendência a sofrer coalescência; a ruptura de gotículas oleosas, fenômenos de coalescência e alterações na tensão interfacial no interior das gotículas oleosas são, de fato, muito difíceis de detectar (DICKINSON; McCLEMENTS, 1996; GARTI, 1997a,b; PORRAS et al., 2008). Normalmente, as características morfológicas das emulsões do tipo A/O/A são definidas usando análises de fotomicrografias obtidas por (crio)-microscopia eletrônica de varredura (crio-MEV), contando o volume, tamanho e número de gotículas oleosas (índice de polidispersão) imediatamente após a produção da emulsão do tipo A/O/A e após uma armazenagem prolongada (BALCÃO et al., 2013, 2014, 2015), através da realização de medições de viscosidade (PAL, 2008), e por estimativa quantitativa da entidade aprisionada transportada da fase aquosa interna para a fase aquosa externa (eficiência de aprisionamento, EE) e vice-versa. Adicionalmente, a tensão interfacial pode também ser medida, calculada e interpretada em termos de estabilidade da emulsão do tipo A/O/A (GARTI, 1997a,b; KANOUNI; ROSANO; NAOULI, 2002; SHIMA et al., 2004b).

#### 1.3.6.1. Distribuição de tamanhos hidrodinâmicos de gotículas oleosas

A distribuição de tamanhos hidrodinâmicos das gotículas oleosas, ou índice de polidispersão, é um dos parâmetros mais importantes de uma emulsão, uma vez que irá influenciar a reologia, estabilidade, cor e sabor da emulsão (BOYD; PARKINSON; SHERMAN, 1972; DANNER; SCHUBERT, 2001; PAL, 2011; TADROS, 2013). A distribuição de tamanhos hidrodinâmicos das gotículas oleosas é geralmente medida por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS) (técnica analítica que pode ser utilizada para determinar o perfil da distribuição de tamanhos de pequenas partículas em suspensão ou polímeros em solução, produzindo resultados tais como tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial Zeta da emulsão), e por (crio)-microscopia eletrônica de varredura (permitindo observar características morfológicas e de distribuição de tamanhos das gotículas oleosas) (BALCÃO et al., 2013, 2014, 2015). Quando se utiliza a dispersão dinâmica de luz laser (também conhecida como espectroscopia de correlação fotônica ou dispersão quasi-elástica de luz) para analisar uma emulsão do tipo A/O/A, existe uma discrepância entre o índice da fase aquosa interna e as gotículas oleosas, em adição à discrepância entre as gotículas oleosas e a fase aquosa externa. A estrutura e dinâmica no interior das gotículas oleosas complica a interpretação

da dispersão de luz laser; os resultados são obtidos com base no pressuposto de que a fase interna de água não altera de forma significativa o índice de refração das gotículas oleosas (DICKINSON et al., 1994; WANG; TAO; GANG, 2006).

### 1.3.6.2. Eficiência de encapsulamento

Quando se caracteriza o sucesso de uma emulsão do tipo A/O/A, o parâmetro mais importante é a eficiência de encapsulamento (EE) (OWUSU; ZHU; DICKINSON, 1992; KOBERSTEIN-HAJDA; DICKINSON, 1996; MENG et al., 2004; SU; FLANAGAN; SINGH, 2008; MUN et al., 2013; SCHUCH et al., 2013). EE é a fração em volume (% v/v) da fase aquosa da emulsão primária A/O, ou a entidade bioativa, que é retida como fase aquosa interna na emulsão do tipo A/O/A final (LEAL-CALDERON et al., 2012). Este parâmetro pode ser determinado medindo a liberação para a fase aquosa externa (contínua) da emulsão do tipo A/O/A, de um marcador insolúvel em óleo presente na fase aquosa dispersa da emulsão primária A/O (DICKINSON; GALAZKA; ANDERSON, 1991a,b; OWUSU; ZHU; DICKINSON, 1992). O valor de EE pode então ser calculado pela Equação (1):

$$EE (\%) = \left\{ 1 - \frac{C^* \times V^*}{C_w \times V_w} \right\} \times 100 \quad (1)$$

onde  $C^*$  é a concentração do marcador ou entidade bioativa na fase aquosa externa da emulsão do tipo A/O/A,  $V^*$  é o volume da fase aquosa externa da emulsão do tipo A/O/A,  $C_w$  é o valor conhecido da concentração da solução de marcador ou entidade bioativa inicialmente encapsulada, e  $V_w$  é o volume da fase aquosa interna da emulsão primária A/O. Um valor (ideal) de EE de 100% iria corresponder a uma situação na qual toda a fase aquosa interna e entidade bioativa aprisionada na emulsão primária A/O original permaneceram intactas durante a subsequente etapa de emulsificação (secundária) e armazenamento. No entanto, o valor real de EE é afetado pela severidade do processo de emulsificação secundária. Na prática, uma vez que a emulsão primária A/O se decompõe até certo ponto sob a influência das forças hidrodinâmicas envolvidas na segunda fase de emulsificação, o objetivo é o de minimizar (tanto quanto possível) a extensão de tal decomposição (DICKINSON; McCLEMENTS, 1996). Uma vez produzidas as emulsões do tipo A/O/A, a alteração dos valores de EE pode ser correlacionada com a estabilidade da emulsão do tipo (MUN et al., 2013).

### 1.3.7. Cinética da liberação de entidades solúveis em água aprisionadas no núcleo aquoso (interno) de uma emulsão do tipo A/O/A

A utilização de proteínas anfifílicas (tais como BSA e caseína) juntamente com emulsificantes monoméricos, tem sido associada a uma melhor estabilidade e propriedades de liberação lenta de emulsões do tipo A/O/A. Resultados cinéticos publicados por vários pesquisadores demonstraram claramente o papel da BSA como emulsificante tanto interno como externo (GARTI; ASERIN, 1996a,b), tendo sido sugeridos mecanismos controlados por difusão para a liberação na presença de macromoléculas anfifílicas. Entidades solúveis em água, aprisionadas, parecem ser liberadas através de micelas inversas que são formados na fase oleosa (principalmente pelos emulsificantes monoméricos) e cuja taxa é controlada por difusão (GARTI; ASERIN, 1996a,b; GARTI; BISPERINK, 1998). Esses mesmos autores também relataram que o *lag-time* e as taxas de liberação podem ser modificadas por adição de quantidades variáveis de emulsificantes monoméricos. Estudos sobre a liberação de entidades bioativas aprisionadas no núcleo aquoso interno, usando reometria e condutivimetria, mostraram que podem existir em simultâneo dois mecanismos de liberação: (i) colapso da membrana oleosa seguido de expulsão da entidade aprisionada, e (ii) difusão da entidade aprisionada através da membrana oleosa (RAYNAL et al., 1993; JAGER-LEZER et al., 1997; GEIGER et al., 1998; SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012).

### 1.3.8. Potenciais aplicações práticas das emulsões do tipo A/O/A

Emulsões do tipo A/O/A são sistemas vesiculares complexos que têm o potencial para serem usadas de muitas formas. Conforme amplamente mencionado anteriormente, as emulsões do tipo A/O/A são constituídas por pequenas gotas oleosas (fase intermediária) dispersas em um meio aquoso (fase externa) no interior das quais pequenas gotículas aquosas estão aprisionadas (fase aquosa interna). Estes sistemas protegem as entidades aprisionadas na fase aquosa interna, e podem prolongar a sua liberação para a fase aquosa externa (BALCÃO et al., 2013, 2014, 2015). Por exemplo, entidades proteicas tais como partículas bacteriofágicas (ou simplesmente fágicas) possuem um elevado potencial para descontaminação de águas e de alimentos, assim como para aplicações biofarmacêuticas (GUTIÉRREZ et al., 2008; PUAPERMPOONSIRI; SPENCER; VAN DER WALLE, 2009; CHAN; ABEDON, 2012; BALCÃO et al., 2014, 2015). No entanto, como a maioria das entidades proteicas ou enzimas, as partículas fágicas são frágeis e, portanto, a estabilização é necessária (BALCÃO et al., 2013, 2014, 2015; BALCÃO; VILA, 2015). Uma possibilidade é encapsular essas partículas proteicas em nanobalões lipídicos com núcleo aquoso, de modo a protegê-las da desativação (BALCÃO; VILA, 2015; BALCÃO et al., 2014, 2015). O desenvolvimento de

estratégias que possam permitir a estabilização estrutural e funcional das partículas fágicas via nanoencapsulação em emulsões do tipo A/O/A pode aumentar tanto a sua aplicabilidade em alimentos como a aplicabilidade biofarmacêutica (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; GHOSH, 2011; SRINIVAS et al., 2010; ATUL; MITALI, 2012; SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; BALCÃO et al., 2013, 2014, 2015; BALCÃO; VILA, 2015). Tais nanobalões lipídicos com núcleo aquoso contendo partículas bacteriofágicas estritamente líticas encapsuladas poderiam ser utilizados, com uma clara vantagem: os nanobalões lipídicos com características adesivas poderiam liberar lentamente o seu conteúdo predatório de bactérias, reduzindo assim a necessidade tanto de antibióticos como de desinfetantes químicos, como o tempo de eliminação da infecção. A entrega oral/nasal de moléculas de natureza proteica tem sido identificada como um dos principais desafios da ciência de direcionamento de fármacos (YEO; BAEK; PARK, 2001; GARCÍA-FUENTES; TORRES; ALONSO, 2003; ONUKI; MORISHITA; TAKAYAMA, 2004; REIS et al., 2006a,b; ALMEIDA; SOUTO, 2007; LEE; YUK, 2007; SANJULA et al., 2009; YANG; YUAN; JIN, 2009; ATUL; MITALI, 2012). Cada vez mais, técnicas que visam a total estabilização de entidades proteicas com base em procedimentos de nanoencapsulação têm ganhado impulso (BALCÃO; VILA, 2015). Devido ao fato de serem encapsuladas em ambientes muito limitados, os movimentos moleculares das moléculas de água são alterados devido à sua natureza dipolar, causando seu abrandamento. O confinamento em nanocápsulas (como os nanobalões lipídicos com núcleo aquoso que integram emulsões do tipo A/O/A) tem, portanto, o mesmo efeito que os osmolitos no que diz respeito à alteração da atividade da água. Devido tanto ao aumento da viscosidade (translacional, vibracional e rotacional) como ao confinamento entrópico (aprisionamento físico), as entidades proteicas podem ser totalmente estabilizadas para armazenamento (BALCÃO et al., 2013, 2014, 2015; BALCÃO; VILA, 2015). A extensão da liberação da entidade proteica depende de muitos fatores, tais como a solubilidade na fase oleosa da entidade bioativa aprisionada, a natureza da fase oleosa e a viscoelasticidade da camada de emulsificante adsorvida na fase oleosa (MATSUMOTO; KANG, 1989; DICKINSON; McCLEMENTS, 1996).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Selecionar as condições processuais que permitam a produção de emulsões do tipo A/O/A, estáveis, incorporando nanogotas lipídicas com núcleo aquoso capazes de estabilizarem estruturalmente e funcionalmente entidades proteicas.

### 2.2. Objetivos específicos

Especificamente, o trabalho de pesquisa almejou:

- ④ Desenvolver um planejamento fatorial experimental completo do tipo  $2^3 \times 3^1$  para otimização estatística da composição da emulsão do tipo A/O/A, visando a minimização do tamanho hidrodinâmico de partícula e do índice de polidispersão, e maximização do módulo do potencial Zeta, capaz de efetivar a encapsulação de uma entidade proteica;
- ④ Avaliar as características físico-químicas das emulsões do tipo preparadas de acordo com o planejamento fatorial, durante seis meses de armazenamento a 4 °C e, para a emulsão otimizada, realizar análises de espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análises de difração de raios-X (DRX), análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), e análises por criomicroscopia eletrônica de transmissão (crio-MET);
- ④ Avaliar estatisticamente a estabilidade da formulação otimizada com proteína modelo (colágeno) encapsulada, considerando manutenção do tamanho hidrodinâmico médio de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta, e avaliar a viscosidade e a eficiência de encapsulação.

### 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho de pesquisa foram de grau de pureza farmacêutica ou PA, sem qualquer tipo de purificação adicional. A água utilizada foi purificada num sistema Milli-Q Elga Purelab (Molsheim, França) até uma condutividade final de cerca de  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ . Os solventes utilizados eram todos de grau analítico ou superior. O Softisan100™ (glicerídeos de coco hidrogenados consistindo exclusivamente de ácidos graxos saturados de origem vegetal com tamanhos de cadeia carbonada entre  $\text{C}_{10}$  -  $\text{C}_{18}$ ) foi gentilmente cedido pela Sasol (Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburg, Alemanha). O glicerol (anidro) e o surfactante Tween 80 foram adquiridos à Labsynth (Diadema SP, Brasil). O Kolliphor P188™ (anteriormente Lutrol F68™, ou poloxâmero 188) foi fornecido pela BASF ChemTrade GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). A fosfatidilcolina de soja (lecitina) foi adquirida à Alamar Tecno-Científica Ltda (Diadema SP, Brazil). A proteína utilizada, colágeno (proveniente de gelatina pura em pó, edível), foi adquirida à Gelnex Indústria e Comércio Ltda (Nazário GO, Brasil) sob o nome comercial Dr. Oetker, e foi utilizada sem qualquer tipo de purificação adicional. O ácido clorídrico comercial (HCl a 37%, m/m) foi adquirido à ECIBRA - Reagentes Analíticos (Curitiba PR, Brasil). O Nipagin™ (metilparabeno) foi adquirido à Labsynter - Produtos para laboratório Ltda (Diadema SP, Brasil).

##### 3.1.2. Equipamento analítico

Para a produção das diferentes emulsões do tipo A/O/A utilizou-se nas etapas de homogeneização a alta rotação um homogeneizador UltraTurrax (modelo T25D, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha). O potencial Zeta, o tamanho hidrodinâmico de partícula e o índice de polidispersão das várias emulsões do tipo A/O/A foram determinados num sistema ZetaPALS (modelo NanoBrook 90PlusPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville NY, E.U.A.). Os estudos calorimétricos foram realizados num calorímetro diferencial exploratório (DSC) da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A.). As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.). As análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas num espectrofotômetro FTIR da Agilent (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.). Os difractogramas de

raios-X foram obtidos num difractometro de raios-X (DRX) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão). A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada em um dispositivo NanoSight NS300 da Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, UnitedKingdom) com a temperatura da amostra totalmente programada através do software NTA. As análises por microscopia eletrônica de transmissão (crio-TEM e NS-TEM) foram realizadas num Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) da JEOL (modelo TEM-1400 PLUS, Tokyo, Japão) equipado com uma câmera CCD da Gatan (modelo MultiScan 794 (1k x 1k pixels), Pleasanton CA, E.U.A.) para aquisição digital de imagens.

## 3.2. Procedimentos experimentais

### 3.2.1. Planejamento fatorial experimental para otimização das condições processuais conducentes à preparação de uma emulsão do tipo A/O/A

**Quadro 1.** Planejamento fatorial experimental completo  $2^3 \times 3^1$ , fornecendo os valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada variável.

Variáveis independentes	Níveis		
	Nível inferior	Nível central	Nível superior
	(-1)	(0)	(+1)
Entidade proteica (% m/m)	0,005	0,010	0,015
Lecitina de soja (% m/m)	0,25	0,50	0,75
Poloxâmero 188 (% m/m)	0,50	1,00	1,50
RPM	7500	10000	12500

**Nota:** foi usado como base de cálculo 50 g de emulsão do tipo A/O/A.

**Fonte:** elaboração própria.

Foi desenhado um planejamento fatorial completo do tipo  $2 \times 2 \times 2 \times 3$  ( $2^3 \times 3^1$ , integrando três variáveis, cada uma fixada em dois níveis, e uma quarta variável fixada em três níveis) com triplicata para o nível central (0) para estimar o erro experimental, requerendo assim um total de onze formulações produzindo trinta e três experimentos, o qual foi aplicado para maximizar a eficiência experimental com um mínimo de experimentos. As três variáveis diferentes (concentração de proteína, concentração de lecitina e concentração de poloxâmero 188) a dois níveis cada uma, baixo (-1) e alto

(+1), e a quarta variável (velocidade de homogeneização) a três níveis, baixo (7500 rpm), médio (10000 rpm) e alto (12500 rpm), e a sua influência nas propriedades físico-químicas das emulsões do tipo A/O/A produzidas (MEi) foram devidamente estudadas (Quadro 1).

O planejamento fatorial desenhado e seguido requereu um total de 24 experimentos, em adição aos níveis centrais para as primeiras três variáveis as quais, combinadas com os três níveis de velocidade de agitação, produziu três experimentos adicionais replicados três vezes cada. O número total de experimentos foi, assim, de 33. As variáveis independentes foram a concentração de proteína, concentração de lecitina, concentração de poloxâmero 188 e velocidade de agitação, enquanto as variáveis dependentes estabelecidas sob escrutínio foram o tamanho hidrodinâmico médio de partícula (HS), o potencial Zeta (ZP) e o índice de polidispersão (PI). Para cada variável independente, aos valores baixo, médio e alto dos níveis inferior, central e superior foram atribuídos os sinais (-1), (0) e (+1), respectivamente (ver Quadro 1). Os dados recolhidos através das análises de HS, ZP e PI em DLS (espalhamento dinâmico de luz-laser) foram devidamente analisados utilizando o software estatístico Minitab® (v. 14.12.0, Minitab Inc., State College PA, E.U.A.).

O planejamento fatorial descrito acima permitiu desenhar 11 formulações distintas de emulsões do tipo A/O/A, cuja composição se encontra na Quadro 2, as quais foram depois sujeitas a análises de tamanho hidrodinâmico de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão.

**Quadro 2.** Composição química (% m/m) das 11 formulações de emulsões do tipo A/O/A descritas a partir do planejamento fatorial desenhado.

Componentes da emulsão do tipo A/O/A (MEi)		Formulações produzidas pelo planejamento fatorial experimental (MEi) (% m/m)										
		ME1	ME2	ME3	ME4	ME5	ME6	ME7	ME8	ME9	ME10	ME11
Fase aquosa interna	Tween 80	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
	HCl 0,01 M	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
	Colágeno	0,015	0,015	0,015	0,015	0,005	0,005	0,005	0,005	0,010	0,010	0,010
Fase oleosa	Softisan 100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	Lecitina de Soja	0,250	0,250	0,750	0,750	0,750	0,750	0,250	0,250	0,500	0,500	0,500
	Glicerol	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60
Fase aquosa externa	Poloxâmero 188	0,500	1,500	0,500	1,500	1,500	0,500	1,500	0,500	1,000	1,000	1,000
	Metilparabeno (NipaginTM)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
	Água ultrapura	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp

Fonte: elaboração própria. (Legenda: MEi, emulsão do tipo A/O/A).

### 3.2.2. Preparação de emulsões do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) com entidades proteicas encapsuladas

O processo de preparação das emulsões do tipo A/O/A foi realizado em dois ciclos de homogeneização a alta velocidade, segundo o processo de emulsificação em dois passos (Figura 4a), utilizando um homogeneizador UltraTurrax, em banho-maria numa placa de aquecimento com monitoramento contínuo de temperatura à temperatura constante de 39 °C (Figura 6). Foram produzidas duas emulsões, a emulsão primária ( $A_{in}/O$ ), após o que esta foi emulsionada em outra fase aquosa externa  $A_{ext}$ , formando assim uma emulsão do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A).

**Figura 6.** Configuração experimental utilizada no preparo das emulsões do tipo A/O/A, consistindo num homogeneizador UltraTurrax acoplado a uma placa de aquecimento com banho-maria a 39 °C.

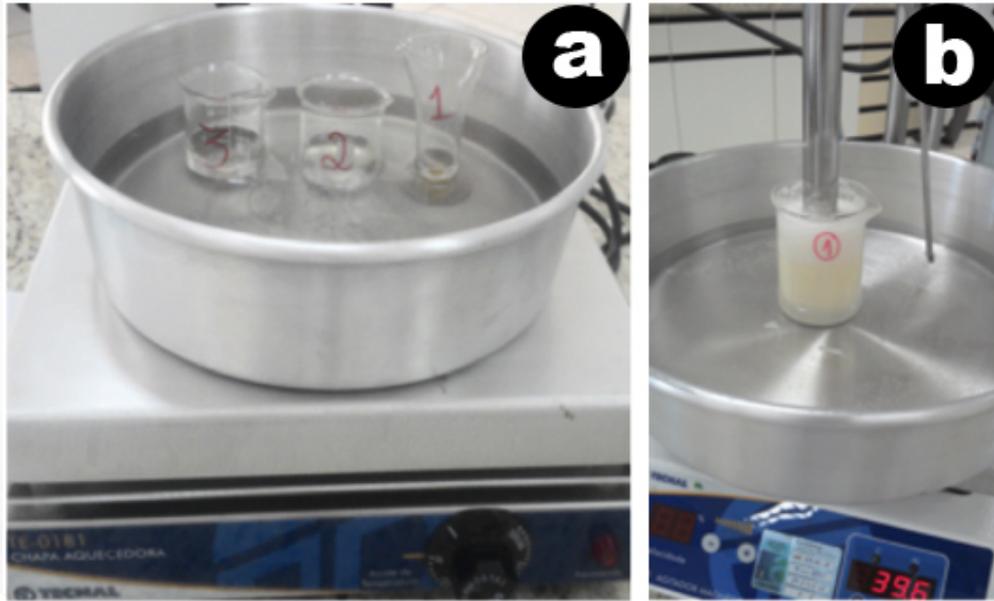


**Fonte:** Elaboração própria.

### 3.2.2.1. Preparação da emulsão primária A/O

Em banho-maria (Figura 7) a uma temperatura de aproximadamente 39 °C ( $\pm 0,5$  °C) fundiu-se o lipídeo (Softisan 100™) e o emulsificante lipofílico (lecitina de soja) num mesmo béquer (Figura 7a1), o glicerol num segundo béquer (Figura 7a2) e a fase aquosa interna num terceiro béquer (Figura 7a3). Depois de completada a fusão do conteúdo do béquer 1 (Figura 7a1) e aquecimento dos demais reagentes (béqueres 2 e 3, Figuras 7a2 e 7a3), adicionou-se o glicerol (Figura 7a2) à fase oleosa (Figura 7a1) seguido da adição de 1 mL da fase aquosa interna (béquer 3, Figura 7a3), e homogeneizou-se com o UltraTurrax (Figura 7b) durante 10 min à velocidade de agitação selecionada (7500, 10000, ou 12500 rpm), mantendo a temperatura 39 °C.

**Figura 7.** Preparação da emulsão primária água-em-óleo (A/O), mostrando a fusão dos componentes da fase oleosa e termostatização da fase aquosa interna (a), e produção da emulsão primária A/O (b).



**Fonte:** Elaboração própria.

### 3.2.2.2. Preparação da emulsão do tipo (A/O)/A

No final do primeiro ciclo de homogeneização (Figura 7b), há a formação de uma emulsão primária do tipo água-em-óleo (A/O). Previamente, no mesmo banho-maria, e num quarto béquer, aqueceu-se metade do volume da fase aquosa externa, contendo o poloxâmico 188 (Quadro 2) e, uma vez terminado o primeiro ciclo de homogeneização, a emulsão primária A/O formada inicialmente foi adicionada lentamente ao conteúdo do quarto béquer seguindo-se novo ciclo de homogeneização durante 10 minutos à mesma temperatura e velocidade de agitação. Terminado o segundo ciclo de homogeneização (Figura 8a), a restante metade da fase aquosa externa (que se encontrava à temperatura ambiente) foi acrescentada lentamente à emulsão total (A/O)/A, mantendo-se uma agitação suave de 100 rpm (ver Figura 8b).

**Figura 8.** Preparação da emulsão do tipo (A/O)/A, mostrando a emulsão no final do segundo ciclo de homogeneização a alta velocidade **(a)**, e a adição dos restantes 50% da fase aquosa externa à temperatura ambiente **(b)**.



**Fonte:** Elaboração própria.

### 3.2.3. Caracterização físico-química das várias emulsões do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) contendo entidades proteicas encapsuladas, produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado

Todas as emulsões do tipo A/O/A recém-produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico através da determinação do tamanho hidrodinâmico de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta, por DLS (espalhamento dinâmico de luz-laser) e da sua viscosidade. Os resultados dessas análises foram depois utilizados para a realização de análise estatística do tipo ANOVA, com vista à determinação da emulsão ótima. Essa emulsão ótima seria depois caracterizada do ponto de vista físico-químico (seção 4.2.5.) através de espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), e crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET).

### 3.2.3.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)

Estas análises permitiram a determinação do tamanho hidrodinâmico médio (HS) das partículas integrantes das emulsões do tipo A/O/A, do índice de polidispersão (PI) e do potencial Zeta (ZP). Para as análises por DLS das várias emulsões recém-produzidas, prepararam-se diluições de amostras das emulsões seguindo indicações do fabricante do equipamento (50  $\mu$ L de emulsão em 20 mL de água ultrapura, isto é, 1:400), homogeneizou-se com a ajuda de uma pipeta Pasteur de plástico, e com a ajuda da mesma pipeta introduziu-se um dado volume da diluição da emulsão na cubeta (cerca de 2/3 do volume da mesma) (eletrodo com a ref. AQ-1284) específica do equipamento ZetaPALS NanoBrook 90PlusPALS para realizar a análise da amostra por DLS (laser operando com uma potência de 40 mW a  $\lambda = 661$  nm) (sempre em triplicata) com determinação do tamanho hidrodinâmico de partícula (HS), potencial Zeta (ZP) e índice de polidispersão (PI). As mesmas emulsões foram também seguidas ao longo de um período de armazenamento prolongado a 4 °C (cerca de 1 ano), em termos da evolução dos mesmos parâmetros, isto é, HS, PI e ZP, para avaliação estatística da estabilidade das mesmas, com amostragens aos 0, 7, 14, 28, 60, 90, 120 e 180 dias, tendo estas determinações sido também realizadas ao fim de 360 dias para verificação da manutenção destes parâmetros.

### 3.2.3.2. Avaliação da viscosidade

As emulsões recém-preparadas foram também avaliadas quanto à sua viscosidade ( $\mu$ ), usando a equação de escoamento de Hagen-Poiseuille. A Lei de Poiseuille (ou Lei de Hagen-Poiseuille, também designada por Gotthilf Heinrich Ludwig Hagen (1797-1884) pelas suas experiências em 1839) é a lei da física relacionada com o fluxo volumétrico laminar em estado estacionário de líquidos viscosos uniformes e incompressíveis (também chamados fluidos Newtonianos) através de um tubo cilíndrico com seção reta circular constante (Figura 9), experimentalmente derivada em 1838, formulada e publicada em 1840 e 1846 por Jean Louis Marie Poiseuille (1797-1869) (SUTERA; SKALAK, 1993) (Figura 9).

Para as determinações de viscosidade das várias emulsões produzidas, mediu-se o tempo de escoamento (s) de 20 mL de emulsão através do dispositivo ilustrado na Figura 9, uma vez medidos os parâmetros nele explicitados. Todas as determinações foram efetuadas em triplicata.

**Figura 9.** Dispositivo utilizado para a determinação da viscosidade das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas, com utilização da equação de escoamento de Hagen-Poiseuille.

$$\mu = K \cdot \rho \cdot t$$

$$\text{em que } K = \frac{g \cdot h \cdot \pi \cdot \phi_2^4}{128 \cdot L \cdot V}$$

$$\mu = \text{viscosidade [kg/s} \cdot \text{m]}$$

$$\rho = \text{densidade [g/cm}^3\text{]}$$

$$t = \text{tempo de escoamento [s]}$$

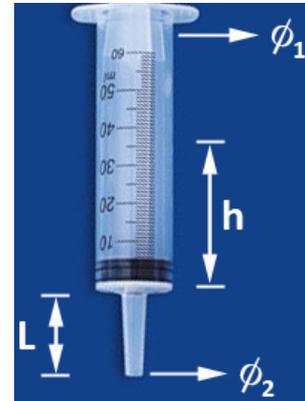
$$g = \text{aceleração da gravidade (9.82) [m} \cdot \text{s}^{-2}\text{]}$$

$$h = \text{altura de líquido na seringa [m]}$$

$$\phi_2 = \text{diâmetro interno do tubo de escoamento [m]}$$

$$L = \text{altura do tubo de escoamento [m]}$$

$$V = \text{volume escoado [m}^3\text{]}$$



**Fonte:** retirado de Balcão; Amorim (2012).

### 3.2.3.3. Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A produzidas

O aspecto macroscópico das 33 emulsões produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado foi também avaliado, de forma visual, quanto à presença de fenômenos de cremação, inversão de fases, aderência às paredes dos tubos Falcon de armazenamento, e ausência de crescimento microbiano.

### 3.2.4. Análise estatística para determinação da emulsão do tipo A/O/A ótima

Após cada emulsão ter sido preparada pela combinação dos 4 fatores (concentração de proteína em 2 níveis, baixo (-1) e alto (+1); concentração de lecitina de soja em 2 níveis, baixo (-1) e alto (+1); concentração de poloxâmico 188 em 2 níveis, baixo (-1) e alto (+1); e velocidade de agitação (RPM) em 3 níveis, baixo (7500 rpm), médio (10000 rpm) e alto (12500 rpm)), foram mensuradas as variáveis HS, PI e ZP, 3 vezes cada, para cada mistura, e tomadas as médias, as quais foram consideradas para a análise estatística dos resultados. A análise estatística realizada foi a análise de variância (ANOVA), a qual permite avaliar quais fatores são significativos para explicar a variação de cada variável dependente (HS, PI e ZP) em função dos três níveis (-1, 0, +1) dos quatro fatores estabelecidos (proteína, lecitina, poloxâmico, RPM). O nível de significância adotado para as análises

foi de 5%, isto é, um fator foi considerado significativo quando o nível descritivo (*p*-value) para esse fator foi menor que 0,05.

### 3.2.5. Caracterização físico-química da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente, com e sem proteína encapsulada

A emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente foi caracterizada do ponto de vista físico-químico através de espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS) para determinação do tamanho hidrodinâmico, potencial Zeta e índice de polidispersão, espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET), viscosidade e pH.

#### 3.2.5.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)

Estas análises permitiram a determinação, para a emulsão otimizada estatisticamente, do tamanho hidrodinâmico (HS) médio de partícula, do índice de polidispersão (PI) e do potencial Zeta (ZP). Para as análises da emulsão ótima por DLS, prepararam-se diluições de amostras da emulsão do tipo A/O/A seguindo indicações do fabricante do equipamento (50 µL de emulsão em 20 mL de água ultrapura), homogeneizou-se com a ajuda de uma pipeta Pasteur de plástico, e com a ajuda da mesma pipeta introduziu-se um dado volume da diluição da emulsão na cubeta (2/3 da capacidade da cubeta) (ref. AQ-1284) específica do equipamento ZetaPALS NanoBrook 90PlusPALS para realizar a análise da amostra por DLS (sempre em triplicata) com determinação do tamanho hidrodinâmico de partícula (HS), potencial Zeta (ZP) e índice de polidispersão (PI).

#### 3.2.5.2. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho, tanto da proteína pura como de amostras da emulsão otimizada estatisticamente contendo proteína encapsulada, e de amostras da emulsão otimizada estatisticamente sem proteína encapsulada (emulsão-controle), foram obtidos em estado líquido num espectrofotômetro FTIR da Agilent (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.) na gama de números de onda de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e usando apodização de Happ-Genzel. Um espectro de

infravermelho não é mais do que a combinação das transformadas de Fourier para todos os números de onda considerados. Qualquer pico característico de uma dada amostra é representado pelo pico de maior intensidade, sendo a restante ondulação considerada ruído. Este ruído, para não ser identificado como pico, pode ser diminuído por vários processos. A apodização é um deles, e consiste em fazer decair suavemente a intensidade do interferograma para zero nas extremidades do pico principal, por aplicação de uma função matemática ao interferograma, antes da Transformada de Fourier. A apodização de Happ-Genzel é considerada a melhor escolha para a maioria das aplicações, pois suprime melhor as “réplicas” laterais e com menor redução da resolução.

### 3.2.5.3. Análises por difração de raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X da entidade proteica, de amostras da emulsão otimizada estatisticamente contendo proteína encapsulada, e de amostras da emulsão otimizada estatisticamente sem proteína encapsulada (emulsão-controle), foram obtidos num difractómetro de raios-X (DRX) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão) usando radiação de raios-X filtrada através de alvo de Cu. As varreduras de raios-X foram realizadas a ângulos de difração de 2-Theta (de 5° a 90°, com incrementos de 0,02 graus e velocidade de 2°.min<sup>-1</sup>), com voltagem de 40 kV, intensidade de corrente elétrica de 30 mA, e potência de raios-X de 3 kW.

### 3.2.5.4. Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA)

Os nanobalões lipídicos integrantes da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente, com entidade proteica encapsulada, foram também analisados por rastreamento de nanopartículas através de um dispositivo NanoSight NS300 da Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Reino Unido), com a temperatura da amostra totalmente programada através do software de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). O sistema de análise consistiu em um feixe de laser de luz UV com comprimento de onda de 405 nm e uma câmara de alta resolução sCMOS, para efetuar as análises de rastreamento de nanopartículas.

### 3.2.5.5. Análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A caracterização termogravimétrica das emulsões otimizadas estatisticamente, com e sem entidade proteica encapsulada, foi realizada através de análises termogravimétricas (TGA), enquanto as análises térmicas foram realizadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC). As análises de TGA foram efetuadas num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.), utilizando cadinhos de alumínio para conter as amostras da emulsão sob atmosfera inerte (árgon). Para as análises, as amostras foram aquecidas desde cerca de 20 °C até 500 °C e os resultados (perda de peso) foram recolhidos a cada 2 segundos.

Para as análises por DSC utilizou-se um microcalorímetro exploratório diferencial também da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A.). Para cada ensaio microcalorimétrico (DSC) pesaram-se aproximadamente 15-18 mg de emulsão (com o auxílio de uma seringa microlitro da Hamilton) diretamente para o interior de cadinhos de alumínio de alta pressão, os quais foram devidamente selados por pressão. Um cadinho de alumínio de referência foi também preparado por simples vedação de ar. As amostras foram então sujeitas a aquecimento com um aumento linear de temperatura de 20 °C a 250 °C, a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C min<sup>-1</sup>, sob uma atmosfera inerte de árgon mantida com um fluxo constante de 50 mL min<sup>-1</sup>, durante o qual a quantidade de calor absorvido pelas amostras de emulsão foi registrada a cada 0,2 segundos.

### 3.2.5.6. Determinação da eficiência de encapsulação da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente

Preparou-se uma solução-mãe de colágeno em água ultrapura com uma concentração de 1 mg/mL, e a partir desta solução preparam-se em balões volumétricos de 10,00 mL soluções-padrão de calibração com concentrações de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg/mL. Leu-se em seguida a absorvância das várias soluções padrão ao comprimento de onda  $\lambda = 280$  nm, usando como branco água ultrapura, produzindo a curva de calibração para a concentração de proteína na forma  $Abs_{280nm} = 0,8954 \pm C_{proteína} + 0,0123$  ( $r^2 = 0,99786$ ).

A equação da curva de calibração mencionada acima foi então utilizada para calcular a concentração de proteína no sobrenadante da emulsão do tipo A/O/A ótima com proteína encapsulada (ME25 ou código ME03/12500rpm) e no sobrenadante da emulsão do tipo A/O/A ótima sem proteína encapsulada (ME-controle) após centrifugação a 12500 rpm durante 10 min a 4 °C. Para estas determinações, alíquotas de 2 mL das emulsões do tipo A/O/A foram introduzidas em tubos

Eppendorf, em quintuplicatas, e centrifugadas a 12500 rpm durante 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, 1000 µL do sobrenadante foram cuidadosamente recolhidos com uma micropipeta Gilson, diluídos a 50,00 mL com água ultrapura em balão volumétrico, e a absorvância lida a 280 nm usando cubetas de quartzo. Como branco para as determinações, usou-se água ultrapura. A eficiência de encapsulação (EE, %) foi então determinada utilizando a equação (2).

$$EE (\%) = \frac{i-s}{i} \times 100 \quad (2)$$

onde *i* é a quantidade de proteína (colágeno) oferecida inicialmente para preparar a emulsão do tipo A/O/A e *s* é a quantidade de proteína no sobrenadante da emulsão após a centrifugação.

### 3.2.5.7. Análises micro-estruturais e morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O preparo das grades de carbono foi feito tanto com amostras não diluídas da emulsão otimizada estatisticamente, como com diluições 1:5 em água ultrapura, buscando melhor observação das estruturas.

Para realização da coloração negativa das amostras (*Negative Staining*), estas foram preparadas em grades de cobre com 3 mm de diâmetro (*Ultrathin carbon on a Lacey Carbon Type A 400 mesh copper grid*, Ted Pella Inc., Redding CA, E.U.A.), as quais foram previamente submetidas ao procedimento de *Glow Discharge* em um equipamento *easiGlow* da PELCO (Redding CA, E.U.A.), com os seguintes parâmetros: corrente de 15 mA, carga negativa, 25 segundos de descarga. Este procedimento visou dotar as grades de cobre (hidrofóbico por natureza) com carga superficial negativa, por forma a promover a aderência e espalhamento da amostra na sua superfície.

A coloração das amostras foi realizada aplicando-se 3 µL de solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/m) na grade de cobre contendo a amostra, e deixando secar ao ar. Após 30 segundos, removeu-se a solução de acetato de uranila com papel de filtro convencional.

As análises foram então realizadas num microscópio eletrônico de transmissão (MET) da JEOL (modelo TEM-1400 PLUS, JEOL, Tokyo, Japão), equipado com filamento de hexaboreto de lantânio (LaB<sub>6</sub>), operando a 120kV; o microscópio estava ainda equipado com uma câmera CCD da GATAN INC. (modelo MultiScan 794, Pleasanton CA, E.U.A.) com uma resolução de 1k x 1k pixels para a aquisição digital de imagens. Para análise dos resultados (imagens e medidas) utilizou-se o software Digital Micrograph (Gatan Inc., Pleasanton CA, E.U.A.).

### 3.2.6. Análise estatística dos parâmetros HS, ZP e PI ao longo de um período de armazenamento prolongado a 4 °C, para inferência da estabilidade das várias emulsões do tipo A/O/A.

As análises estatísticas empregadas foram a análise de variância (ANOVA), a qual permite avaliar quais fatores são significativos para explicar a variação de cada variável dependente (HS, ZP e HI), e o teste de Tukey. O nível de significância adotado para as análises ANOVA foi de 5%, isto é, um fator foi considerado significativo quando o nível descritivo (*p*-value) para tal fator foi menor que 0,05. O teste de Tukey, baseado na amplitude total estudentizada (“*studentized range*”) pode ser utilizado para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos, sendo um teste exato e de uso muito simples quando o número de repetições é o mesmo para todos os tratamentos.

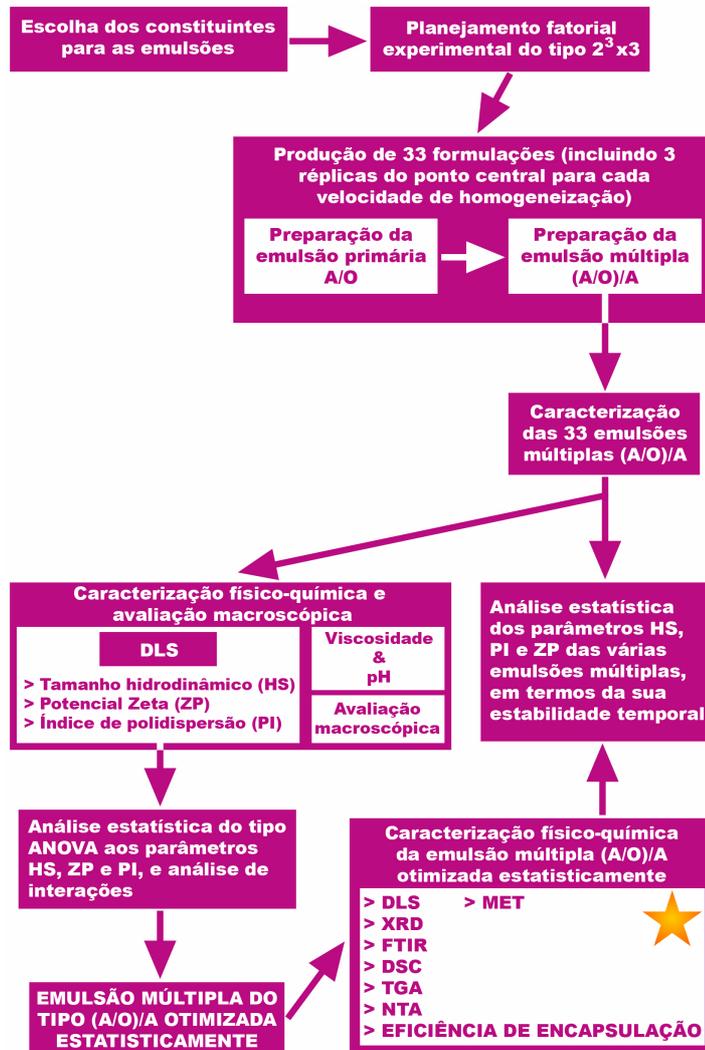
As medidas das variáveis HS, ZP e PI foram repetidas em triplicata ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, isto é, foram efetuadas medidas desses parâmetros ao fim de 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 180 e 360 dias. Desses valores, apenas as médias (n=3) daqueles relativos aos primeiros seis meses de armazenamento foram tomadas para as análises estatísticas.

Ao identificar a existência de diferença significativa entre o conjunto de dados analisados, utilizou-se o teste de Tukey que permite detalhar e avaliar essa diferença, sendo possível identificar quais médias são ou não estatisticamente diferentes entre os grupos. Comparou-se a emulsão considerada ótima (e por isso selecionada) com todas as outras emulsões.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de pesquisa aqui apresentado objetivou a otimização estatística das condições processuais conducentes a uma emulsão ótima do tipo A/O/A, para encapsulação de entidades proteicas com concomitante estabilização estrutural e funcional. Neste sentido, o trabalho de pesquisa desenvolvido exigiu a realização de diversas etapas sequenciais tanto para o planejamento fatorial experimental com vista à determinação das condições processuais ótimas, como para a caracterização da emulsão ótima produzida e avaliação da sua estabilidade temporal ao longo de um período alargado de armazenamento. A Figura 10 apresenta resumidamente as etapas envolvidas neste trabalho de pesquisa.

**Figura 10.** Diagrama de seqüências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.



Fonte: elaboração própria.

#### **4.1. Otimização estatística das condições processuais conducentes a uma emulsão ótima do tipo A/O/A**

A produção de uma emulsão do tipo A/O/A, possuindo nanobalões lipídicos com núcleo aquoso, distribuídas uniformemente em termos de tamanho hidrodinâmico na emulsão (ou seja, com um baixo índice de polidispersividade), e com um valor suficientemente negativo de potencial Zeta para assegurar que não ocorra coalescência das nanobalões lipídicos, foi conseguida através de um desenho fatorial estatístico completo do tipo  $2^3 \times 3^1$  que permitiu definir como condições processuais ótimas uma concentração de surfactante lipófilo e de proteína em níveis superiores, uma concentração de poloxâmero em nível inferior e uma velocidade de homogeneização em nível superior, para um menor índice de polidispersividade e valores negativos para potencial Zeta. O design fatorial  $2^3 \times 3^1$  construído levou assim à otimização dos níveis alto (+1) e baixo (-1), com testes em triplicata para o nível central (0), produzindo trinta e três formulações e levando à seleção dos parâmetros processuais otimizados como sendo 0,015% (m/m) de entidade proteica, 0,75% (m/m) de emulsificante lipofílico (lecitina de soja) e 0,50% (m/m) de emulsificante hidrofílico (poloxâmero 188).

Embora a energia mecânica de agitação seja importante para a produção da dispersão, ela não é por si só suficiente para estabilizar o sistema coloidal, uma vez que a agitação mecânica só supera a barreira de tensão superficial durante o processo de homogeneização. Sendo assim, a forma mais fácil de estabilizar o sistema coloidal consiste em reduzir essa tensão superficial por forma a diminuir a energia resultante da expansão da área superficial total (OLIVEIRA et al., 2004). Assim, além de testar vários níveis de agitação em alta velocidade, testaram-se também diferentes níveis dos tensoativos nas fases oleosa e aquosa externa, pois eles desempenham um papel importante na estabilização de emulsões. Os emulsionantes devem proporcionar um valor ótimo ponderado para o HLB da emulsão do tipo A/O/A (SCHMIDTS et al., 2009), proporcionando assim a estabilização das interfaces do sistema. A escolha correta de ambos os emulsionantes (lipofílico e hidrofílico) afetará diretamente a formação das gotículas lipídicas. Para este efeito, a lecitina de soja foi o emulsionante lipofílico selecionado, com um valor de HLB de 4, e o poloxâmero 188 (Kolliphor™ P188) foi selecionado como emulsionante hidrofílico, com um valor de HLB de 29 (HIPPALGAONKAR et al., 2013). No entanto, a maioria dos tensoativos não consegue reduzir a tensão interfacial para níveis suficientes com vista a neutralizar toda a energia livre de superfície formada pelo tremendo aumento da área superficial durante a homogeneização e, assim, emulsões (e, particularmente, emulsões do tipo A/O/A) são geralmente considerados sistemas termodinamicamente instáveis (PIANOVSKI et al., 2008; SCHMIDTS et al., 2009; BALCÃO et al., 2010, 2014, 2015). As principais particularidades de emulsões nanométricas (com tamanhos de gotículas sub-micrométricas), tornando-as principais candidatas para aplicações biofarmacêuticas, são a sua maior estabilidade de gotículas em suspensão, uma estabilidade cinética que dura meses (em acordo claro com os resultados produzidos no presente

trabalho de pesquisa), e a estabilidade contra a diluição, ou mesmo contra mudanças de temperatura, totalmente ao contrário do que acontece com as microemulsões (termodinamicamente instáveis) (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). Emulsões são sistemas geralmente termodinamicamente instáveis, devido à variação positiva a energia livre de formação da emulsão ( $\Delta G_f > 0$ ). Na formulação matemática da segunda lei da termodinâmica (Equação (3)) o termo positivo de valor elevado, energia interfacial ( $\lambda \times \Delta A$ ), supera a entropia de formação das gotículas ( $\Delta S_f$ ), também positivo.

$$\Delta G_f = \lambda \times \Delta A - T \times \Delta S_f \quad (3)$$

Na equação (3) supramencionada,  $\lambda$  representa a tensão superficial,  $\Delta A$  representa o aumento de área de superfície obtida com a emulsificação, e  $T$  representa a temperatura. A desestabilização física das emulsões está, portanto, relacionada com a tendência espontânea em direção a um mínimo de área interfacial entre as duas fases imiscíveis, o que pode ser contrabalanceado através da produção de valores adequados de potencial Zeta (ou muito negativos ou muito positivos). Isto foi conseguido, de fato, no presente trabalho de pesquisa, como se poderá ver nas seções seguintes.

## **4.2. Caracterização físico-química das várias emulsões do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) contendo entidades proteicas encapsuladas, produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado**

### **4.2.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)**

As análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS), realizadas às 33 emulsões produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado permitiram determinar o tamanho hidrodinâmico (HS) a partícula, o índice de polidispersão (PI) e o potencial Zeta (ZP) das partículas integrantes das várias formulações. A importância em se determinar o potencial Zeta reside na possibilidade de se poder prever a estabilidade coloidal das emulsões produzidas. A previsão da estabilidade coloidal depende da interação entre partículas em suspensão, e assim, o potencial Zeta é uma tentativa para quantificar tais interações. O potencial Zeta é uma medida das forças repulsivas entre partículas e, uma vez que a maior parte dos sistemas coloidais aquosos é estabilizada por repulsão eletrostática, quanto maiores forem as forças repulsivas entre as partículas menor será a probabilidade delas se aproximarem e formarem um agregado, pelo que mais estável será o sistema coloidal (BUSZEWSKI; BOCIAN; DZIUBAKIEWICZ, 2010; SCHULTZ et al., 2008). Cada

partícula dispersa numa suspensão está rodeada de íons de carga oposta. Esta camada de íons é chamada de camada fixa. Externamente à camada fixa, existem composições variadas de íons de polaridades opostas, formando uma espécie de nuvem. Esta área é denominada de camada dupla difusa, e toda esta área é neutra. Quando uma carga elétrica é aplicada à solução em que as partículas estão dispersas, estas são atraídas para o eletrodo de polaridade oposta, acompanhadas pela camada fixa e parte da camada dupla difusa. O potencial Zeta é considerado como sendo o potencial elétrico da camada fixa, em que, à medida que o potencial Zeta se aproxima de zero, as partículas tendem a se agregar (BUSZEWSKI; BOCIAN; DZIUBAKIEWICZ, 2010; SCHULTZ et al., 2008). Quando se aplica um campo elétrico à dispersão de partículas, estas se movem. Esta mobilidade pode ser definida como a velocidade de uma partícula por unidade de campo elétrico, e é determinada com a aplicação do campo elétrico e medindo a sua velocidade média. O tamanho hidrodinâmico médio de partícula e a distribuição de tamanhos (índice de polidispersão) foram determinados por DLS, como referido (metodologia adequada para partículas cujo tamanho esteja compreendido entre 5 nm a cerca de 3  $\mu\text{m}$ ). Através da detecção de luz laser dispersa por partículas em suspensão, a velocidade do movimento Browniano é usada para calcular o(s) tamanho(s) de partícula(s).

Os resultados obtidos para HS, PI e ZP permitiram, após análise estatística de variância (ANOVA) para cada variável, a escolha da melhor formulação produzida. No Quadro 3 podem ser encontrados os resultados obtidos para as variáveis HS, PI e ZP (médias de três replicatas e desvios padrão associados) nas análises realizadas às várias emulsões recém-preparadas de acordo com o planejamento fatorial.

**Quadro 3.** Valores de resposta (HS, PI e ZP, média (n=3)  $\pm \sigma$ ) dos três fatores explicitados no Quadro 1, para as onze formulações produzidas (emulsões do tipo A/O/A, ME<sub>i</sub>) de acordo com o planejamento fatorial (três variáveis (proteína, PROT; lecitina, LEC; poloxâmero 188, P188) em dois níveis, inferior e superior, com triplicata para o nível central, e uma variável em três níveis).

ME <sub>i</sub>	PROT	LEC	P188	HS $\pm \sigma$ (nm)			PI $\pm \sigma$			PZ $\pm \sigma$ (mV)		
	(% , m/m)			7500 rpm	10000 rpm	12500 rpm	7500 rpm	10000 rpm	12500 rpm	7500 rpm	10000 rpm	12500 rpm
ME01	0,015	0,25	0,50	237,58 $\pm 2,33$	210,47 $\pm 1,37$	140,72 $\pm 2,83$	0,236 $\pm$ 0,010	0,257 $\pm$ 0,014	0,244 $\pm$ 0,021	-32,87 $\pm 0,86$	-30,67 $\pm 1,72$	-28,23 $\pm 4,18$
ME02	0,015	0,25	1,50	234,49 $\pm 1,20$	178,18 $\pm 6,56$	167,39 $\pm 1,95$	0,228 $\pm$ 0,022	0,246 $\pm$ 0,029	0,256 $\pm$ 0,004	-32,59 $\pm 0,99$	-26,34 $\pm 1,05$	-28,25 $\pm 0,62$
<b>ME03</b>	<b>0,015</b>	<b>0,75</b>	<b>0,50</b>	225,77 $\pm 3,59$	195,87 $\pm 2,36$	<b>186,20</b> <b><math>\pm 2,62</math></b>	0,259 $\pm$ 0,011	0,211 $\pm$ 0,012	<b>0,206 <math>\pm</math></b> <b>0,014</b>	-35,54 $\pm 1,09$	-25,68 $\pm 2,45$	<b>-36,45</b> <b><math>\pm 0,93</math></b>
ME04	0,015	0,75	1,50	244,59 $\pm 5,23$	253,49 $\pm 3,28$	219,53 $\pm 3,35$	0,248 $\pm$ 0,009	0,241 $\pm$ 0,015	0,215 $\pm$ 0,022	-38,36 $\pm 0,62$	-26,41 $\pm 0,64$	-32,87 $\pm 0,51$
ME05	0,005	0,75	1,50	279,85 $\pm 2,66$	237,07 $\pm 22,16$	197,92 $\pm 4,28$	0,280 $\pm$ 0,007	0,289 $\pm$ 0,015	0,236 $\pm$ 0,006	-34,20 $\pm 0,05$	-28,81 $\pm 2,68$	-32,47 $\pm 1,27$
ME06	0,005	0,75	0,50	220,31 $\pm 2,88$	201,13 $\pm 5,11$	212,90 $\pm 1,39$	0,251 $\pm$ 0,019	0,241 $\pm$ 0,020	0,221 $\pm$ 0,013	-34,08 $\pm 0,53$	-32,40 $\pm 0,74$	-34,45 $\pm 2,14$
ME07	0,005	0,25	1,50	244,31 $\pm 1,55$	201,69 $\pm 0,80$	178,71 $\pm 2,59$	0,216 $\pm$ 0,026	0,239 $\pm$ 0,009	0,262 $\pm$ 0,004	-34,39 $\pm 1,05$	-35,07 $\pm 0,84$	-24,17 $\pm 9,61$
ME08	0,005	0,25	0,50	193,92 $\pm 1,67$	163,53 $\pm 1,54$	149,59 $\pm 2,32$	0,218 $\pm$ 0,018	0,218 $\pm$ 0,014	0,231 $\pm$ 0,022	-36,74 $\pm 1,01$	-28,89 $\pm 3,60$	-32,13 $\pm 1,12$
ME09	0,010	0,50	1,00	221,41 $\pm 2,50$	189,11 $\pm 4,08$	184,61 $\pm 1,46$	0,220 $\pm$ 0,005	0,248 $\pm$ 0,029	0,232 $\pm$ 0,012	-31,51 $\pm 0,71$	-31,39 $\pm 0,90$	-35,34 $\pm 0,37$
ME10	0,010	0,50	1,00	219,30 $\pm 1,55$	221,60 $\pm 0,90$	183,29 $\pm 6,96$	0,257 $\pm$ 0,013	0,244 $\pm$ 0,020	0,242 $\pm$ 0,010	-36,14 $\pm 1,56$	-32,79 $\pm 0,68$	-33,68 $\pm 4,25$
ME11	0,010	0,50	1,00	233,54 $\pm 4,80$	179,26 $\pm 1,99$	172,11 $\pm 2,28$	0,245 $\pm$ 0,012	0,245 $\pm$ 0,009	0,211 $\pm$ 0,008	-36,49 $\pm 0,66$	-29,61 $\pm 1,36$	-33,72 $\pm 1,80$

**Fonte:** elaboração própria. (**Legenda:** ME, emulsão múltipla (do tipo A/O/A); HS, tamanho hidrodinâmico de partícula; PZ, potencial Zeta; PI, índice de polidispersão; PROT, proteína; LEC, lecitina; P188, poloxâmero 188;  $\sigma$ , desvio padrão). A emulsão otimizada encontra-se destacada em negrito.

#### 4.2.2. Avaliação da viscosidade e do pH das várias emulsões do tipo A/O/A

Em especial para aplicações (bio)farmacêuticas, formulações com baixa viscosidade são importantes para permitir uma boa dissolução em água, para que a formulação possa ser convenientemente carregada. No Quadro 4 apresentam-se os valores obtidos para a viscosidade das várias emulsões formuladas de acordo com o planejamento fatorial desenhado.

**Quadro 4.** Valores de viscosidade média (n=3) e pH e desvios-padrão associados, obtidos para as diferentes emulsões produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado.

(ME <sub>i</sub> )	Viscosidade (μ) (média (n=3) ± σ) (kg/(s*m))			pH (média (n=3) ± σ)		
	7500 rpm	10000 rpm	12500 rpm	7500 rpm	10000 rpm	12500 rpm
ME01	(5,32 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(7,67 ± 0,04) x 10 <sup>-3</sup>	(6,18 ± 0,07) x 10 <sup>-3</sup>	5,93 ± 0,07	4,09 ± 0,14	3,93 ± 0,13
ME02	(5,60 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(5,05 ± 0,10) x 10 <sup>-3</sup>	(5,18 ± 0,02) x 10 <sup>-3</sup>	5,93 ± 0,02	5,88 ± 0,16	5,52 ± 0,22
ME03	(5,12 ± 0,04) x 10 <sup>-3</sup>	(5,28 ± 0,01) x 10 <sup>-3</sup>	<b>(4,77 ± 0,06) x 10<sup>-3</sup></b>	6,10 ± 0,06	5,97 ± 0,15	<b>5,78 ± 0,13</b>
ME04	(4,83 ± 0,02) x 10 <sup>-3</sup>	(5,22 ± 0,09) x 10 <sup>-3</sup>	(5,21 ± 0,01) x 10 <sup>-3</sup>	6,01 ± 0,04	5,92 ± 0,01	6,30 ± 0,14
ME05	(5,03 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(5,66 ± 0,02) x 10 <sup>-3</sup>	(5,50 ± 0,06) x 10 <sup>-3</sup>	6,03 ± 0,02	6,00 ± 0,01	5,57 ± 0,03
ME06	(4,83 ± 0,06) x 10 <sup>-3</sup>	(5,01 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(5,77 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	6,22 ± 0,13	6,03 ± 0,02	6,21 ± 0,03
ME07	(4,94 ± 0,07) x 10 <sup>-3</sup>	(5,34 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(5,52 ± 0,01) x 10 <sup>-3</sup>	5,76 ± 0,07	5,70 ± 0,03	5,64 ± 0,12
ME08	(5,35 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(4,98 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(4,72 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	4,97 ± 0,06	5,75 ± 0,03	4,30 ± 0,04
ME09	(5,03 ± 0,02) x 10 <sup>-3</sup>	(4,50 ± 0,05) x 10 <sup>-3</sup>	(5,64 ± 0,02) x 10 <sup>-3</sup>	6,02 ± 0,03	5,97 ± 0,02	6,24 ± 0,14
ME10	(5,19 ± 0,08) x 10 <sup>-3</sup>	(4,73 ± 0,06) x 10 <sup>-3</sup>	(5,45 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	5,95 ± 0,03	5,97 ± 0,02	5,94 ± 0,02
ME11	(5,31 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(4,88 ± 0,02) x 10 <sup>-3</sup>	(5,17 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	5,99 ± 0,02	5,63 ± 0,04	6,01 ± 0,02
ME controle	(5,01 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(4,93 ± 0,03) x 10 <sup>-3</sup>	(5,32 ± 0,02) x 10 <sup>-3</sup>	5,86 ± 0,04	5,91 ± 0,06	6,02 ± 0,08

**Fonte:** elaboração própria. (**Legenda:** ME<sub>i</sub>, emulsão múltipla (do tipo A/O/A); σ, desvio padrão).

As propriedades físicas de formulações farmacêuticas podem ter um efeito nas taxas de nebulização e tamanho de partículas. A viscosidade, força iônica, osmolaridade, pH e tensão superficial podem impedir a nebulização de algumas formulações. Se o pH for muito baixo, ou se a solução for hiper- ou hipo-osmolar, o aerosol pode induzir broncoconstrição, tosse e irritação da mucosa pulmonar (ESCHENBACHER; BOUSHEY; SHEPPARD, 1984; WEBER et al., 1997; LABIRIS; DOLOVICH, 2003). Como pode ser verificado por inspeção dos resultados exibidos no Quadro 4, a emulsão considerada ótima (ME<sub>3</sub>) correspondeu à mais baixa viscosidade a um valor de pH próximo de 6. Estas são características de suma importância para administração de uma dada formulação por aerossolização.

#### 4.2.3. Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A

Após a preparação de cada formulação, avaliou-se, em primeiro lugar, o seu aspecto macroscópico. Esta análise é importante já que permite identificar fenômenos de coalescência, floculação e/ou cremação característicos de nanoemulsões com pouca estabilidade (SCHULLER;

ROMANOWSKY, 1998). A detecção de qualquer um destes fenômenos levaria a rejeição da nanoemulsão em questão, assumindo-se que teria aumentado a instabilidade do sistema nanométrico.

Não foram detectados quaisquer fenômenos de instabilidade das nanoemulsões recém-produzidas de acordo com o planejamento fatorial, tendo estas apresentado sempre um aspecto leitoso e uniforme. Independentemente dos seus parâmetros processuais, as emulsões apresentaram-se bastante fluidas, translúcidas e sem qualquer aderência visível às paredes dos tubos Falcon onde foram armazenadas (Figura 11).

**Figura 11.** Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A recém-produzidas.



**Fonte:** elaboração própria.

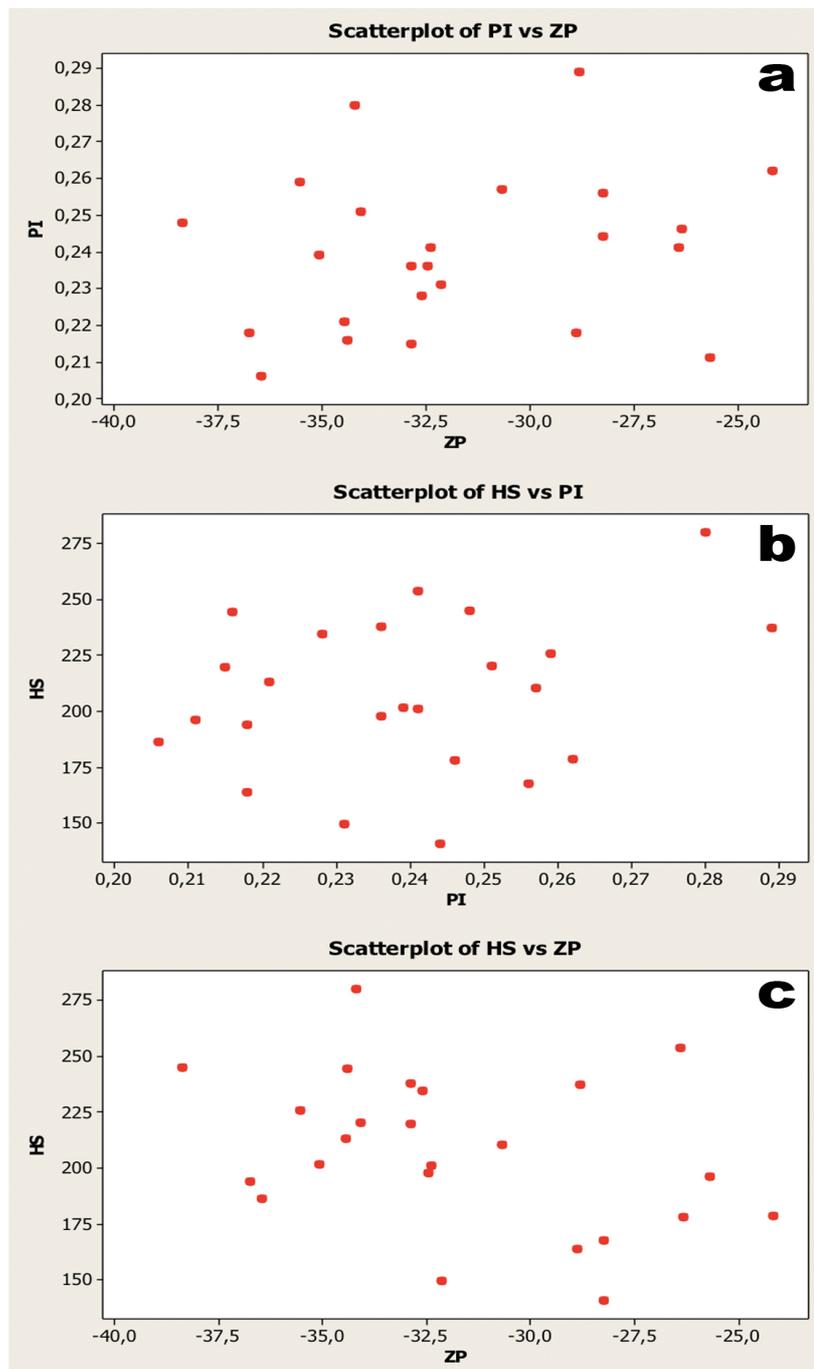
### 4.3. Análise estatística

O principal objetivo deste planejamento fatorial experimental completo foi otimizar a formulação da emulsão do tipo A/O/A com parâmetros físico-químicos adequados para a encapsulação de entidades proteicas (hidrofílicas), prevendo a sua potencial utilização na formulação de uma suspensão isotônica para nebulização.

As variáveis de resposta HS, PI e ZP não exibiram qualquer correlação entre si (ver Figura 12), como pode ser concluído a partir dos coeficientes de correlação e *p*-valores obtidos para PI vs. ZP ( $r = 0,205$ ,  $p$ -valor = 0,338;  $p$ -valor > 0,05, pelo que não existe correlação significativa entre PI e ZP), PI vs. HS ( $r = 0,277$ ,  $p$ -valor = 0,191;  $p$ -valor > 0,05, pelo que não existe correlação significativa entre PI e HS) e HS vs. ZP ( $r = -0,360$ ,  $p$ -valor = 0,084;  $p$ -valor > 0,05, pelo que não existe correlação

significativa entre HS e ZP). Desta forma, estas variáveis puderam ser analisadas individualmente, isto é, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada uma delas de acordo com Montgomery (2001), Bates e Watts (1988) e Box e Draper (1987). Caso contrário, se tivessem sido encontradas quaisquer correlações entre estas variáveis de resposta, teria de ser realizada uma análise de variância multivariada (MANOVA).

**Figura 12.** Gráficos de dispersão (médias de determinações em triplicata) mostrando a ausência de correlação entre PI vs. ZP (a), HS vs. PI (b) e HS vs. ZP (c).



Fonte: elaboração própria.

#### 4.3.1. Análise estatística da variável HS (tamanho hidrodinâmico de partícula)

A análise de variância (ANOVA) para a variável HS (tamanho hidrodinâmico médio de partícula) (ver Quadro 5) foi produzida sob a suposição de que  $p$ -valores inferiores a 0,05 são estatisticamente significativos, ou seja, aqueles valores cujo efeito da fonte correspondente (fator ou interação) foi significativo. Assim, a partir da análise dos dados apresentados no Quadro 5 pode verificar-se que os fatores concentração de lecitina (Lecitina), concentração de poloxâmero 188 (P188) e velocidade de homogeneização (RPM) foram significativos (valores em negrito no Quadro 5, no parâmetro HS), o que significa que uma variação nos níveis destes fatores conduz a uma diferença significativa na variação de HS. Além disso, e uma vez que não foram encontrados efeitos de interação significativos, pode concluir-se que os fatores Lecitina, P188 e RPM promovem variações no parâmetro HS de forma independente.

**Quadro 5.** Análise estatística de variância para a variável HS, usando soma dos quadrados ajustada.

Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	$F$ -valor	$p$ -valor
Proteína	1	7,4	7,4	0,02	0,901
Lecitina	1	5829,7	5829,7	12,92	<b>0,006</b>
P188	1	3730,8	3730,8	8,27	<b>0,018</b>
RPM	2	11495,5	5747,8	12,74	<b>0,002</b>
Proteína * Lecitina	1	154,1	154,1	0,34	0,573
Proteína * P188	1	392,9	392,9	0,87	0,375
Proteína * RPM	2	224,1	112,0	0,25	0,785
Lecitina * P188	1	275,5	275,5	0,61	0,455
Lecitina * RPM	2	914,0	457,0	1,01	0,401
P188 * RPM	2	165,9	83,0	0,18	0,835
Erro	9	4060,9	451,2		
Total	23	27250,8			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0.05)).

Os níveis (-1) para Lecitina, (-1) para P188 e 12500 para RPM foram aqueles que promoveram os valores mais baixos para HS. Além disso, e pelo fato de que as interações entre estes fatores não são significativas, pode concluir-se que a combinação destes três níveis (-1; -1; 12500) para as variáveis supramencionadas é a que promove o valor mais baixo para HS. Em relação ao nível de Proteína, não há diferença estatisticamente significativa entre os níveis baixo e alto.

#### 4.3.2. Análise estatística da variável PI (índice de polidispersão)

A análise de variância (ANOVA) para a variável PI (índice de polidispersão) (ver Quadro 6) mostra que existe uma interação estatisticamente significativa entre os fatores Proteína e Lecitina, assim como entre os fatores Lecitina e RPM (velocidade de homogeneização); desta forma, estes fatores não podem ser analisados de forma independente. A influência da Lecitina sobre o valor de PI depende tanto do nível de Proteína como do nível de RPM. Além disso, o fator P188 mostrou ser significativo, porém sem interação com os demais fatores. Assim, o fator P188 pode ser analisado de forma independente, mas os níveis de Lecitina devem ser analisados tanto dentro de cada nível de Proteína como dentro de cada nível de RPM. O uso de lecitina é essencial para reduzir a tensão interfacial entre a fase oleosa e as fases aquosas interna e externa, e também para facilitar a emulsificação da matriz lipídica. Assim, não obstante o fato de que a Lecitina é utilizada devido ao seu alto poder de emulsificação capaz de proporcionar estabilização das interfaces  $A_{in}/O$ , também tem sido relatada a sua utilização para diminuição do tamanho de partícula em emulsões, um fenômeno que é explicado principalmente pelo seu caráter anfifílico (TROTТА; PATTARINO; IGNONI, 2002; SCHMIDTS et al., 2009).

Na verdade, os resultados obtidos no presente trabalho de pesquisa para os valores de PI das emulsões do tipo A/O/A (que foram essencialmente monodispersas em todos os casos) foram altamente dependentes do nível de lecitina utilizado. O valor PI é adimensional e dimensionado de tal modo que, para valores menores do que 0,08 a amostra é quase monodispersa; normalmente, os valores de PI só produzem uma distribuição monomodal dentro do intervalo 0,05-0,08. Para valores de PI compreendidos entre 0,08 e 0,7, mas afastados de 0,7, a amostra é essencialmente monodispersa. Valores de PI superiores a 0,7 indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanhos muito ampla. A porção lipofílica da lecitina se dissolve na fase lipídica (isto é, a lecitina fica posicionada na interface da fase lipídica com a sua cauda lipofílica dirigida para a fase lipídica, enquanto a cabeça hidrofílica é dirigida para a fase aquosa), promovendo assim uma estabilização a longo prazo das interfaces nas emulsões (TROTТА; PATTARINO; IGNONI, 2002; SCHMIDTS et al., 2009). Encontrou-se uma dependência de PI na concentração de Lecitina, uma vez que a cobertura completa da interface é afetada pela concentração de emulsificante selecionado.

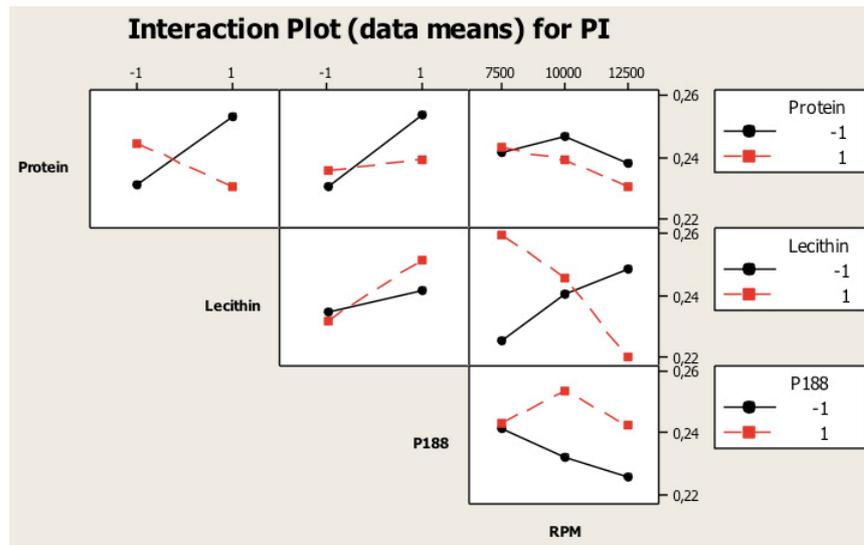
**Quadro 6.** Análise estatística de variância para a variável PI, usando soma dos quadrados ajustada.

Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	0,0001260	0,0001260	0,95	0,355
Lecitina	1	0,0000920	0,0000920	0,70	0,426
P188	1	0,0011070	0,0011070	8,36	<b>0,018</b>
RPM	2	0,0003876	0,0001938	1,46	0,282
Proteína * Lecitina	1	0,0020350	0,0020350	15,37	<b>0,004</b>
Proteína * P188	1	0,0006100	0,0006100	4,61	0,060
Proteína * RPM	2	0,0001116	0,0000558	0,42	0,668
Lecitina * P188	1	0,0002470	0,0002470	1,87	0,205
Lecitina * RPM	2	0,0040716	0,0020358	15,37	<b>0,001</b>
P188 * RPM	2	0,0004301	0,0002150	1,62	0,250
Erro	9	0,0011919	0,0001324		
Total	23	0,0104100			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0.05)).

O nível baixo (-1) de P188 é o que promove o valor menor de PI, e a Figura 13 mostra que, para o nível baixo (-1) de Proteína é o nível baixo (-1) de Lecitina que promove o menor valor de PI, ao passo que para o nível alto (+1) de Proteína é o nível alto (+1) de Lecitina que promove o valor menor para PI.

**Figura 13.** Gráficos de interação (médias de determinações em triplicata) para a variável PI, mostrando as contribuições das interações entre Proteína, Lecitina, P188 e RPM para os valores de PI.



**Fonte:** elaboração própria.

Tendo em consideração a interação entre RPM e Lecitina pode ver-se que, fixando o nível baixo (-1) de Lecitina, à medida que aumenta a velocidade de homogeneização, existe uma tendência para a obtenção de valores mais elevados de PI (Figura 13). Por outro lado, fixando o nível alto (+1) de Lecitina, à medida que aumenta a velocidade de homogeneização existe uma tendência para obter valores mais baixos de PI (Figura 13). A variável PI é explicada pelo modelo apresentado como Equação (4), o qual foi utilizado para construção dos gráficos tridimensionais de resposta de superfície para PI apresentados como Figura 14.

$$PI = A + E_{188} + E_p + E_L + E_{RPM} + E_{P*L} + E_{L*RPM} + E \quad (4)$$

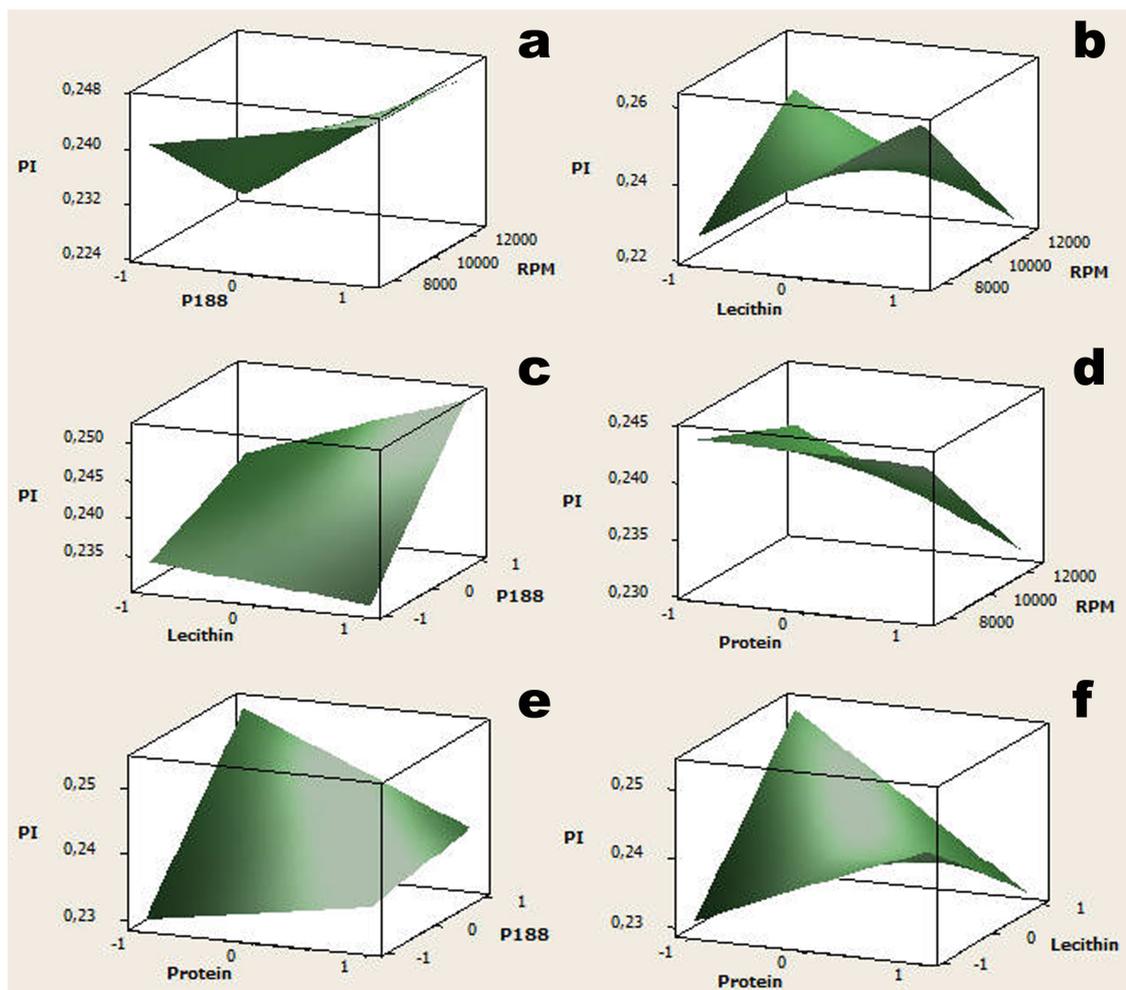
Onde  $A$  representa uma constante,  $E_{188}$  representa o efeito de P188,  $E_p$  representa o efeito da proteína,  $E_L$  representa o efeito da lecitina,  $E_{RPM}$  representa o efeito do RPM,  $E_{P*L}$  representa o efeito da interação entre a proteína e a lecitina,  $E_{L*RPM}$  representa o efeito da interação entre a lecitina e o RPM, e  $E$  representa o erro.

A Figura 14 mostra os gráficos tridimensionais de resposta de superfície para a variável PI (índice de polidispersividade), considerando todos os fatores que contribuem para a sua minimização.

Para a interpretação da interação entre as variáveis lecitina e RPM, a Figura 13 mostra as interações encontradas para a variável PI. Por observação da Figura 13 nota-se que, para o nível mais baixo de RPM (7500) a Lecitina em seu nível mais baixo (-1) é que oferece o menor valor de PI. No

entanto, para o nível mais elevado de RPM (12500) a Lecitina em seu nível mais alto (+1) é a que oferece o menor valor de PI. Assim, a partir da análise estatística efetuada aos resultados experimentais obtidos na sequência do desenho fatorial completo aplicado para produzir as várias emulsões do tipo A/O/A, nomeadamente aos resultados experimentais obtidos para as variáveis HS, ZP e PI das emulsões recém-preparadas, pode concluir-se que a emulsão do tipo A/O/A ótima (considerando um tamanho hidrodinâmico de partícula pequeno associado a um índice de polidispersividade baixo) é aquela cujos parâmetros de formulação no planeamento fatorial são os seguintes: Lecitina ao nível alto (+1), entidade Proteica ao nível alto (+1), Poloxâmoro 188 ao nível baixo (-1), e velocidade de homogeneização ao nível alto (12500 rpm). Na codificação utilizada (ver Quadro 2), a emulsão que corresponde a estes parâmetros tem o código ME3/12500.

**Figura 14.** Gráficos tridimensionais de resposta de superfície para PI vs. RPM e P188 (a), PI vs. RPM e Lecitina (b), PI vs. P188 e Lecitina (c), PI vs. RPM e Proteína (d), PI vs. P188 e Proteína (e), e PI vs. Lecitina e Proteína (f).



Fonte: elaboração própria.

De acordo com o modelo apresentado pela equação (4) a variável PI depende do efeito individual dos parâmetros P188, proteína, lecitina e RPM, assim como da interação conjunta entre proteína e lecitina, lecitina e RPM. Assim, a minimização do valor de PI considerando os gráficos da resposta de superfície da Figura 14 ocorre quando consideramos P188 em nível inferior e RPM em nível superior (Figura 14a), lecitina em nível superior e RPM em nível superior (figura 14b), lecitina em nível superior e P188 em nível inferior (figura 14c), proteína em nível superior e RPM em nível superior (figura 14d), proteína em nível superior e lecitina em nível superior (figura 14f). No entanto, o modelo da equação 4 não preconiza qualquer efeito de interação entre proteína e P188 para explicar o menor valor de PI, a figura 14e poderia parecer ambígua ao apresentar a proteína em nível inferior e P188 em nível inferior para explicar o menor valor de PI. Paradoxalmente, porque os níveis superior e inferior da proteína não são estatisticamente diferentes em termos de promoção do valor mais baixo para HS, e porque esse valor estaria condicionado a um menor valor de PI, na verdade é o nível menor de P188 que promove o menor valor para PI independentemente do nível de proteína (Figura 14e).

#### 4.3.3. Análise estatística da variável ZP (potencial Zeta)

A análise de variância (ANOVA) para a variável ZP (potencial Zeta) (Quadro 7) mostra que o único fator que contribuiu significativamente para a sua variação foi a velocidade de homogeneização (RPM), cujo *p*-valor foi menor do que 0,05. Isto significa que uma variação nos níveis de RPM promove uma variação significativa no potencial Zeta (ZP).

**Quadro 7.** Análise estatística de variância para a variável ZP, usando soma dos quadrados ajustada.

Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	7,639	7,639	0,99	0,346
Lecitina	1	19,046	19,046	2,47	0,151
P188	1	8,402	8,402	1,09	0,324
RPM	2	128,453	64,227	8,33	<b>0,009</b>
Proteína * Lecitina	1	5,358	5,358	0,69	0,426
Proteína * P188	1	1,025	1,025	0,13	0,724
Proteína * RPM	2	25,474	12,737	1,65	0,245
Lecitina * P188	1	0,437	0,437	0,06	0,817
Lecitina * RPM	2	61,010	30,505	3,96	0,059
P188 * RPM	2	14,519	7,260	0,94	0,425
Erro	9	69,411	7,712		
Total	23	340,774			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0.05)).

Da análise efetuada aos resultados do Quadro 7, pode também observar-se que não existiram interações significativas com os demais fatores, indicando que os efeitos dos níveis de RPM sobre os valores de ZP não dependem dos níveis dos outros fatores.

#### **4.4. Caracterização físico-química da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente, com e sem entidade proteica encapsulada**

As características físico-químicas das emulsões do tipo A/O/A são afetadas por um conjunto de variáveis processuais (SEVERINO et al., 2011). Assim, as emulsões do tipo A/O/A sem (emulsão controle) e com entidade proteica encapsulada, produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico através da determinação por DLS (espalhamento dinâmico de luz-laser) ao longo de um período alargado de armazenamento a 4 °C, em

termos de tamanho hidrodinâmico de partícula (HS), índice de polidispersão (PI) e potencial Zeta (ZP). O estudo da forma de associação da entidade proteica às substâncias utilizadas na produção da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente, foi efetuado através de análises de espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), rastreamento de nanopartículas (NTA), e análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Foram ainda efetuadas análises por crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) após coloração negativa com acetato de uranila.

#### 4.4.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)

Em emulsões do tipo A/O/A (tais como as dispersões em água de nanobalões lipídicos com núcleo aquoso produzidas neste trabalho de pesquisa), existe uma correlação positiva entre a estabilidade da emulsão e o comprimento da cadeia carbonada de ácidos graxos e uma correlação negativa com a constante dielétrica do emulsificante (Tween 80, um surfactante e emulsificante não-iônico com um valor de HLB de 15,0 (SCHMIDTS et al., 2009)). Um aumento no peso molecular (tal como no Softisan 100™, com resíduos de ácidos graxos C10-C18) e uma diminuição na constante dielétrica (tal como no Tween 80) indica uma maior hidrofobicidade, levando a uma maior impregnação da interface e a uma emulsão mais estável (BALCÃO et al., 2010, 2014), o que está em claro acordo com a estabilidade de longo prazo observada para os sistemas de emulsão do tipo A/O/A otimizados neste trabalho de pesquisa. A superior estabilidade de emulsões contendo Tween 80 pode estar relacionada com o fato de que o Tween 80 possui uma cadeia-oleato com 18 átomos de carbono e uma ligação insaturada, o que conduz a uma camada de interface O/W mais estável e subsequentemente uma maior estabilidade da emulsão (SCHMIDTS et al., 2009). A maior hidrofobicidade da emulsão otimizada neste trabalho de pesquisa é ainda apoiada pelo valor ponderado (calculado) de HLB (14,0159, Quadro 8).

**Quadro 8.** Valores de resposta (HS, PI e ZP, médias (n=3)  $\pm \sigma$ ) dos três fatores (Proteína, Lecitina, Poloxâmero P188) para as onze formulações produzidas a uma velocidade de agitação de 12500 rpm, e valores ponderados de HLB associados a cada formulação.

Emulsão	Proteína (%, m/m)	Lecitina (%, m/m)	P188 (%, m/m)	12500 rpm			Valor ponderado de HLB
				HS $\pm \sigma$ (nm)	PI $\pm \sigma$	ZP $\pm \sigma$ (mV)	
ME01	0,015	0,25	0,50	140,72 $\pm$ 2,83	0,244 $\pm$ 0,021	-28,23 $\pm$ 4,18	20,52
ME02	0,015	0,25	1,50	167,39 $\pm$ 1,95	0,256 $\pm$ 0,004	-28,25 $\pm$ 0,62	25,31
ME03	0,015	0,75	0,50	186,20 $\pm$ 2,62	0,206 $\pm$ 0,014	-36,45 $\pm$ 0,93	14,02
ME04	0,015	0,75	1,50	219,53 $\pm$ 3,35	0,215 $\pm$ 0,022	-32,87 $\pm$ 0,51	20,67
ME05	0,005	0,75	1,50	197,92 $\pm$ 4,28	0,236 $\pm$ 0,006	-32,47 $\pm$ 1,27	20,62
ME06	0,005	0,75	0,50	212,90 $\pm$ 1,39	0,221 $\pm$ 0,013	-34,45 $\pm$ 2,14	14,02
ME07	0,005	0,25	1,50	178,71 $\pm$ 2,59	0,262 $\pm$ 0,004	-24,17 $\pm$ 9,61	25,31
ME08	0,005	0,25	0,50	149,59 $\pm$ 2,32	0,231 $\pm$ 0,022	-32,13 $\pm$ 1,12	20,52
ME09	0,010	0,50	1,00	184,61 $\pm$ 1,46	0,232 $\pm$ 0,012	-35,34 $\pm$ 0,37	20,59
ME10	0,010	0,50	1,00	183,29 $\pm$ 6,96	0,242 $\pm$ 0,010	-33,68 $\pm$ 4,25	20,59
ME11	0,010	0,50	1,00	172,11 $\pm$ 2,28	0,211 $\pm$ 0,008	-33,72 $\pm$ 1,80	20,59

Fonte: elaboração própria.

Para produzir este valor de HLB (assim como todos os outros exibidos no Quadro 8), a expressão de HLB ponderado de Frenkel; Shwartz; Garti (1983) e Schmidts et al. (2009) foi devidamente aplicada (Equação (5)).

$$HLB_{\text{emulsão múltipla}} = \frac{HLB_I \times \left(\frac{\phi(a/o)}{a}\right) \times wt\%_I + HLB_{II} \times wt\%_{II}}{\left(\frac{\phi(a/o)}{a}\right) \times wt\%_I + wt\%_{II}} \quad (5)$$

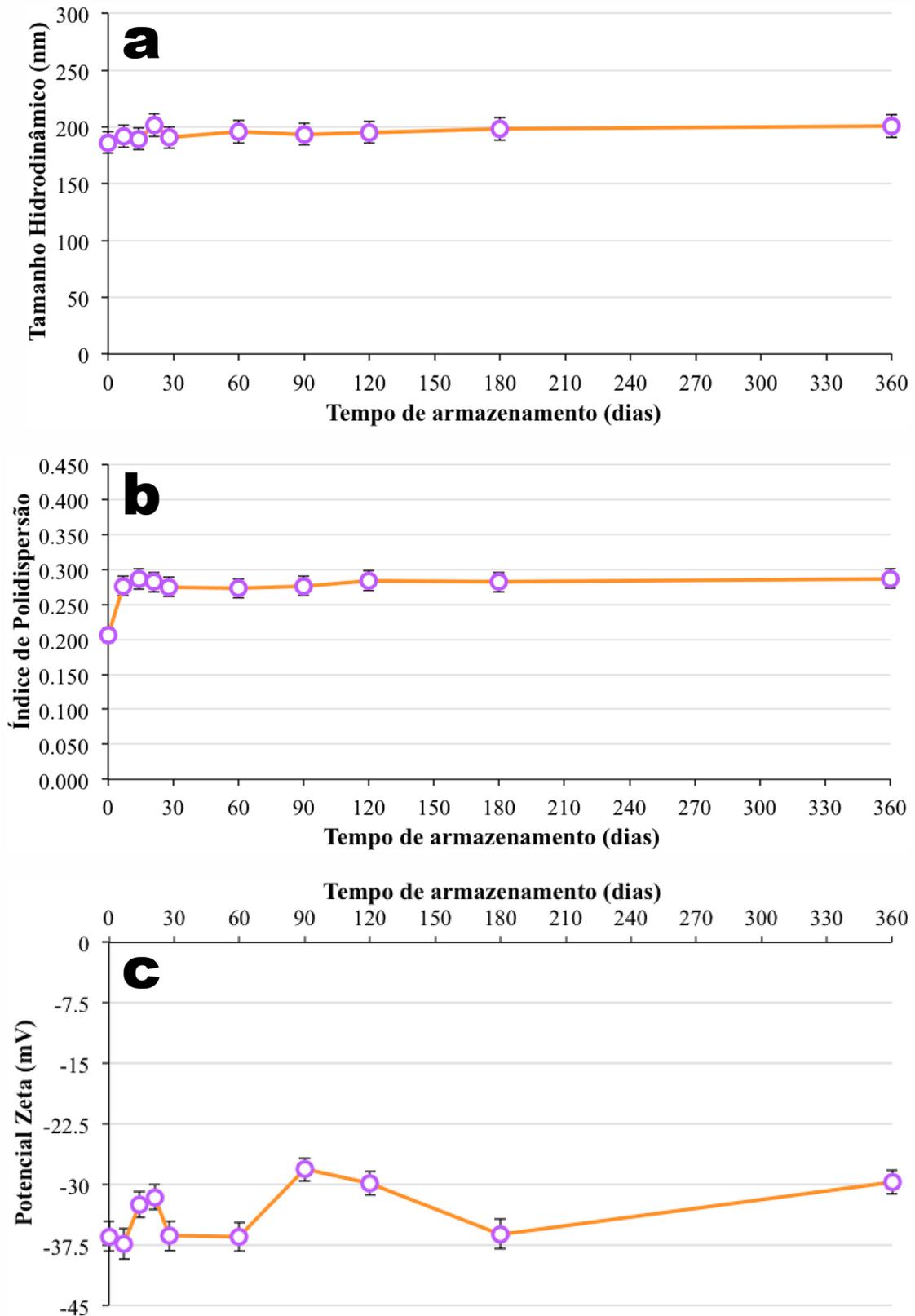
onde  $HLB_I$  é o valor de HLB do emulsificante interno (emulsificante I) usado para a emulsão primária (a/o) (calculado como  $HLB_I = \{[(\%Lecitina, m/m) \cdot HLB_{Lecitina}] + [(\%Tween80, m/m) \cdot HLB_{Tween80}]\}$ , onde  $HLB_{Lecitina}=4$  e  $HLB_{Tween80}=15$ ),  $\phi(a/o)/a$  é a fração da emulsão primária (a/o) na emulsão múltipla  $a/o/a$ ,  $wt\%_I$  é a fração mássica (% m/m) do emulsificante I na emulsão primária (a/o),  $HLB_{II}$  é o valor de HLB do emulsificante II (emulsificante usado para a fase aquosa externa, isto é,

$HLB_{Polox\grave{a}mero188=29}$ ), e  $wt\%_{II}$  é a fração mássica (% m/m) do emulsificante II na emulsão do tipo A/O/A.

O nanossistema otimizado integrou nanobalões lipídicos com tamanho hidrodinâmico médio de cerca de  $(186,2 \pm 2,6)$  nm associado a um índice de polidispersividade médio de  $0,206 \pm 0,014$  e um potencial Zeta médio de cerca de  $(-36,5 \pm 0,9)$  mV (Quadro 8 e Figura 15), valores que se mantiveram estáveis ao longo de um período de armazenamento de um ano. Estes valores foram produzidos para uma velocidade de homogeneização de 12500 rpm (Quadro 8). O tamanho hidrodinâmico médio de partícula e distribuição de tamanhos (índice de polidispersão) foram medidos em triplicata em amostras de emulsão do tipo A/O/A em duplicata via espalhamento dinâmico de luz-laser (metodologia analítica adequada para partículas com tamanhos entre 5 nm a cerca de 3  $\mu$ m), onde o potencial Zeta foi medido em triplicata em amostras de emulsões do tipo A/O/A em duplicata por microelectroforese, com todos os resultados aqui apresentados como valores médios (Figura 15) e desvios-padrão associados para a emulsão do tipo A/O/A otimizada, em função do tempo de armazenamento a 4 °C. Para os mesmos parâmetros (otimizados), uma emulsão controle sem entidades proteicas encapsuladas produziu os seguintes valores no instante zero: tamanho hidrodinâmico médio de partícula de  $(206,15 \pm 8,56)$  nm e potencial Zeta médio de  $(-19,83 \pm 2,68)$  mV, e um índice de polidispersão médio de  $0,277 \pm 0,016$ .

O armazenamento da emulsão do tipo A/O/A otimizada com entidades proteicas encapsuladas (Figura 15) durante um ano a 4 °C levou à manutenção do tamanho hidrodinâmico médio entre 180 nm e 200 nm (Figura 15a), a um pequeno aumento do índice de polidispersão durante os primeiros sete dias (de 0,206 para 0,276) o qual se manteve praticamente inalterado durante todo o resto do período de armazenamento (Figura 15b), e a um pequeno aumento nos valores do potencial Zeta (de -36,45 mV para -29,81 mV), devido presumivelmente à concentração de ions na interface dos nanobalões lipídicos (Figura 15c). Para a emulsão do tipo A/O/A controle, verificou-se também um pequeno aumento no tamanho de partícula, assim como um ligeiro aumento nos valores do potencial Zeta.

**Figura 15.** Evolução do tamanho hidrodinâmico médio de partícula (HS) **(a)**, índice de polidispersão (PI) **(b)** e potencial Zeta **(c)** dos nanobalões lipídicos contendo entidades proteicas encapsuladas, integrantes da emulsão do tipo A/O/A otimizada (ME03/12500), ao longo do período de armazenamento (médias de três replicatas e desvios-padrão associados).



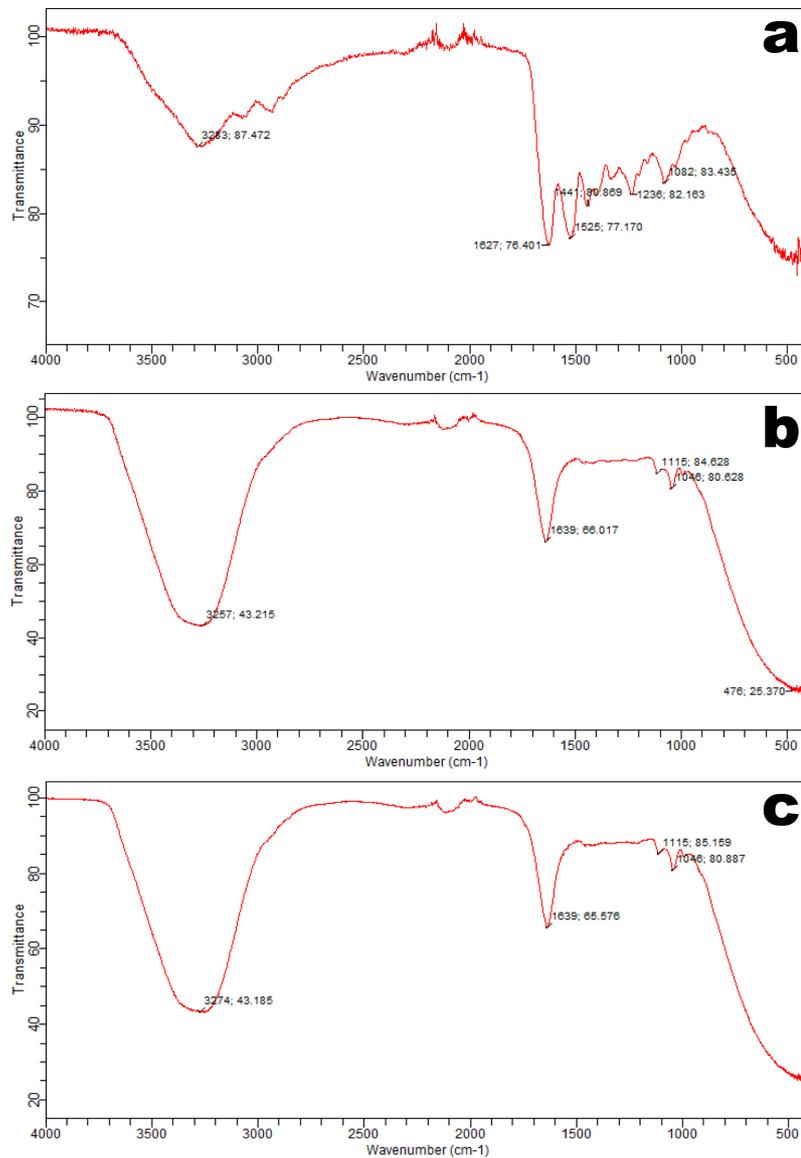
Fonte: elaboração própria.

#### 4.4.2. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permitem a identificação de grupos funcionais. Cada grupo funcional em particular absorve radiação numa frequência característica do espectro infravermelho. Assim, um gráfico de intensidade *versus* frequência de radiação, conhecido como espectro de infravermelho, permite a caracterização dos grupos funcionais num dado material (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007), o que torna a espectrofotometria FTIR bastante utilizada na análise da estrutura de sistemas nano-estruturados. Esta técnica analítica pode permitir a identificação de possíveis interações entre a entidade (proteica) encapsulada e o envelope lipídico dos nanobalões lipídicos com núcleo aquoso integrantes de emulsões do tipo A/O/A, através da análise dos grupos funcionais dos agentes envolvidos no processo. A Figura 16 exhibe os espectros de infravermelho da proteína-modelo utilizada (Figura 16a), da emulsão (controle) otimizada sem entidade proteica encapsulada (Figura 16b), e da emulsão do tipo A/O/A otimizada contendo entidade proteica encapsulada (Figura 16c).

A intensidade dos picos nos números de onda de  $3283\text{ cm}^{-1}$  (proteína, espectro **a** na Figura 16),  $3257\text{ cm}^{-1}$  (emulsão controle, espectro **b** na Figura 16) e  $3274\text{ cm}^{-1}$  (emulsão do tipo A/O/A otimizada contendo entidade proteica encapsulada, espectro **c** na Figura 16) são característicos do estiramento do grupo -OH e indicam a presença de ligação com moléculas de água. Estes picos são mais intensos nos espectros **b** e **c** devido à natureza aquosa das emulsões do tipo A/O/A produzidas (Figuras 16b e 16c). Nos três espectros de infravermelho podemos observar picos a  $1627\text{ cm}^{-1}$  (Figura 16a) e  $1639\text{ cm}^{-1}$  (Figuras 16b e 16c), característicos do grupo carbonilo (-C=O). No espectro de infravermelho da entidade proteica (Figura 16a), o pico que aparece a  $1525\text{ cm}^{-1}$  é provavelmente atribuível à deformação angular de um grupo -NH<sub>2</sub> (ou o grupo amina terminal ou um grupo amina dos resíduos de lisina na molécula proteica), outro pico que aparece em  $1441\text{ cm}^{-1}$  é atribuível muito seguramente ao grupo carboxilato (-COO-), e um pico que aparece em  $1236\text{ cm}^{-1}$  é provavelmente atribuível a grupos metilo (-CH<sub>3</sub>). Comparando os espectros de infravermelho da emulsão do tipo A/O/A sem (Figura 16b) e com (Figura 16c) entidade proteica encapsulada, são visíveis picos na região de  $1115\text{ cm}^{-1}$  a  $1046\text{ cm}^{-1}$ , característicos do estiramento da ligação -C-O-. No espectro de infravermelho da proteína (Figura 16a), aparece ainda um pico característico em  $1082\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento da ligação -P-O- em grupos fosfato.

**Figura 16.** Espectros de infravermelho de amostras de proteína **(a)**, emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente sem proteína encapsulada **(b)**, e emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente contendo proteína encapsulada **(c)**.



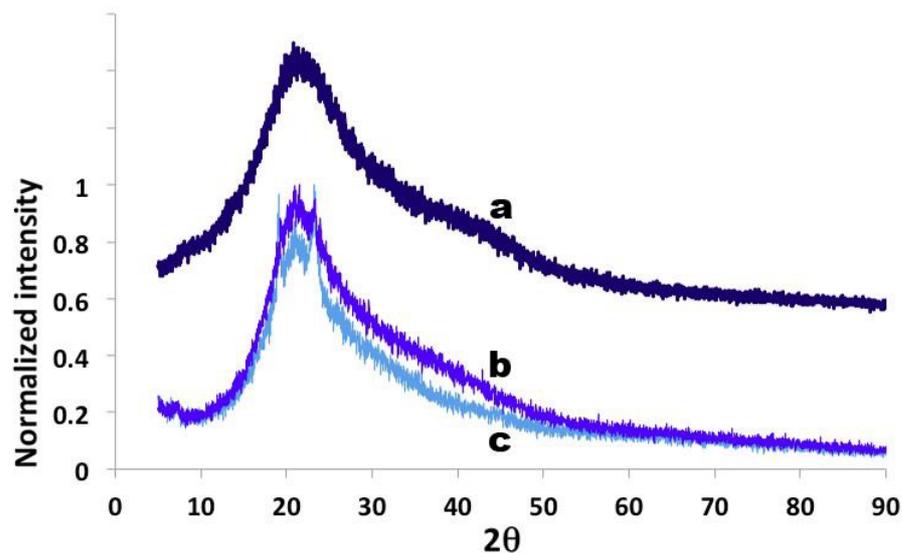
**Fonte:** elaboração própria.

Comparando o espectro de infravermelho da emulsão do tipo A/O/A sem (Figura 16b) e com (Figura 16c) entidade proteica encapsulada, pode permitir concluir que não existe deslocamento de picos principais, nem a existência dos picos característicos do espectro de infravermelho da entidade proteica livre (1525 cm<sup>-1</sup>, 1441 cm<sup>-1</sup>, 1236 cm<sup>-1</sup> e 1082 cm<sup>-1</sup>), o que indica que toda a proteína utilizada na preparação da emulsão do tipo A/O/A (estatisticamente) otimizada foi de fato encapsulada, estando assim ausente na fase aquosa externa da emulsão do tipo A/O/A.

#### 4.4.3. Análises por difração de raios-X (DRX)

A vantagem dos métodos de análise por difração de raios-X sobre outras técnicas de análise baseia-se na especificidade dos padrões de difração de substâncias cristalinas, na capacidade para distinguir entre elementos e seus óxidos, bem como na possibilidade de identificar compostos químicos, formas polimórficas e cristais mistos, através de análises não-destrutivas. Os resultados obtidos pelas análises de difração de raios-X (DRX) realizadas à proteína e às emulsões do tipo A/O/A (estatisticamente otimizadas) sem e com a proteína encapsulada, encontram-se exibidos na Figura 17, na forma de difratogramas normalizados.

**Figura 17.** Difratogramas de raios-X (DRX) de amostras de proteína **(a)**, amostras das emulsões do tipo A/O/A estatisticamente otimizadas contendo proteína encapsulada **(b)**, e amostras das emulsões do tipo A/O/A estatisticamente otimizadas sem proteína encapsulada **(c)**.



**Fonte:** elaboração própria.

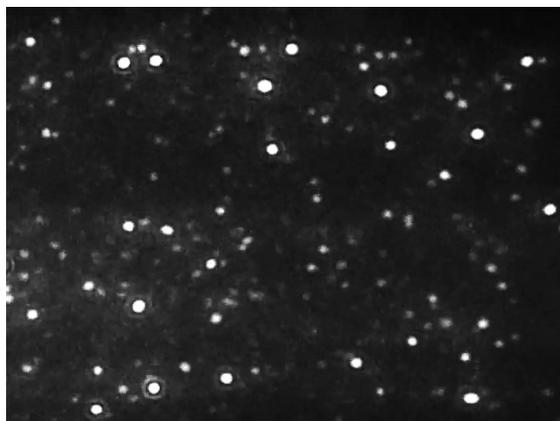
Picos com elevada intensidade e amplitude de base estreita estão relacionados com materiais cristalinos, enquanto picos com base larga estão relacionados com materiais amorfos. Uma vez que a intensidade dos picos nos padrões de difração de raios-X também depende da concentração da entidade bioativa, um aumento tanto na intensidade dos picos como no padrão de difração era esperado para a emulsão do tipo A/O/A contendo proteína encapsulada (ver Figura 17b) quando comparado com os da emulsão do tipo controle (sem proteína encapsulada, ver Figura 17c). Ambos os difratogramas apresentam o mesmo padrão de intensidade, mas com amplitudes diferentes. A normalização da intensidade em todos os difratogramas (proteína (ver Figura 17a), emulsão do tipo A/O/A com proteína encapsulada (Figura 17b), e emulsão do tipo A/O/A controle (sem proteína

encapsulada, Figura 17c)) foi realizada dividindo os valores de intensidade pelo valor máximo de intensidade em cada difratograma, permitindo assim uma melhor comparação entre os difratogramas de raios-X das duas emulsões. Os difratogramas das duas emulsões do tipo A/O/A, com (Figura 17b) e sem (Figura 17c) proteína encapsulada exibiram uma banda larga com ruído, com picos bem definidos na região de  $18.00 \leq 2\theta \leq 25.00$ , onde os picos mais pequenos e bem definidos indicam resíduos cristalinos do lipídeo (Softisan 100™) utilizado na preparação das emulsões do tipo A/O/A. Em particular, os difratogramas de raios-X revelaram a presença de dois sinais, um a  $2\theta = 19,08^\circ$  e outro a  $2\theta = 23,26^\circ$  (Figura 17), ambos característicos da forma polimórfica ortorrômbica frequentemente observada em triacilgliceróis complexos tais como o Softisan 100™ (BUNJES; UNRUH, 2007).

#### 4.4.4. Análises por rastreamento de nanopartículas (NTA)

A emulsão do tipo A/O/A otimizada abrigando entidades proteicas foi também analisada via rastreamento de nanopartículas num dispositivo NanoSight NS300 da Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, Reino Unido). A temperatura do meio de dispersão foi completamente programada através do software do dispositivo de análise por rastreamento de nanopartículas, com as análises a serem realizadas a  $25,1^\circ\text{C}$ . A amostra de emulsão (previamente diluída em água ultrapura) foi atingida por um feixe de laser de luz-UV a 405 nm, com os movimentos Brownianos dos nanobalões lipídicos a serem capturados por uma câmera sCMOS de alta-resolução, para realizar as análises de rastreamento de nanopartículas. Na Figura 18 encontra-se uma imagem (*frame*) congelada dos nanobalões lipídicos integrantes da emulsão do tipo A/O/A otimizada com entidades proteicas encapsuladas, permitindo observar a forma esférica das partículas e a ausência de agregação.

**Figura 18.** Imagem (congelada) de alta resolução da emulsão do tipo A/O/A estatisticamente otimizada contendo proteína encapsulada, capturada por uma câmera sCMOS de alta resolução, após irradiação da amostra com um feixe laser de luz-UV a 405 nm.



**Fonte:** elaboração própria.

Os resultados produzidos pelas análises (realizadas em quintuplicata) permitiram o cálculo do coeficiente de difusão ( $D$ ) dos nanobalões lipídicos integrantes da emulsão do tipo A/O/A otimizada. A concentração de partículas foi determinada como  $4,98 \times 10^9$  partículas/mL, e a viscosidade dinâmica da emulsão (meio de dispersão) foi  $\eta = 0,885965$  cP (ou  $0,000885965$  kg/(m.s)). Usando a equação de Stokes-Einstein (Equação (6)),

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (6)$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão,  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,3806488 \times 10^{-23}$  m<sup>2</sup>.kg/(s<sup>2</sup>.K)),  $T$  é a temperatura absoluta (K),  $\eta$  é a viscosidade dinâmica (kg/(m.s)), e  $r$  é o raio hidrodinâmico (m) da partícula esférica, e assumindo um diâmetro hidrodinâmico de partícula homogêneo para os nanobalões lipídicos (o que foi o caso na emulsão do tipo A/O/A otimizada neste trabalho de pesquisa) de 186,20 nm, o coeficiente de difusão dos nanobalões lipídicos integrantes da emulsão foi calculado como sendo  $2,64879 \times 10^6$  nm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (ou  $2,64879 \times 10^{-12}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Notavelmente, os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa para o coeficiente de difusão dos nanobalões lipídicos integrantes da emulsão do tipo A/O/A otimizada são comparáveis e da mesma ordem de grandeza ( $10^{-12}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) dos resultados publicados por Katayama *et al.* (2009). Tipicamente, os coeficientes de difusão para moléculas variam entre  $10^{-10}$  a  $10^{-7}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, mas os coeficientes de difusão para nanopartículas são tipicamente da ordem de grandeza de  $10^{-12}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (KATAYAMA *et al.*, 2009; STAIT-GARDNER *et al.*, 2009). Como aditivo, a lecitina resulta na estabilização das emulsões do tipo A/O/A (SCHMIDTS *et al.*, 2009), com a estabilidade aumentada a estar relacionada com uma alteração no coeficiente de difusão da água e de substâncias solúveis em água sujeitas à composição da fase oleosa. Quanto mais baixo o coeficiente de difusão, mais estável a emulsão do tipo A/O/A (KATAYAMA *et al.*, 2009; SCHMIDTS *et al.*, 2009), e isto foi de fato observado durante o armazenamento de longo-prazo da emulsão do tipo A/O/A estatisticamente otimizada com entidades proteicas encapsuladas. Observações macroscópicas dos nanosistemas otimizados com entidade proteica aprisionada não revelaram separação visível de fases, tendo revelado ausência de aderência às paredes do recipiente mesmo após um armazenamento prolongado de um ano a temperatura de refrigeração.

#### 4.4.5. Análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A técnica de análise térmica por calorimetria diferencial exploratória (DSC) registra o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura; é um método de

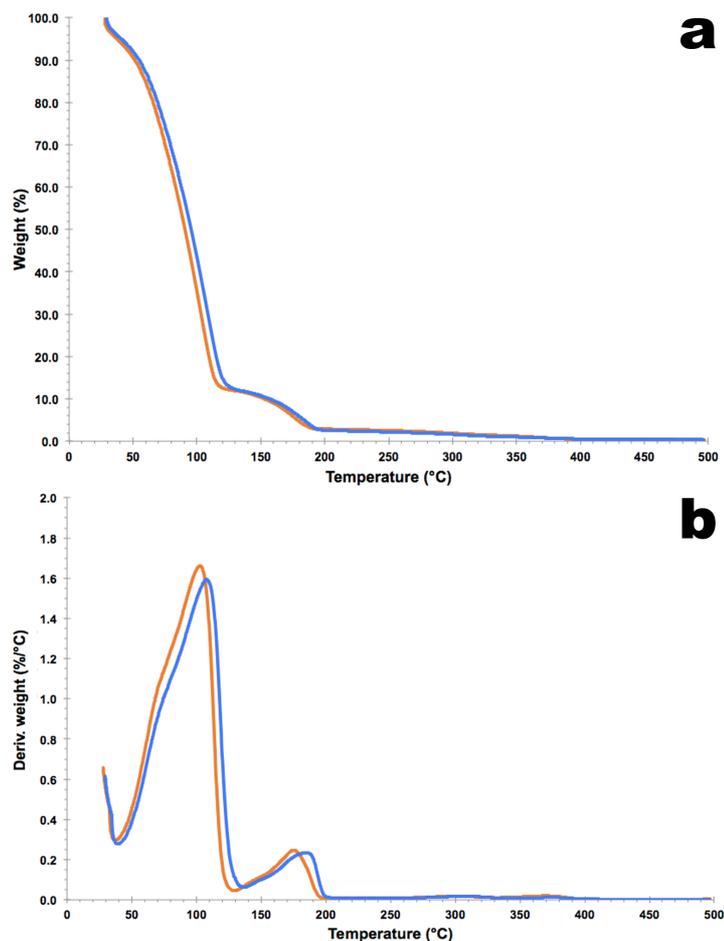
variação entálpica, no qual a diferença no fornecimento de energia calorífica entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância em estudo e a referência são submetidas a um mesmo programa de aquecimento, ou arrefecimento, rigorosamente controlado. Estas determinações fornecem dados qualitativos e quantitativos em processos endotérmicos e exotérmicos, permitindo obter informações referentes a alterações de propriedades físicas e/ou químicas como, por exemplo: (i) temperaturas características (temperatura de fusão, cristalização, transição vítrea), (ii) grau de cristalinidade de um polímero, (iii) diagramas de fase, (iv) entalpias de transição de fase e de reação, (v) estabilidade térmica e oxidativa, (vi) grau de pureza, e (vii) cinética de reações.

A contribuição da técnica de DSC consiste na sua medida do fluxo de calor, podendo identificar com muita propriedade mudanças de fase sem que haja variações de massa que passariam despercebidas puramente por análises termogravimétricas (TGA), tais como mudanças estruturais, reações e transições sólido-sólido, cristalização, fusão, polimerização e reações catalíticas. Assim, as análises térmicas por termogravimetria (TGA) complementarão as análises por DSC e permitirão medir a variação de massa das amostras de emulsões do tipo A/O/A em função da temperatura e/ou tempo, em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas, enquanto estas são submetidas a uma rampa linear de temperatura controlada. Esta técnica de análise térmica possibilitará conhecer o intervalo de temperatura em que a amostra adquire uma composição química fixa, e a temperatura em que se decompõe e começam reações de desidratação e oxidação. Seu princípio de funcionamento é simples: analisar a perda ou a agregação de massa à amostra em temperaturas variadas. Pode assim obter-se informação sobre o grau de hidratação das emulsões do tipo A/O/A, tal como a sua resistência térmica à desidratação (que ocorre primariamente com as moléculas de água adsorvidas).

Uma análise às curvas termogravimétricas (Figura 19a) das emulsões controle e com proteína encapsulada permite a identificação de dois grandes eventos de perda de massa, atribuíveis à perda de água. O primeiro evento de perda de água ocorre desde cerca de 50 °C até 115 °C (Figura 19a), provavelmente relacionado com perda de água da fase aquosa externa. O segundo evento de perda de água, extendendo-se desde cerca de 120 °C até quase 200 °C (Figura 19a), está muito provavelmente relacionado com a perda de água da fase aquosa interna. A primeira derivada da curva de perda de peso (isto é, a taxa de variação de massa, Figura 19b) pode ser usada para prever os pontos nos quais a perda de peso é mais aparente (pontos de inflexão), ou seja, 100 °C e 175 °C para a emulsão controle, e 110 °C e 190 °C para a emulsão carregada com a entidade proteica. A compatibilidade entre o Tween 80 e outros componentes da fase aquosa interna, atribuída a ligações de hidrogênio e à menor energia de rede cristalina deste polímero, teve um impacto notório no processo de perda de água tanto da emulsão controle como da emulsão carregada com proteína (Figura 19b). Sendo hidrofílica, a entidade proteica é higroscópica por natureza e por isso se espera que retenha mais água quando aprisionada no interior do núcleo aquoso dos nanobalões lipídicos, e de fato isto pode ser observado a partir de uma análise cuidadosa das Figuras 19a e 19b, onde pode ser notado um deslocamento na

curva termogravimétrica (Figura 19a) para a emulsão múltipla A/O/A contendo entidades proteicas aprisionadas, com a perda de água a ocorrer a uma temperatura ligeiramente mais elevada muito provavelmente devido a ligações de hidrogênio entre moléculas de água, Tween 80 e moléculas da entidade proteica. Isto pode ser confirmado por inspeção da Figura 19b, onde tal deslocamento pode ser observado mais claramente. No entanto, os perfis de perda de água das duas emulsões múltiplas A/O/A não diferiram substancialmente um do outro. As emulsões do tipo A/O/A otimizadas sofreram um processo de perda de peso em duas etapas, e são estáveis pelo menos até 50 °C. O teor de humidade dos nanobalões lipídicos contendo entidades proteicas aprisionadas foi mais elevado do que o daquele dos nanobalões lipídicos da emulsão controle. A análise de TGA dos nanobalões lipídicos mostrou uma perda de peso de cerca de 88% a temperaturas de até 115 °C, o que pode ser atribuído à perda da fase aquosa externa do sistema. No entanto, o sistema matricial dos nanobalões lipídicos exibiu uma perda de peso de cerca de 9% quando aquecido até 200 °C como se mostra nas Figuras 19a e 19b.

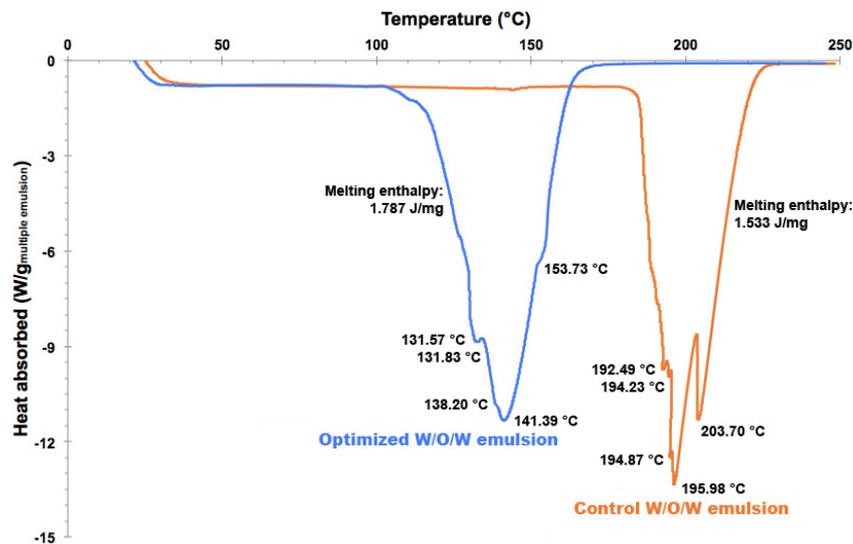
**Figura 19.** Curvas termogravimétricas (a) e primeira derivada das curvas de perda de peso (b) de amostras da emulsão do tipo A/O/A estatisticamente otimizada contendo entidade proteica encapsulada (linhas azuis) e da emulsão do tipo A/O/A estatisticamente otimizada sem entidade proteica encapsulada (linhas laranja).



Fonte: elaboração própria.

As análises calorimétricas por calorimetria diferencial exploratória (DSC) das emulsões forneceram uma visão sobre o estado e grau de cristalinidade, e comportamento de fusão e de cristalização de materiais cristalinos tais como os nanobalões lipídicos produzidos. A adição (por aprisionamento) da entidade proteica ao núcleo aquoso dos nanobalões lipídicos promoveu uma diminuição significativa no pico de temperatura de fusão (pico de absorção a 195,98 °C e calor absorvido (entalpia de fusão) de 1,533 J/mg para a emulsão controle (desprovida de qualquer entidade proteica aprisionada), para pico de absorção a cerca de 141,39 °C e calor absorvido (entalpia de fusão) de 1,787 J/mg para a emulsão otimizada com entidades proteicas aprisionadas (ver Figura 20)), denotando um alargamento da gama de temperaturas de fusão no caso da emulsão otimizada.

**Figura 20.** Termogramas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) de amostras da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente contendo entidades proteicas aprisionadas (linhas azuis) e da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente sem proteína aprisionada (linhas laranja).



**Fonte:** elaboração própria.

A quantidade de calor absorvido pelos nanobalões lipídicos foi quase a mesma quando comparando nanobalões vazios e nanobalões incorporando entidades proteicas. No entanto, a inclusão das entidades proteicas nos nanobalões lipídicos conduziu a uma diminuição significativa no pico de absorção de calor (141,39 °C), quando comparado com o dos nanobalões lipídicos vazios (195,98 °C), devido a amorfização do sistema. Analisando a emulsão otimizada, produzida com o nível mais elevado de entidade proteica no interior do núcleo aquoso dos nanobalões lipídicos, obtém-se uma entalpia de fusão de 1,787 J/mg<sub>nanoemulsão</sub>, a um pico de temperatura de 141,39 °C, um valor apenas 16,57% mais elevado do que aquele da emulsão controle, o que provavelmente contribui para o efeito estabilizante do processo de nanoencapsulação. Os resultados obtidos pelas análises térmicas de DSC realizadas tanto à emulsão do tipo A/O/A contendo entidade proteica aprisionada como à emulsão do

tipo A/O/A controle (Figura 20) estão em clara concordância com aqueles obtidos pelos estudos de difração de raios-X (Figura 17), pois como se pode ver por inspeção dos termogramas de DSC, o aprisionamento das moléculas de entidade proteica no interior do núcleo aquoso dos nanobalões lipídicos levou a uma diminuição da cristalinidade com alargamento do perfil de fusão. A amorfização do envelope lipídico após o aprisionamento das moléculas de entidade proteica (Figura 17 e Figura 20) muito provavelmente aumentou a capacidade de acomodação dos nanobalões lipídicos para uma macromolécula tal como a entidade proteica. Devido a diminuição da rigidez, uma redução na taxa de liberação das entidades proteicas aprisionadas foi quase certa, o que por seu lado poderá explicar a elevada estabilidade observada para a emulsão do tipo A/O/A com entidade proteica aprisionada (Figura 15).

Uma inspeção atenta dos termogramas de DSC exibidos na Figura 20 permite observar cinco eventos endotérmicos distintos (alguns dos quais são muito pequenos): um a 203,70 °C (emulsão controle) que se deslocou para 153,73 °C (emulsão otimizada), implicando uma diminuição considerável na cristalinidade; um a 195,98 °C (emulsão controle) que se deslocou para 141,39 °C (emulsão otimizada); um muito pequeno a 194,87 °C (emulsão controle) que se deslocou para 138,20 °C (emulsão otimizada); um muito pequeno a 194,23 °C (emulsão controle) que se deslocou para 131,83 °C (emulsão otimizada); e um a 192,49 °C (emulsão controle) que se deslocou para 131,57 °C (emulsão otimizada). Os picos endotérmicos a 195,98 °C e 203,70 °C (emulsão controle) e a 141,39 °C e 153,73 °C (emulsão otimizada) são provavelmente explicados pelo Softisan 100™, o que está em clara concordância com os dois sinais intensos e estreitos observados nos difractogramas de raios-X da Figura 17. Notavelmente, os eventos térmicos representados na Figura 20 e os difractogramas de raios-X representados na Figura 17 denotam uma clara transição de um estado cristalino dos nanobalões lipídicos (Figura 20, emulsão do tipo A/O/A controle) para um estado amorfo (Figura 20, emulsão do tipo A/O/A otimizada), devido ao aprisionamento de uma macromolécula hidrofílica tal como a entidade proteica utilizada neste trabalho de pesquisa, conduzindo assim à estabilidade aumentada observada para a emulsão do tipo A/O/A otimizada com entidades proteicas aprisionadas no núcleo aquoso dos nanobalões lipídicos.

#### 4.4.6. Aspecto macroscópico da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente com entidade proteica aprisionada

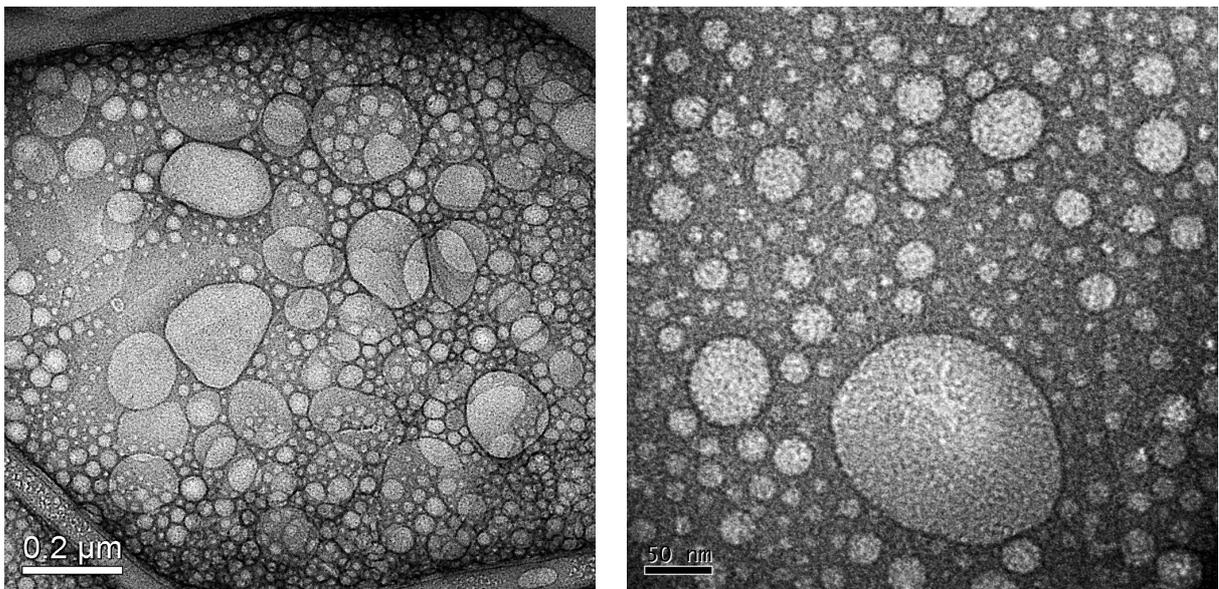
Ao longo de todo o período de armazenamento (1 ano) a temperaturas de refrigeração (4 °C), tanto a nanodispersão lipídica A/O/A otimizada estatisticamente com entidade proteica encapsulada, como a emulsão do tipo A/O/A controle, foram analisadas macroscopicamente. Não foram detectados quaisquer fenômenos de instabilidade das nanoemulsões, tendo estas apresentado sempre um aspecto

leitoso-translúcido e uniforme. Também não se verificou qualquer adesão de nanobalões lipídicos às paredes do recipiente onde as emulsões foram armazenadas (Figuras 11 e 21).

#### 4.4.7. Análises micro-estruturais e morfológicas por crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET)

As análises micro-estruturais e morfológicas por crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET) permitiram observar a forma quase-esférica das partículas da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente (ME25) assim como a ausência de fenômenos de agregação (Figura 21).

**Figura 21.** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão após coloração negativa com acetato de uranila, mostrando duas magnificações diferentes.



**Fonte:** elaboração própria.

Pode ser ainda observada a população de partículas com diâmetro hidrodinâmico em torno de 200 nm, confirmando os resultados obtidos por DLS e NTA (Figura 21), assim como uma população de partículas bem menor, com tamanhos hidrodinâmicos em torno de 50 nm.

#### 4.4.8. Determinação da eficiência de encapsulação da emulsão do tipo A/O/A otimizada estatisticamente

Após centrifugação das alíquotas (em quintuplicatas) de 2 mL das emulsões do tipo ME25 e ME-controle, 1000 µL do sobrenadante foram cuidadosamente recolhidos, diluídos a 50 mL com água ultrapura (i.e. uma diluição 1:50), introduzidos em cubeta de quartzo e lidas as absorvâncias a 280 nm, usando água ultrapura como branco. As absorvâncias produzidas foram de 0,846; 0,878; 0,911; 0,827 e 0,849 para a emulsão ME25, e 0,775; 0,787; 0,769; 0,779 e 0,798 para a emulsão ME-controle. O resultado do ajuste linear realizado aos dados experimentais da curva de calibração foi então utilizada para calcular a concentração de proteína no sobrenadante da emulsão do tipo A/O/A (ME25), para cada replicata, na forma da expressão

$$C_{\text{proteína}} = \left[ \left( \text{Abs}_{280\text{nm}, \text{ME25}} - \text{Abs}_{280\text{nm}, \text{ME-controle}} \right) - 0.0123 \right] / 0,8954 \text{ (mg/mL)}.$$

Usando o fator de diluição da diluição efetuada, as quantidades de proteína no sobrenadante das alíquotas foram determinadas e recalculadas para a emulsão do tipo A/O/A original. Assim, a eficiência de encapsulação obtida foi de  $EE(\%) = (60,58 \pm 14,87)\%$ .

#### 4.5. Caracterização, por DLS, das várias emulsões múltiplas A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, ao longo de um período alargado de armazenamento a 4 °C

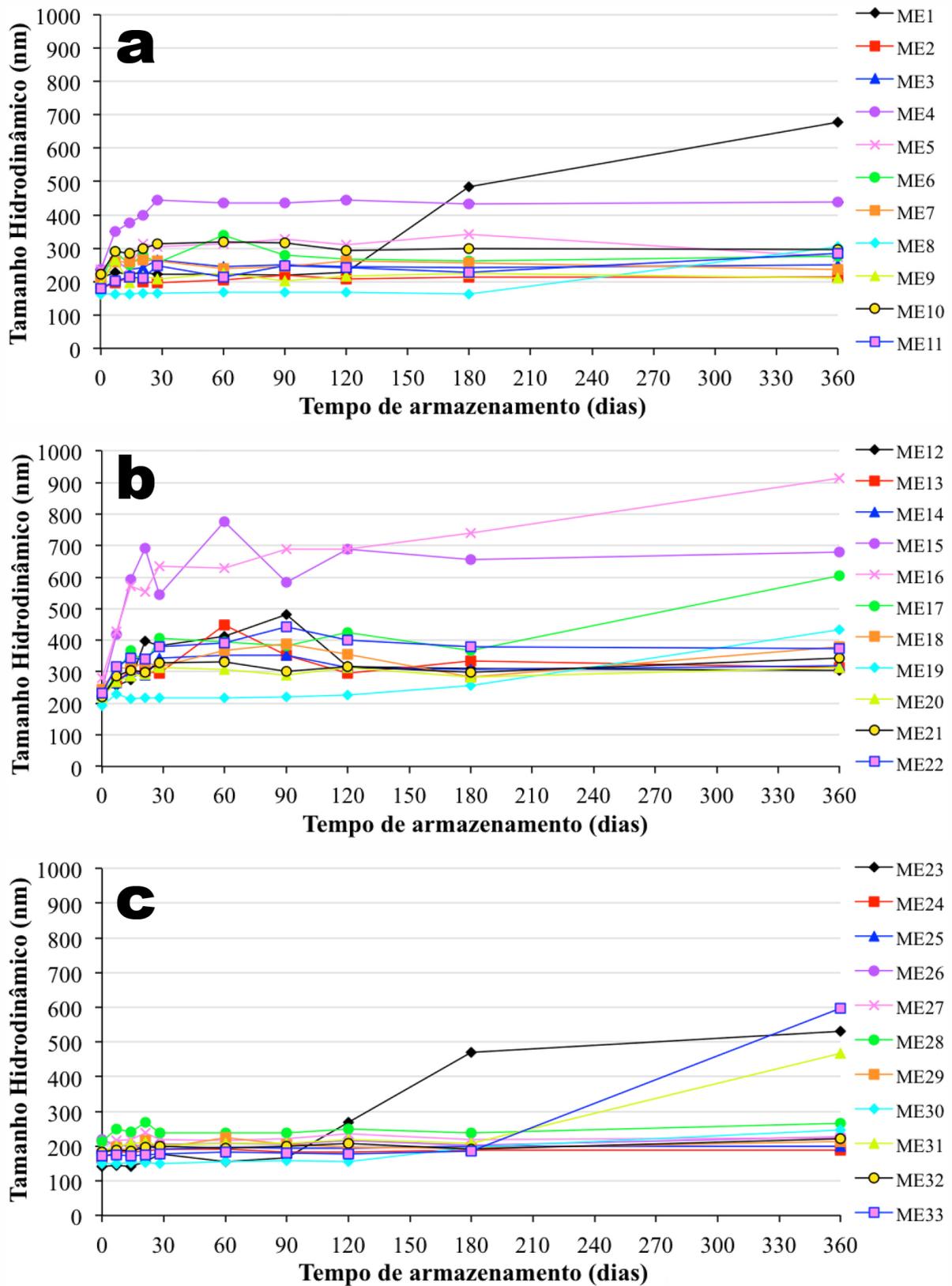
As várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado foram mantidas armazenadas a 4 °C (ver Figura 22), tendo sido analisadas ao longo de um ano por DLS para verificação da evolução dos parâmetros HS (tamanho hidrodinâmico médio de partícula), ZP (potencial Zeta) e PI (índice de polidispersão). Os resultados obtidos nas análises por DLS ao longo do tempo de armazenamento encontram-se representados na Figura 23 (**a**, 7500 rpm; **b**, 10000 rpm; **c**, 12500 rpm) para a evolução do tamanho hidrodinâmico de partícula, na Figura 24 (**a**, 7500 rpm; **b**, 10000 rpm; **c**, 12500 rpm) para a evolução do potencial Zeta, e na Figura 25 (**a**, 7500 rpm; **b**, 10000 rpm; **c**, 12500 rpm) para a evolução do índice de polidispersão.

**Figura 22.** Condições de armazenamento das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, mantidas armazenadas a uma temperatura de 4 °C durante aproximadamente 12 meses.



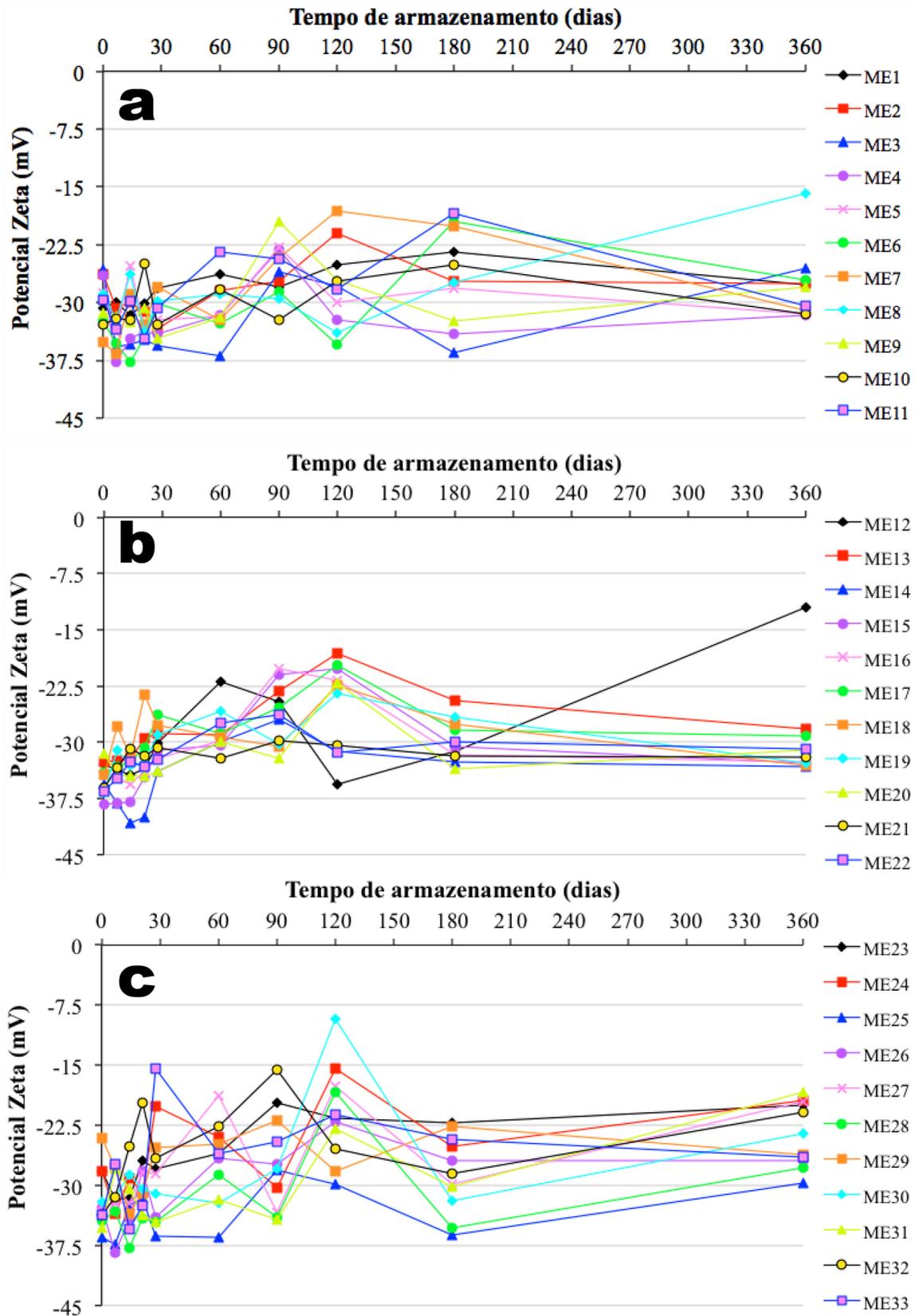
**Fonte:** elaboração própria.

**Figura 23.** Evolução, ao longo do tempo de armazenamento, do tamanho hidrodinâmico médio de partícula (HS, nm) das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para uma velocidade de homogeneização de (a) 10000 rpm, (b) 7500 rpm, e (c) 12500 rpm.



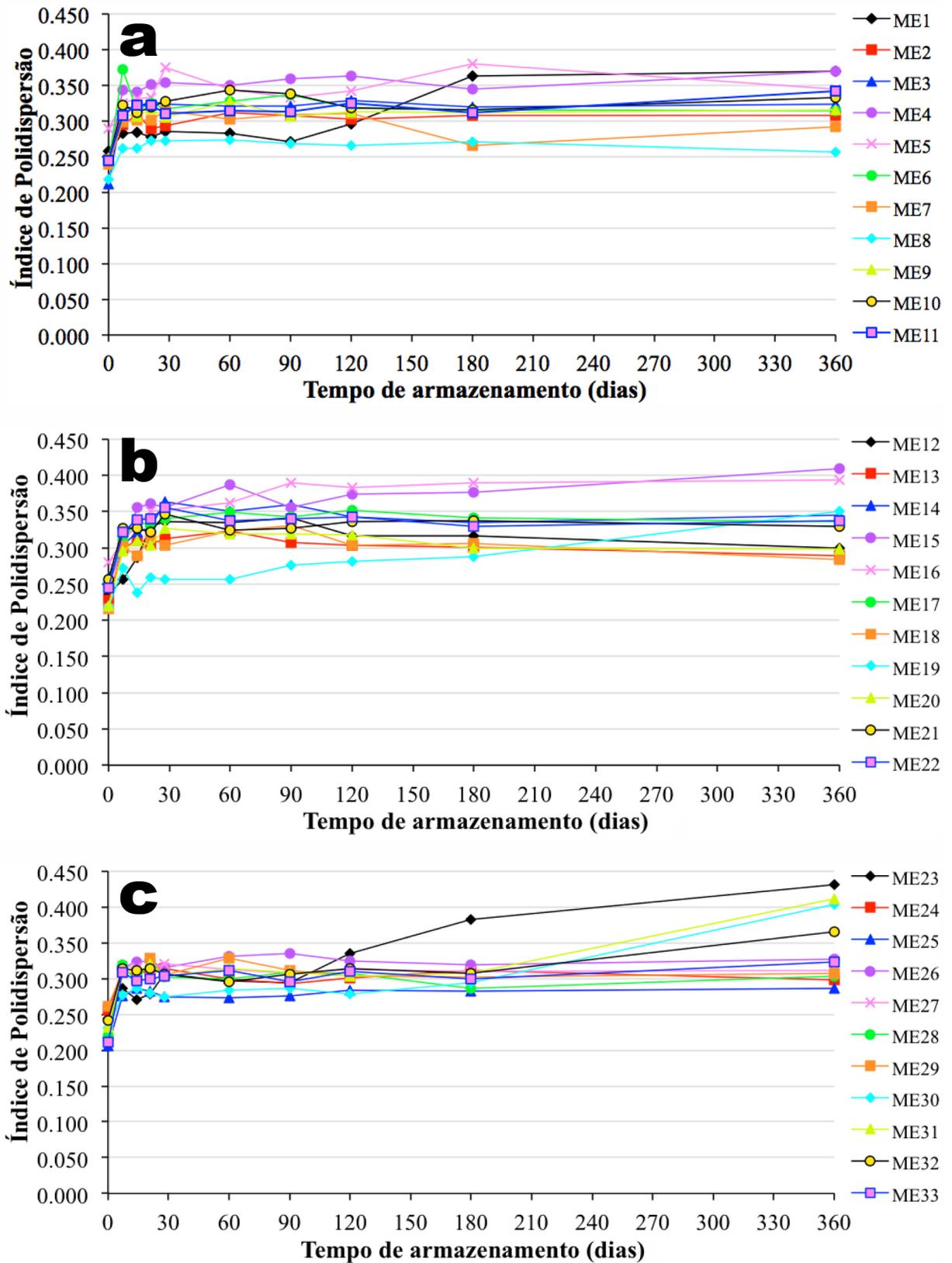
Fonte: elaboração própria.

**Figura 24.** Evolução, ao longo do tempo de armazenamento, do potencial Zeta (ZP, mV) das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para uma velocidade de homogeneização de (a) 10000 rpm, (b) 7500 rpm, e (c) 12500 rpm.



Fonte: elaboração própria.

**Figura 25.** Evolução, ao longo do tempo de armazenamento, do índice de polidispersão (PI) das várias emulsões do tipo A/O/A produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para uma velocidade de homogeneização de (a) 10000 rpm, (b) 7500 rpm, e (c) 12500 rpm.



Fonte: elaboração própria.

#### **4.6. Análise estatística da estabilidade das várias emulsões do tipo A/O/A ao longo de um período de armazenamento de seis meses a 4 °C**

Como detalhado no ponto 4.2.1. da seção de Procedimentos Experimentais, o planejamento fatorial experimental do tipo  $2 \times 2 \times 2 \times 3$  ( $2^3 \times 3^1$ ) foi desenhado e seguido para avaliar a influência de 4 fatores nas propriedades físico-químicas de emulsões do tipo A/O/A. Os fatores avaliados foram: Proteína, em 2 níveis, baixo (-1) e alto (+1); Lecitina, em 2 níveis, baixo (-1) e alto (+1); P188, em 2 níveis, baixo (-1) e alto (+1); e RPM (velocidade de homogeneização), em 3 níveis, baixo (7500 rpm), médio (10000 rpm) e alto (12500 rpm). As variáveis dependentes avaliadas (parâmetros) foram: HS (tamanho hidrodinâmico médio de partícula), ZP (potencial Zeta) e PI (índice de polidispersão).

A combinação dos níveis dos 4 fatores supramencionados resultou num total de 24 “tratamentos” (24 misturas). Adicionalmente, foram inseridos os pontos centrais dos três primeiros fatores, que combinados com os 3 níveis de velocidade resultaram em mais 3 tratamentos e que foram replicados 3 vezes. Após cada formulação ter sido produzida pela combinação dos 4 fatores, as variáveis HS, ZP e PI foram mensuradas em triplicata, para cada mistura, no tempo zero e nos 7°, 14°, 21°, 28°, 60°, 90°, 120° e 180° dias de armazenamento a 4 °C, e tomadas as médias, as quais foram utilizadas para a análise estatística da estabilidade das várias emulsões.

As análises estatísticas utilizadas foram a análise de variância (ANOVA), a qual permite avaliar quais fatores são significativos para explicar a variação de cada variável dependente (HS, ZP e HI), e o teste de Tukey, o qual permite a comparação dos tratamentos a diferentes períodos do armazenamento. O nível de significância adotado para as análises foi de 5%, isto é, um fator foi considerado significativo quando o nível descritivo (*p*-valor) para tal fator foi menor que 0,05.

##### **4.6.1. Análise gráfica de HS, PI e ZP ao longo do tempo**

A Figura 23 mostra o comportamento do parâmetro HS ao longo de um período de armazenamento de um ano a 4 °C, sendo que as análises estatísticas foram feitas para os resultados de seis meses para cada uma das combinações (ME) dos níveis de Proteína, Lecitina, P188 e velocidade de homogeneização, produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado inicialmente. Uma análise cuidadosa da Figura 23 permite observar que, para a maioria das emulsões do tipo A/O/A produzidas (ME) o parâmetro HS sofreu um aumento desde o instante inicial ( $t = 0$ ) ao tempo  $t = 28$  dias tendo estabilizado após este período temporal, com exceção das formulações ME01 e ME23 que aparentemente sofreram ainda um aumento no parâmetro HS a  $t = 180$  dias em relação aos tempos anteriores.

Relativamente ao parâmetro ZP (Figura 24), houve aparentemente uma tendência geral de aumento no valor dos valores de ZP, desde  $t = 0$  a  $t = 60$  dias, período de tempo a partir do qual parece não haver estabilidade nos valores deste parâmetro, exibindo uma tendência de sucessivos aumentos e diminuições após  $t = 60$  dias. Provavelmente devido a alterações temporais transientes na concentração de íons na superfície das nanogotas lipídicas.

Finalmente, a Figura 25 mostra o comportamento do parâmetro PI ao longo do mesmo período de armazenamento de seis meses a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para cada uma das combinações (ME) produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado inicialmente. A Figura permite observar também que, para a maioria das emulsões produzidas, o parâmetro PI sofreu um aumento desde o instante inicial ( $t = 0$ ) ao tempo  $t = 28$  dias tendo estabilizado após este período temporal, com exceção novamente das formulações ME01 e ME23 que aparentemente sofreram ainda um aumento no parâmetro PI a  $t = 180$  dias em relação aos tempos anteriores.

#### 4.6.2. Análise de variância da variável HS no 180º dia de armazenamento

Apresenta-se a seguir a análise estatística de variância do universo de formulações produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para a variável HS (tamanho hidrodinâmico médio de partícula). Os valores de “*p*-value” destacados em negrito são aqueles menores que 0,05, isto é, aqueles cujo efeito da fonte (fator ou interação) correspondente foi significativo. Dessa forma, nota-se que o fator Proteína não foi significativo e como também não houve interação significativa deste fator com os demais fatores, pode concluir-se que a Proteína não tem influência significativa na variação de HS.

Os demais fatores apresentaram interação significativa entre si, pelo que não se podem retirar conclusões de forma independente para cada fator. Assim, deve analisar-se cada um deles considerando-se o nível dos demais. O modelo linear geral utilizado foi o seguinte: HS vs. Proteína; Lecitina; P188; RPM.

**Quadro 9.** Análise estatística de variância para a variável HS no 180º dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.

Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	11303	11303	1,85	0,207
Lecitina	1	30376	30376	4,97	0,053
P188	1	13634	13634	2,23	0,170
RPM	2	116517	58259	9,52	<b>0,006</b>
Proteína * Lecitina	1	25395	25395	4,15	0,072
Proteína * P188	1	11798	11798	1,93	0,198
Proteína * RPM	2	9866	4933	0,81	0,476
Lecitina * P188	1	79962	79962	13,07	<b>0,006</b>
Lecitina * RPM	2	75279	37640	6,15	<b>0,021</b>
P188 * RPM	2	73791	36895	6,03	<b>0,022</b>
Erro	9	55059	6118		
Total	23	502980			

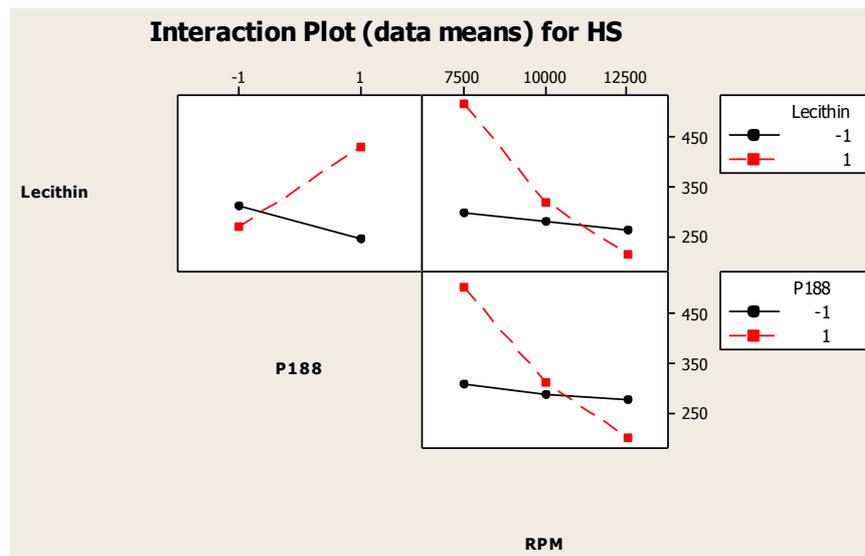
**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0.05)).

A seguir são apresentados os gráficos (Figura 26) das interações que foram significativas pela análise estatística ANOVA. Analisando a interação entre Lecitina e P188 observa-se que, para um nível baixo (-1) de P188 o nível de Lecitina que proporcionou o menor valor de HS foi o nível alto (1), enquanto que para um nível alto (1) de P188 houve inversão, isto é, o nível baixo (-1) de Lecitina foi o que proporcionou o menor valor de HS. Graficamente, observa-se que a combinação P188 (1) e Lecitina (-1) foi a que proporcionou o menor valor de HS.

Analisando a interação entre Lecitina e RPM (Figura 26), nota-se que tanto para o nível baixo como alto de Lecitina existe uma tendência em se obterem valores menores de HS conforme se aumenta o nível de RPM. Entretanto, tanto para um valor de RPM igual a 7500 rpm como para 10000 rpm, o nível baixo de Lecitina foi o que promoveu menor valor de HS, enquanto que para o valor de RPM de 12500 rpm foi o nível alto (1) de Lecitina o que proporcionou o menor valor para HS.

Analisando a interação entre P188 e RPM (Figura 26), nota-se que quanto maior o nível de RPM menores são os valores de HS e que tanto para um valor de RPM de 7500 rpm como 10000 rpm o nível baixo (-1) de P188 foi o que proporcionou os menores valores de HS, enquanto que para um valor de RPM de 12500 rpm foi o nível alto (1) de P188 o que proporcionou o menor valor de HS. Assim, conclui-se que o menor valor de HS é obtido para um valor de RPM de 12500 rpm com nível alto (1) de Lecitina.

**Figura 26.** Gráficos de interações (médias de dados) para HS, mostrando as contribuições das interações entre Proteína, Lecitina, P188 e RPM para os valores de HS.



**Fonte:** elaboração própria.

A fim de analisar qual a combinação dos três fatores (Lecitina, P188 e RPM) que forneceu o menor valor de HS, fez-se a predição dos valores de HS utilizando-se o modelo estatístico ajustado com inclusão da Proteína (Equação (7)) e também o modelo ajustado excluindo-se a Proteína (Equação (8)). Através dos resultados obtidos, constatou-se que em ambos os casos a combinação (Lecitina = -1; P188 = 1; RPM = 12500) foi a que proporcionou o menor valor predito para HS (Quadro 10).

$$HS_{\text{com Proteína}} = \text{Proteína} + \text{Lecitina} + \text{P188} + \text{RPM} + \text{Todas as interações} \quad (7)$$

$$HS_{\text{sem Proteína}} = \text{Lecitina} + \text{P188} + \text{RPM} + \text{Todas as interações sem Proteína} \quad (8)$$

**Quadro 10.** Predições dos modelos ajustados para HS, incluindo e excluindo a Proteína, considerando apenas os efeitos significativos e também o efeito principal quando o fator está envolvido numa interação significativa.

Fator			Tempo de armazenamento (d)	RPM (rpm)	Valores preditos pelo modelo com proteína	Valores preditos pelo modelo sem proteína
Proteína	Lecitina	P188				
1	-1	-1	180	7500	306,545	256,889
1	-1	1	180	7500	340,708	335,396
1	1	-1	180	7500	347,19	362,591
1	1	1	180	7500	612,238	671,984
-1	1	1	180	7500	731,73	671,984
-1	1	-1	180	7500	377,993	362,591
-1	-1	1	180	7500	330,085	335,396
-1	-1	-1	180	7500	207,233	256,889
1	-1	-1	180	10000	424,135	325,409
1	-1	1	180	10000	287,858	233,476
1	1	-1	180	10000	283,91	250,241
1	1	1	180	10000	378,518	389,194
-1	1	1	180	10000	399,87	389,194
-1	1	-1	180	10000	216,573	250,241
-1	-1	1	180	10000	179,095	233,476
-1	-1	-1	180	10000	226,683	325,409
1	-1	-1	180	12500	437,842	357,018
1	-1	1	180	12500	203,603	167,122
1	1	-1	180	12500	209,38	193,612
1	1	1	180	12500	206,025	234,603
-1	1	1	180	12500	263,18	234,603
-1	1	-1	180	12500	177,845	193,612
<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>180</b>	<b>12500</b>	<b>130,642</b>	<b>167,122</b>
-1	-1	-1	180	12500	276,193	357,018

Fonte: elaboração própria.

#### 4.6.3. Análise de variância da variável ZP no 180° dia de armazenamento

Apresenta-se a seguir a análise estatística de variância do universo de formulações produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para a variável ZP (potencial Zeta). O modelo linear geral utilizado foi o seguinte: ZP vs. Proteína; Lecitina; P188; RPM.

**Quadro 11.** Análise estatística de variância para a variável ZP no 180° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.

Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	18,71	18,71	0,98	0,348
Lecitina	1	149,25	149,25	7,84	<b>0,021</b>
P188	1	21,87	21,87	1,15	0,312
RPM	2	19,91	9,95	0,52	0,610
Proteína * Lecitina	1	30,04	30,04	1,58	0,241
Proteína * P188	1	0,86	0,86	0,05	0,836
Proteína * RPM	2	80,41	40,21	2,11	0,177
Lecitina * P188	1	3,19	3,19	0,17	0,692
Lecitina * RPM	2	10,44	5,22	0,27	0,766
P188 * RPM	2	37,75	18,87	0,99	0,408
Erro	9	171,42	19,05		
Total	23	543,85			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -value < 0.05)).

Pela análise de variância (ANOVA) representada no Quadro 11, nota-se que apenas o fator Lecitina apresentou efeito significativo para explicar a variável ZP, ou seja, apenas para a Lecitina é que os níveis (-1) e (1) influenciam de forma distinta no valor de ZP, sendo o nível baixo (-1) de Lecitina aquele que proporciona o menor valor de ZP.

#### 4.6.4. Análise de variância da variável PI no 180º dia de armazenamento

Apresenta-se a seguir (Quadro 12) a análise estatística de variância do universo de formulações produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para a variável PI (índice de polidispersão). O modelo linear geral utilizado foi o seguinte: PI vs. Proteína; Lecitina; P188; RPM.

**Quadro 12.** Análise estatística de variância para a variável PI no 180º dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.

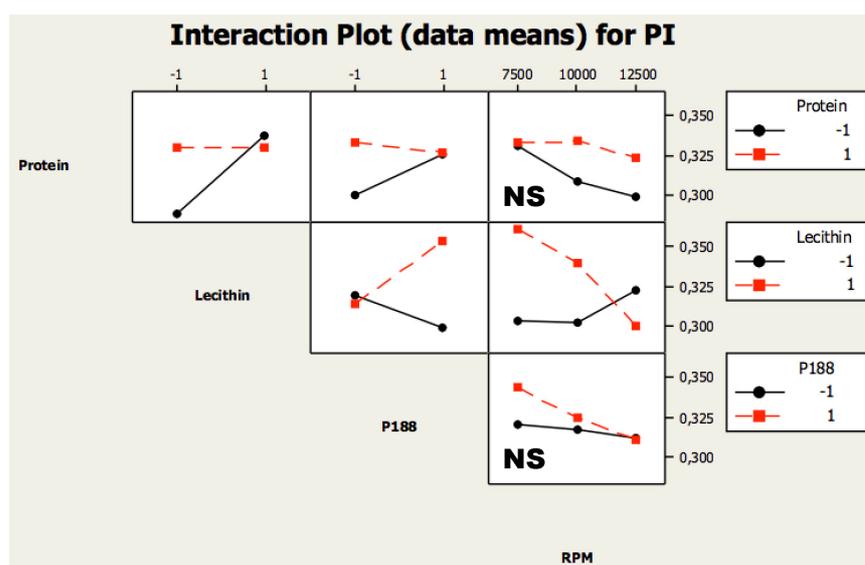
Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	0,0018027	0,0018027	6,48	<b>0,031</b>
Lecitina	1	0,0035527	0,0035527	12,76	<b>0,006</b>
P188	1	0,0005802	0,0005802	2,08	0,183
RPM	2	0,0017661	0,0008830	3,17	<b>0,091</b>
Proteína * Lecitina	1	0,0037500	0,0037500	13,47	<b>0,005</b>
Proteína * P188	1	0,0016335	0,0016335	5,87	<b>0,038</b>
Proteína * RPM	2	0,0007761	0,0003880	1,39	0,297
Lecitina * P188	1	0,0054602	0,0054602	19,61	<b>0,002</b>
Lecitina * RPM	2	0,0070406	0,0035203	12,65	<b>0,002</b>
P188 * RPM	2	0,0006001	0,0003000	1,08	0,381
Erro	9	0,0025053	0,0002784		
Total	23	0,0294673			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -value < 0.05)).

Por inspeção da análise de variância ANOVA representada no Quadro 12, observa-se que os fatores Proteína, Lecitina e RPM são significativos, bem como as interações entre Proteína e Lecitina, entre Proteína e P188, entre Lecitina e P188, e entre Lecitina e RPM. Isto é, a forma como cada fator influencia na variação de PI depende dos níveis dos demais fatores.

Os gráficos representados na Figura 27 mostram as várias interações entre os fatores. Aqueles com a sigla NS inserida, representam interações não significativas pela análise de variância ANOVA ao nível de 0,05 de probabilidade.

**Figura 27.** Gráficos de interações (médias de dados) para PI, mostrando as contribuições das interações entre Proteína, Lecitina, P188 e RPM para os valores de PI.



**Fonte:** elaboração própria. **Nota:** NS - interações não significativas.

Analisando as interações representadas na Figura 30, os valores mais baixos de PI são obtidos para as interações entre Lecitina (-1) e Proteína (-1), entre P188 (-1) e Proteína (-1), entre P188 (1) e Lecitina (-1), entre RPM (7500 ou 10000) e Lecitina (-1), e entre RPM (12500) e Lecitina (1). Analisando apenas a interação entre Proteína e Lecitina, observa-se que para um nível baixo (-1) de Lecitina o nível baixo (-1) de Proteína é o que proporciona o menor valor de PI, enquanto que para um nível alto (1) de Lecitina o nível alto (1) de Proteína é o que proporciona o menor valor de PI.

#### 4.6.5. Análise de variância da variável HS no 90° dia de armazenamento

Apresenta-se a seguir (Quadro 13) a análise estatística de variância do universo de formulações produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para a variável HS (índice de polidispersão) mensurada ao 90° dia de armazenamento das emulsões. O modelo linear geral utilizado foi o seguinte: HS vs. Proteína; Lecitina; P188; RPM.

**Quadro 13.** Análise estatística de variância para a variável HS no 90° dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.

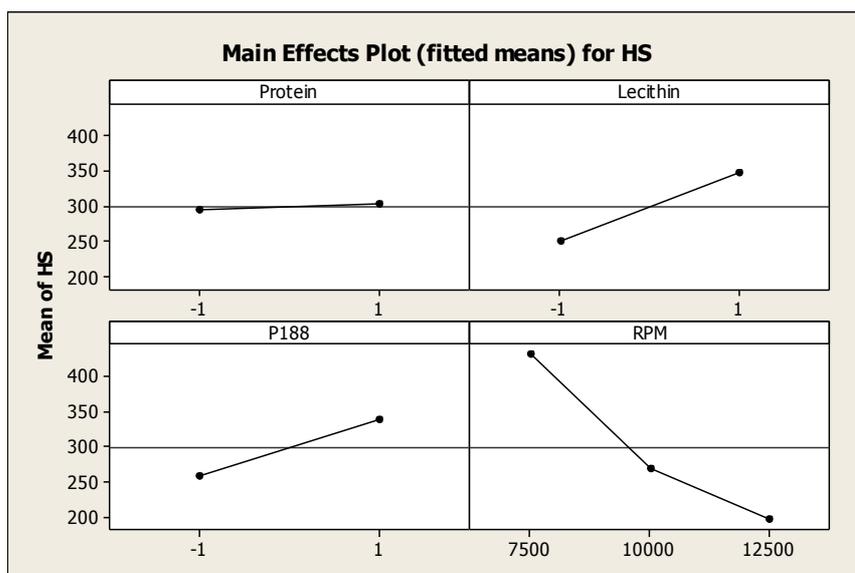
Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	586	586	0,09	0,769
Lecitina	1	56120	56120	8,74	<b>0,016</b>
P188	1	36948	36948	5,75	<b>0,040</b>
RPM	2	231022	115511	17,98	<b>0,001</b>
Proteína * Lecitina	1	5245	5245	0,82	0,390
Proteína * P188	1	4160	4160	0,65	0,442
Proteína * RPM	2	2533	1266	0,20	0,825
Lecitina * P188	1	14336	14336	2,23	0,169
Lecitina * RPM	2	11361	5681	0,88	0,446
P188 * RPM	2	16479	8240	1,28	0,324
Erro	9	57819	6424		
Total	23	436609			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0.05)).

Por inspeção da análise de variância ANOVA representada no Quadro 13 observa-se que somente o fator Proteína não influenciou na variação da variável HS. Os efeitos dos demais fatores foram todos significativos. Como não houveram interações significativas, pode retirar-se conclusões independentes para cada fator.

Por observação dos gráficos representados na Figura 28 nota-se que o nível baixo (-1) de Lecitina proporcionou o menor valor de HS, que o nível baixo (-1) de P188 também favorece a obtenção de menores valores de HS e, para RPM, à medida que se aumenta a velocidade de homogeneização obtêm-se menores valores de HS.

**Figura 28.** Gráficos dos principais efeitos (médias ajustadas) para a variável HS.



**Fonte:** elaboração própria.

#### 4.6.6. Análise de variância da variável ZP no 90° dia de armazenamento

Apresenta-se a seguir (Quadro 14) a análise estatística de variância do universo de formulações produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para a variável ZP (potencial Zeta) mensurada ao 90° dia de armazenamento das emulsões. O modelo linear geral utilizado foi o seguinte: ZP vs. Proteína; Lecitina; P188; RPM.

**Quadro 14.** Análise estatística de variância para a variável ZP no 90º dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.

Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	0,40	0,40	0,01	0,909
Lecitina	1	16,97	16,97	0,60	0,460
P188	1	0,55	0,55	0,02	0,893
RPM	2	70,91	35,46	1,24	0,333
Proteína * Lecitina	1	17,96	17,96	0,63	0,448
Proteína * P188	1	0,06	0,06	0,00	0,964
Proteína * RPM	2	79,36	39,68	1,39	0,297
Lecitina * P188	1	63,44	63,44	2,23	0,170
Lecitina * RPM	2	95,55	47,78	1,68	0,240
P188 * RPM	2	23,37	11,68	0,41	0,675
Erro	9	256,32	28,48		
Total	23	624,89			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0.05)).

Pela análise de variância (ANOVA) representada no Quadro 14, nota-se que nenhum fator apresentou efeito significativo para explicar a variável ZP, assim como não existiram quaisquer interações significativas entre os vários fatores.

#### 4.6.7. Análise de variância da variável PI no 90º dia de armazenamento

Apresenta-se a seguir (Quadro 15) a análise estatística de variância do universo de formulações produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado, para a variável PI (índice de polidispersão) mensurada ao 90º dia de armazenamento das emulsões. O modelo linear geral utilizado foi o seguinte: PI vs. Proteína; Lecitina; P188; RPM.

**Quadro 15.** Análise estatística de variância para a variável PI no 90º dia de armazenamento, usando soma dos quadrados ajustada.

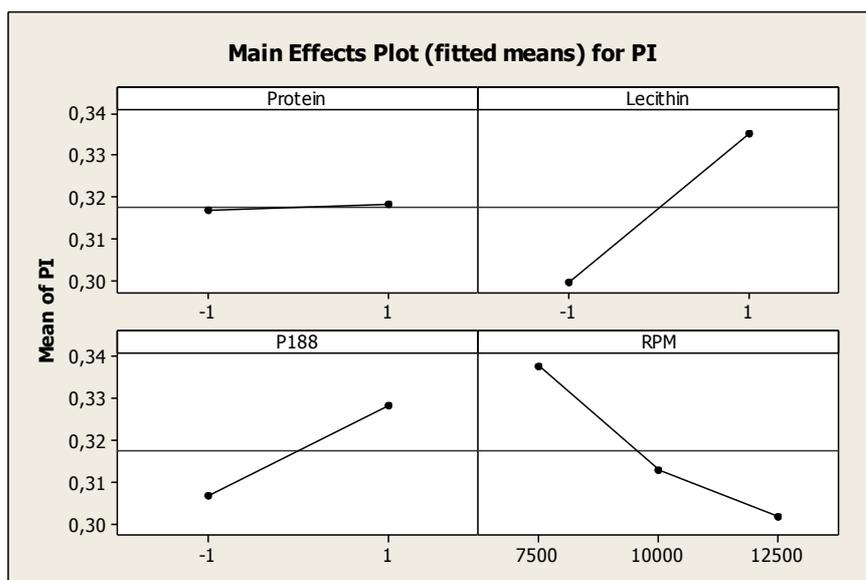
Fonte	Número de graus de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F-valor	p-valor
Proteína	1	0,0000167	0,0000167	0,03	0,862
Lecitina	1	0,0076327	0,0076327	14,69	<b>0,004</b>
P188	1	0,0028602	0,0028602	5,51	<b>0,044</b>
RPM	2	0,0054993	0,0027496	5,29	<b>0,030</b>
Proteína * Lecitina	1	0,0000807	0,0000807	0,16	0,703
Proteína * P188	1	0,0002042	0,0002042	0,39	0,546
Proteína * RPM	2	0,0001156	0,0000578	0,11	0,896
Lecitina * P188	1	0,0000082	0,0000082	0,02	0,903
Lecitina * RPM	2	0,0018631	0,0009315	1,79	0,221
P188 * RPM	2	0,0001301	0,0000650	0,13	0,884
Erro	9	0,0046755	0,0005195		
Total	23	0,0230860			

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0.05)).

Pela análise de variância (ANOVA) representada no Quadro 15, verifica-se que os fatores Lecitina, P188 e RPM foram significativos ao nível de 5% de probabilidade. Ou seja, esses três fatores contribuem para explicar a variação da variável PI. Como não houveram efeitos significativos das interações, pode retirar-se conclusões de forma independente para cada fator.

Por observação dos gráficos representados na Figura 29, nota-se que os níveis baixos (-1) de Lecitina e P188 favorecem de forma independente a obtenção de menores valores de PI, enquanto que em relação ao fator RPM, um aumento no seu valor promove uma tendência para se obterem menores valores de PI.

**Figura 29.** Gráficos dos principais efeitos (médias ajustadas) para a variável PI.



**Fonte:** elaboração própria.

#### 4.6.8. Comparação das médias da ME25 com as demais no instante zero pelo Teste de Tukey

Ao identificar a existência de diferenças significativas entre os conjuntos de dados analisados, pela análise de variância ANOVA, utilizou-se o teste de Tukey que permite detalhar e avaliar essa diferença, sendo possível identificar quais médias são ou não estatisticamente diferentes entre os tratamentos. Assim, comparou-se a emulsão considerada ótima (de código ME25; nível alto (1) de Proteína, nível alto (1) de Lecitina, nível baixo (-1) de P188, e nível alto de RPM) com todas as outras emulsões produzidas de acordo com o planejamento fatorial desenhado. Os testes de comparações múltiplas, ou testes de comparações de médias, dos quais o teste de Tukey é dos mais utilizados por ser bastante rigoroso e de fácil aplicação, servem como um complemento do teste  $F$ , para detectar diferenças entre os tratamentos. Assim, o teste de Tukey é utilizado para testar todo e qualquer contraste entre duas médias. Tem no entanto uma limitação, não permitindo comparar grupos de médias (tratamentos) entre si. O teste de Tukey é, assim, um teste exato em que, para o conjunto de todas as comparações duas a duas, a taxa de erro do conjunto dos testes é exatamente  $\alpha$  (e o intervalo de confiança é exatamente  $1-\alpha$ ). Métodos de comparações múltiplas, exatos como o teste de Tukey, são raros. É aplicado quando o teste “F” para tratamentos da análise de variância ANOVA for significativo.

O teste de Tukey tem como base o cálculo da DMS (Diferença Mínima Significativa), a qual é calculada da seguinte forma (Equação (9)):

$$DMS = q_{Tukey}(1 - \alpha; N; k - 1) \times \sqrt{\frac{QMres}{k}} \quad (9)$$

onde  $DMS$  é a diferença mínima significativa,  $q_{Tukey}$  é um valor tabelado (tabela do teste de Tukey),  $\alpha$  é o nível de significância,  $N$  é o número de tratamentos (médias),  $k-1$  é o número de graus de liberdade,  $k$  é o número de replicatas para cada tratamento (média), e  $QMres$  é o quadrado médio dos resíduos.

#### 4.6.8.1. Comparação das médias de HS

O teste de Tukey foi realizado utilizando o software R (R Development Core Team, 2015), versão 3.2.2. Para isso, adotou-se o nível de significância de 5% e obteve-se uma diferença mínima significativa (DMS) a esse nível de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \text{SQRT}(QMresHS/3) = 54,87978$ . Nesta expressão de cálculo, temos um nível de significância de 5%, 24 tratamentos (médias) em comparação, e 2 graus de liberdade (pois temos 3 repetições).

Isso indica que, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, dois tratamentos cuja **diferença de médias de HS seja maior que 54,88** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 16), as diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 16.** Diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero.

Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
51,38		48,29		39,57		<b>58,39</b>		<b>93,65</b>		34,11	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
<b>58,11</b>		7,72		24,27		8,02		9,67		49,29	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
50,87		14,93		15,49		22,67		45,48		18,81	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,00		33,33		11,72		26,70		7,49		36,61	

(Nota: os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Fonte: elaboração própria.

Por análise das diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (Quadro 16), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero do armazenamento, a média de HS do tratamento t19 (emulsão ME25) só é estatisticamente diferente das ME04, ME05 e ME07. Estatisticamente, todos os demais tratamentos são iguais à ME25 para o instante zero do armazenamento.

#### 4.6.8.2. Comparação das médias de PI

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QM_{res}PI/3} = 0,16392$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de PI seja maior que 0,16** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 17), as diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 17.** Diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero.

Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
0,030		0,022		0,053		0,042		0,074		0,045	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
0,010		0,012		0,051		0,040		0,005		0,035	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
0,083		0,035		0,033		0,012		0,038		0,050	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,000		0,009		0,030		0,015		0,056		0,025	

(Nota: os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Fonte: elaboração própria.

Por análise das diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 17), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero do armazenamento, nota-se que não houve diferença significativa entre o tratamento t19 (emulsão ME25) e os demais tratamentos quanto aos níveis de PI, isto é, estatisticamente, todos os tratamentos são iguais para o instante zero do armazenamento.

#### 4.6.8.3. Comparação das médias de ZP

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QM_{resZP}/3} = 25,72882$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de ZP seja maior que 25,73** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 18), as diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 18.** Diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero.

Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
3,58		3,86		0,91		1,91		2,25		2,37	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
2,06		0,29		5,78		10,11		10,77		10,04	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
7,64		4,05		1,38		7,56		8,22		8,20	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,00		3,58		3,98		2,00		12,28		4,32	

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 18), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante zero do armazenamento, nota-se que não houve diferença significativa entre o tratamento t19 (emulsão ME25) e os demais tratamentos quanto aos níveis de ZP, isto é, estatisticamente, todos os tratamentos são iguais para o instante zero do armazenamento.

#### 4.6.9. Comparação das médias da ME25 com as demais no instante 90 dias pelo Teste de Tukey

##### 4.6.9.1. Comparação das médias de HS

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QM_{resHS}/3} = 356,1818$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de HS seja maior que 356,18** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 19), as diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 19.** Diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias.

Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
286,57		157,80		160,23		<b>389,04</b>		<b>494,99</b>		188,79	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
193,85		26,13		26,94		24,47		55,85		241,86	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
132,95		85,72		50,85		25,48		28,23		11,20	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,00		12,24		29,25		45,62		26,76		30,80	

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 19), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias do armazenamento, a média de HS do tratamento t19 (emulsão ME25) só é estatisticamente diferente das ME04 e ME05. Estatisticamente, todos os demais tratamentos são iguais à ME25 para o instante 90 dias do armazenamento.

#### 4.6.9.2. Comparação das médias de PI

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS=q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QMresPI/3}=0,18620$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de PI seja maior que 0,19** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 20), as diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 20.** Diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias.

Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
0,065		0,032		0,083		0,080		0,114		0,066	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
0,055		0,000		0,005		0,031		0,045		0,083	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
0,057		0,060		0,033		0,008		0,018		0,017	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,000		0,059		0,032		0,033		0,036		0,010	

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 20), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias do armazenamento, nota-se que não houve diferença significativa entre o tratamento t19 (emulsão ME25) e os demais tratamentos quanto aos níveis de PI, isto é, estatisticamente, todos os tratamentos são iguais para o instante 90 dias do armazenamento.

#### 4.6.9.3. Comparação das médias de ZP

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS=q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QMresZP/3}=27,86568$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de ZP seja maior que 27,87** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 21), as diferenças de médias de ZP

entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 21.** Diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias.

Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
3,62		4,99		1,20		7,15		7,96		2,70	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
2,43		2,13		0,17		0,89		2,12		5,04	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
5,26		0,50		4,02		18,98		8,46		2,10	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,00		0,81		5,20		5,82		6,23		0,20	

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 21), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 90 dias do armazenamento, nota-se que não houve diferença significativa entre o tratamento t19 (emulsão ME25) e os demais tratamentos quanto aos níveis de ZP, isto é, estatisticamente, todos os tratamentos são iguais para o instante 90 dias do armazenamento.

#### 4.6.10. Comparação das médias da ME25 com as demais no instante 180 dias pelo Teste de Tukey

##### 4.6.10.1. Comparação das médias de HS

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QM_{resHS}/3} = 230,28540$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de HS seja maior que 230,29** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 22), as diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 22.** Diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias.

Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
110,96		137,88		107,92		<b>457,48</b>		<b>542,42</b>		168,89	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
84,54		58,75		<b>285,27</b>		16,69		44,37		<b>235,65</b>	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
142,49		63,92		58,07		34,70		<b>271,82</b>		10,59	
Tratamentos (t <sub>i</sub> )											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,00		3,18		21,68		39,13		3,26		2,13	

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de HS entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 22), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias do armazenamento, a média de HS do tratamento t19 (emulsão ME25) é estatisticamente diferente apenas das emulsões ME04, ME05, ME12, ME15, e ME23, sendo a média de HS de ME25 sempre a menor. Estatisticamente, todos os demais tratamentos são iguais à ME25 para o instante 180 dias do armazenamento.

#### 4.6.10.2. Comparação das médias de PI

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QM_{resPI}/3} = 0,17682$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de PI seja maior que 0,18** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 23), as diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 23.** Diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias.

<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
0,035		0,019		0,053		0,095		0,108		0,059	
<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
0,024		0,006		0,081		0,025		0,038		0,062	
<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
0,098		0,033		0,016		0,011		0,100		0,029	
<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,000		0,037		0,028		0,005		0,020		0,012	

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de PI entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 23), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias do armazenamento, nota-se que não houve diferença significativa entre o tratamento t19 (emulsão ME25) e os demais tratamentos quanto aos níveis de PI, isto é, estatisticamente, todos os tratamentos são iguais para o instante 180 dias do armazenamento.

#### 4.6.10.3. Comparação das médias de ZP

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 24; 2) \times \sqrt{QM_{resZP}/3} = 20,97765$ . Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de ZP seja maior que 20,98** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 24), as diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25: Proteína (1), Lecitina (1), P188 (-1), RPM (12500)) com os demais tratamentos, visto que esse tratamento foi o que apresentou os melhores resultados nas análises de variância ANOVA para as três variáveis (HS, PI e ZP).

**Quadro 24.** Diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias.

<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t1	ME01	t2	ME02	t3	ME03	t4	ME04	t5	ME05	t6	ME06
4,89		11,77		3,47		5,61		4,41		7,84	
<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t7	ME07	t8	ME08	t9	ME12	t10	ME13	t11	ME14	t12	ME15
8,60		9,47		12,77		8,85		0,31		2,03	
<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t13	ME16	t14	ME17	t15	ME18	t16	ME19	t17	ME23	t18	ME24
7,95		16,66		16,10		8,74		13,99		11,08	
<b>Tratamentos (t<sub>i</sub>)</b>											
t19	ME25	t20	ME26	t21	ME27	t22	ME28	t23	ME29	t24	ME30
0,00		9,20		6,35		0,81		13,45		4,16	

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de ZP entre o tratamento t19 (i.e., ME25) com os demais tratamentos (ver Quadro 24), pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, para o instante 180 dias do armazenamento, nota-se que não houve diferença significativa entre o tratamento t19 (emulsão ME25) e os demais tratamentos quanto aos níveis de ZP, isto é, estatisticamente, todos os tratamentos são iguais para o instante 180 dias do armazenamento.

#### 4.6.11. Comparação das médias do tratamento t19 (emulsão do tipo A/O/A ME25) entre os tempos 0, 90 e 180 dias, pelo Teste de Tukey

A emulsão ME25 (t19) foi comparada com ela própria, em termos de médias de HS, PI e ZP, entre os tempos 0 e 90 dias, entre 90 e 180 dias, e entre 0 e 180 dias. Assim, considerando apenas os dados relativos à emulsão ME25, tal como explicitado na Quadro 25, aplicou-se novamente o teste de Tukey, permitindo retirar conclusões à cerca da estabilidade da emulsão ME25 ao longo do período de armazenamento considerado.

**Quadro 25.** Médias (n=3) de HS, PI e ZP, e desvios-padrão associados, para a emulsão ME25 (t19), utilizadas no teste de Tukey ao nível de significância de 5%, para os tempos de armazenamento de 0, 90 e 180 dias.

Tempo de armazenamento (d)	HS (nm)		PI		ZP (mV)	
	$\bar{HS}$	$\sigma_{HS}$	$\bar{PI}$	$\sigma_{PI}$	$\bar{ZP}$	$\sigma_{ZP}$
0	186,20	2,62	0,206	0,014	-36,45	0,93
90	193,59	2,23	0,276	0,008	-28,16	2,45
180	198,11	2,56	0,282	0,010	-36,15	2,35

**Fonte:** elaboração própria.

#### 4.6.11.1. Comparação das médias de HS

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS = q_{Tukey}(0,95; 3; 2) \times \sqrt{QM_{resHS}/3} = 11,90875$ , em que  $QM_{resHS} = \sum(\sigma_{HS}^2)/3$ . Nesta expressão de cálculo, temos um nível de significância de 5%, 3 tratamentos (tempos) em comparação, e 2 graus de liberdade (pois temos 3 repetições). Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de HS seja maior que 11,91** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 26), as diferenças de médias de HS entre os tempos 0, 90 e 180 dias.

**Quadro 26.** Quadro matricial das diferenças de médias de HS entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

		Tratamentos (tempos)		
		0	90	180
Tratamentos (tempos)	0	0,00	7,39	11,91
	90	7,39	0,00	4,52
	180	11,91	4,52	0,00

(Nota: os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

**Fonte:** elaboração própria.

Por análise das diferenças de médias de HS da emulsão ME25 entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, nota-se que não houve diferença estatística significativa entre os tempos 0, 90 e 180, quanto às médias da variável HS.

#### 4.6.11.2. Comparação das médias de PI

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS=q_{Tukey}(0,95; 3; 2) \times \sqrt{QM_{resPI}/3} = 0,052689$ , em que  $QM_{resPI} = \sum(\sigma_{PI}^2)/3$ . Nesta expressão de cálculo, temos um nível de significância de 5%, 3 tratamentos (tempos) em comparação, e 2 graus de liberdade (pois temos 3 repetições). Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de HS seja maior que 0,053** podem ser considerados estatisticamente distintos. São apresentadas a seguir (ver Quadro 27), as diferenças de médias de PI entre os tempos 0, 90 e 180 dias.

**Quadro 27.** Quadro matricial das diferenças de médias de PI entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

		Tratamentos (tempos)		
		0	90	180
Tratamentos (tempos)	0	0,000	<b>0,070</b>	<b>0,076</b>
	90	<b>0,070</b>	0,000	0,006
	180	<b>0,076</b>	0,006	0,000

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de PI da emulsão ME25 entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, nota-se que existe diferença estatística significativa somente entre os tempos 0 e 90 dias e entre 0 e 180 dias, quanto às médias da variável PI, não existindo diferença estatística significativa entre 90 e 180 dias.

#### 4.6.11.3. Comparação das médias de ZP

Pelo teste de Tukey, a DMS obtida ao nível de 5% de significância foi de  $DMS=q_{Tukey}(0,95; 3; 2) \times \sqrt{QM_{resZP}/3} = 9,77459$ , em que  $QM_{resZP} = \sum(\sigma_{ZP}^2)/3$ . Nesta expressão de cálculo, temos um nível de significância de 5%, 3 tratamentos (tempos) em comparação, e 2 graus de liberdade (pois temos 3 repetições). Ou seja, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, tratamentos cuja **diferença de médias de ZP seja maior que 9,77** podem ser considerados estatisticamente distintos.

São apresentadas a seguir (Quadro 28), as diferenças de médias de ZP entre os tempos 0, 90 e 180 dias.

**Quadro 28.** Quadro matricial das diferenças de médias de ZP entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

		Tratamentos (tempos)		
		0	90	180
Tratamentos (tempos)	0	0,00	8,29	0,30
	90	8,29	0,00	7,99
	180	0,30	7,99	0,00

**Fonte:** elaboração própria. (**Nota:** os valores em **negrito** são estatisticamente significativos ao nível de significância de 5%.)

Por análise das diferenças de médias de ZP da emulsão ME25 entre os tratamentos (tempos) 0, 90 e 180 dias, pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, nota-se que não houve diferenças estatísticas significativas entre os tempos 0, 90 e 180, quanto às médias da variável ZP.

Assim, pelas análises de variância ANOVA realizadas às médias das variáveis HS, PI e ZP, associadas aos resultados obtidos por realização do teste de Tukey às diferenças entre as médias da emulsão ótima ME25 com todas as demais, ao longo do período de armazenamento, e entre as médias da emulsão ótima ME25 com ela própria, aos tempos 0 e 90 dias, 90 e 180 dias, e 0 e 180 dias, pode concluir-se que a emulsão ME25 é estável durante um período de tempo alargado sob condições de refrigeração.

## 5. CONCLUSÕES

A partir do planejamento fatorial experimental desenhado e utilizado na preparação das várias emulsões do tipo A/O/A, assim como das análises estatísticas utilizadas para analisar os resultados obtidos, conseguiu-se verificar como os vários fatores influenciaram nas características físico-químicas das formulações, analisando cada variável dependente, e quais fatores proporcionam a produção de uma emulsão múltipla ótima. Assim, a partir da análise estatística realizada, pode concluir-se que a formulação ótima para encapsulação de entidades proteicas é a Emulsão ME25, produzida com uma velocidade de homogeneização de 12500 rpm.

Tendo em vista a utilização pretendida para este tipo de formulações, isto é, a estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas para veiculação destas (bio)macromoléculas em aplicações (bio)farmacêuticas, os componentes das emulsões do tipo A/O/A foram selecionados com base nas suas características de funcionalidade, plasticidade e atoxicidade. Também, o processo utilizado de dupla-emulsificação com velocidade elevada de homogeneização foi selecionado com base em experiência anterior do grupo de pesquisa i(bs)<sup>2</sup>.

Parâmetros processuais críticos tais como as concentrações de proteína e dos emulsificantes lipofílico e hidrofílico, e a velocidade de homogeneização, foram estabelecidas como sendo 0,015% (m/m) de entidade proteica (nível superior, +1), 0,75% (m/m) de emulsificante lipofílico (lecitina de soja) (nível superior, +1) e 0,50% (m/m) de emulsificante hidrofílico (poloxâmico 188) (nível inferior, -1), e 12500 rpm (nível superior, +1). Assim, o planejamento fatorial estatístico levou à produção de uma emulsão do tipo A/O/A ótima possuindo partículas essencialmente homogêneas com tamanho hidrodinâmico médio (n=3) de  $(186,2 \pm 2,6)$  nm e potencial Zeta médio igual a  $(-36,5 \pm 0,9)$  mV, e exibindo um índice de polidispersividade igual a  $0,206 \pm 0,014$ . As variáveis de resposta HS, PI e ZP não exibiram qualquer correlação entre si, pelo que puderam ser analisadas individualmente, isto é, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada uma delas.

Estas variáveis foram críticas para a produção de dispersões estáveis de nanobalões lipídicos com núcleo aquoso, permitindo a estabilização da emulsão por 180 dias em armazenamento a 4 °C, resultado este comprovado através das análises estatísticas realizadas, estabilidade que se manteve até ao período alargado de 360 dias.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no conjunto de resultados obtidos neste trabalho de pesquisa e sua análise estatística, a emulsão do tipo A/O/A ME25 foi a mais adequada para veiculação de entidades proteicas macromoleculares, tanto em termos de tamanho das nanogotas lipídicas com núcleo aquoso, como em termos do seu potencial Zeta, com implicações diretas na estabilidade da emulsão. A partir deste resultado, dar-se-á continuidade ao projeto de pesquisa, utilizando a formulação otimizada estatisticamente para encapsular partículas bacteriofágicas estritamente líticas para *Pseudomonas aeruginosa*, caracterizando tal formulação tanto do ponto de vista físico-químico como de atividade antibacteriana e citotoxicidade e genotoxicidade. A emulsão do tipo A/O/A será depois utilizada na forma farmacêutica de solução isotônica para aplicação por nebulização, almejando o desenvolvimento de um sistema terapêutico para o tratamento de pneumonia bacteriana.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI, S. et al. Preparation of water-in-oil-in-water (W/O/W) type microcapsules by a single-droplet-drying method and change in encapsulation efficiency of a hydrophilic substance during storage. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 67, n. 6, p. 1376-1381, 2003.
- AKHTAR, M.; DICKINSON, E. Water-in-oil-in-water multiple emulsions stabilized by polymeric and natural emulsifiers. In: DICKINSON, E.; MILLER, R. **Food Colloids: Fundamentals of Formulation**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p. 133-143, 2001.
- AKHTAR, N.; YAZAN, Y. Formulation and characterization of a cosmetic multiple emulsion system containing macadamia nut oil and two antiaging agents. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 173-185, 2005.
- AKHTAR, N. et al. Formulation and characterization of a multiple emulsion containing 1% l-ascorbic acid. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2010.
- ALLOUCHE, J. et al. Single- and Two-Step Emulsification to Prepare a Persistent Multiple Emulsion with a Surfactant-Polymer Mixture. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 3982-3988, 2003.
- ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 478-490, 2007.
- ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. **Journal Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.
- ARAKAWA, T. et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 10, p. 1-28, 1993.
- ARAKAWA, T. et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 307-326, 2001.
- ATUL, P.; MITALI, B. Self double emulsifying drug delivery system (sdedds): a review. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 2, n. 6, p. 124-127, 2012.
- BALCÃO, V. M. et al. Design of a lipid nanovesicle system encapsulating bacteriophages integrated in a multiple emulsion formulation: a proof-of-concept, In: **Nanotechnology 2010: Bio Sensors, Instruments, Medical, Environment and Energy – Technical Proceedings of the 2010 NSTI**

**Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2010, June 21-24, 2010, Anaheim CA, USA**, Chapter 7: Nano Medical Sciences; NSTI-Nanotech 2010, v. 3, p. 459-462, 2010.

BALCÃO, V. M.; AMORIM, L. R. **Biotecnologia – Protocolos Laboratoriais para Ciências da Saúde [Biotechnology – Laboratory Protocols for Health Sciences]**, Fundação Fernando Pessoa Publishers, Porto, Portugal, 2012.

BALCÃO, V. M. et al. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 425-431, 2013.

BALCÃO, V. M. et al. Biomimetic aqueous-core lipid nanoballoons integrating a multiple emulsion formulation: a suitable housing system for viable lytic bacteriophages. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 478-485, 2014.

BALCÃO, V. M. et al. Water-in-Oil-in-Water nanoencapsulation systems, In: **Microencapsulation and Microspheres for Food Applications**, Leonard Sagis (Ed.), Elsevier, Ch. 6, p. 95-129; 2015.

BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, pp. 25-41, 2015.

BATES, D. M.; WATTS, D. G. **Nonlinear Regression Analysis and its Applications**. Wiley Interscience, New York, U.S.A. 1998.

BECHER, P. **Emulsions: Theory and Practice**. 2nd Ed. New York: Reinhold, 1965.

BECKTEL, W. J.; SCHELLMAN, J.A. Protein stability curves. **Biopolymers**, v. 26, p. 1859-1877, 1987.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Polyols, high pressure, and refractive indices equalization for improved stability of W/O emulsions for food applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 22, n 2&3, p. 269-280, 2001.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 23, n. 1-3, p. 93-123, 2002.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. **Advances in Colloid and Interface Science**, n. 108-109, p. 29-41, 2004.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Oil-in-water-in-oil double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide conjugates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 297, n. 1-3, p. 211-220, 2007.

BOBIN, M.-F.; MICHEL, V.; MARTINI, M.-C. Study of formulation and stability of emulsions with polymeric emulsifiers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 53-58, 1999.

BONNET, M. et al. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 92-101, 2009.

BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. (Eds.). **Empirical model-building and response surfaces**. Wiley, New York, U.S.A, 1987.

BOYD, J.; PARKINSON, C.; SHERMAN, P. Factors affecting emulsion stability and the HLB concept. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 41, n. 2, p. 359-370, 1972.

BRODIN, A. F.; FRANK, S. G. Drug release from o/w/o multiple emulsion systems. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v. 15, n. 2, p. 111-118, 1978.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**: 379-402, 2007.

BURGAUD, I.; DICKINSON, E.; NELSON, P. An improved high-pressure homogenizer for making fine emulsions on a small scale. **International J. of Food Science & Technology**, v. 25, p. 39-46, 1990.

BUSZEWSKI, B.; BOCIAN, S.; DZIUBAKIEWICZ, E. Zeta potential determinations, a new way of stationary phases characterization for liquid chromatography, **J. Sep. Sci**, v. 33, n. 11, p.1529-1537, 2010.

CAI, P.-J. et al. Fabrication of polystyrene hollow spheres in W/O/W multiple emulsions. **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, p. 10-12, 2010.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable O/W emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.

CHAN, B.K.; ABEDON, S. T. Phage therapy pharmacology: phage cocktails, Ch. 1, In: ALLEN I. LASKIN, SIMA SARIASLANI and GEOFFREY M. GADD (Eds) **Advances in Applied Microbiology**, vol. 78, Academic Press, p. 1-23, 2012.

CHO, H. K.; CHO, J. H.; CHEONG, I. W. Effects of Biodegradable Triblock Copolymers on the Microencapsulation of Ascorbic Acid-2-Glucoside in W1/O/W2 Multi-Emulsions. **Macromolecular Symposia**, v. 249-250, p. 96-102, 2007.

CORIN, K. C.; O'CONNOR, C. T. A proposal to use excess Gibbs energy rather than HLB number as an indicator of the hydrophilic–lipophilic behavior of surfactants. **Minerals Engineering**, v. 58, p. 17-21, 2014.

CSÓKA, I.; ERÖS, I. Stability of multiple emulsions I. Determination of factors influencing multiple drop breakdowns. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 119-123, 1997.

DANNER, T.; SCHUBERT, H. Coalescence processes in emulsions. In: DICKINSON, E. AND MILLER, R. **Food Colloids: Fundamentals of Formulation**. Royal Society of Chemistry, p. 116-124, 2001.

DAVIS, S. S.; WALKER, I. M. Multiple emulsions as targetable delivery systems. **Methods in Enzymology**, v. 149, p. 51–64, 1987.

DAVIS, S. S.; HADGRAFT J.; PALIN, K. J. Medical and Pharmaceutical Applications of Emulsions. In: BECHER P. **Encyclopedia of Emulsion Technology**, p.159-238, 1985.

DICKINSON, E.; STAINSBY, G. Emulsion Stability, In: DICKINSON, E.; STAINSBY (Eds.) **Advances in Food Emulsions and Foams**. London: Elsevier, p. 1-25, 1988.

DICKINSON, E; GOLDING, M. Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 1, p. 13-18, 1997.

DICKINSON, E.; GALAZKA, V. B.; ANDERSON, D. M. W. Emulsifying behavior of Gum Arabic. Part 1: effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. **Carbohydrate Polymers**, v. 14, p. 373-384, 1991a.

DICKINSON, E.; GALAZKA, V.; ANDERSON, D. M. W. Emulsifying behavior of gum-arabic. part 2. effect of the gum molecular-weight on the emulsion droplet-size distribution. **Carbohydrate Polymers**, v. 14, n. 4, p. 385-392, 1991b.

DICKINSON, E. Proteins at interfaces and in emulsions: Stability, rheology and interactions. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 94, n. 12, p. 1657- 1669, 1998.

DICKINSON, E.; McCLEMENTS, D.J. Water-in-oil-in-water multiple emulsions, In: E. DICKINSON AND D, J. McCLEMENTS (Eds.) **Advances in Food Colloids**. Cambridge: Blackie academic & Professional, p. 280-300, 1996.

DICKINSON, E.; EVISON, J.; OWUSU, R.; ZHU, Q. Studies of water-in-oil-in- water (w/o/w) multiple emulsions: stabilization and controlled nutrient release, In: DICKINSON, P. WALSTRA (Eds.). **Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties**. London: Royal Society of Chemistry, p. 276-279, 1993.

DICKINSON, E. et al. Protein-stabilized water-in-oil-in-water emulsions, In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. (Eds.) **Gums and Stabilizers for the Food Industry**. New York: Oxford University Press, p. 91-101, 1994.

DOSTER, W.; SETTLES, M. Protein-water displacement distributions. **Biochimica et Biophysical Acta**, v. 1749, p. 173-186, 2005.

EINHORN-STOLL, U.; WEISS, M.; KUNZEK, H. Influence of the emulsion components and preparation method on the laboratory-scal preparation of O/W emulsions containing different types of dispersed phases and/or emulsifiers, **Nahrung/Food**, v. 46, n. 4, p. 294-301, 2002.

ELEY, D.; HEY, M.; SYMONDS, J. Emulsions of water in asphaltene-containing oils. 1. Droplet size distribution and emulsification rates. **Colloids and Surfaces**, v. 32, p. 87-101, 1988.

ERDAL, M. S.; ARAMAN, A. Development and evaluation of multiple emulsion systems containing cholesterol and squalene. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 105-121, 2006.

ESCHENBACHER, W. L.; BOUSHEY, H. A.; SHEPPARD, D. Alterations in osmolarity of inhaled aerosols cause bronchoconstriction and cough, but absence of a permeant anion causes cough alone. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 129, pp. 211–215, 1984.

FARAHMAND, S.; TAJERZADEH, H.; FARBOUD, E. Formulation and evaluation of vitamin C multiple emulsion. **Pharmaceutical Development**, v.11, p. 255-261, 2006.

FENNEMA, O. **Food Chemistry**. Third Edition. New York: CRC Press, 1996.

FLORENCE, A. T.; WHITEHILL, D. The formulation and stability of multiple emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 11, p. 277-308, 1982.

FLORENCE, A. T.; WHITEHILL, D. Stabilization of water-in-oil-in-water multiple emulsions. In: SHAR, D. **Macro and Micro Emulsions: Theory and Application**. Washington: American Chemical Society, p. 359-380, 1985.

FLOURY, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 1285-1294, 2004.

FOSS, T. R. et al. Kinetic stabilization of the native state by protein engineering: implications for inhibition of transthyretin amyloidogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, p. 841-854, 2005.

FRASCH-MELNIK, S.; SPYROPOULOS, F.; NORTON, I. T. W1/O/W2 double emulsions stabilized by fat crystals – formulation, stability and salt release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, p. 178-185, 2010.

FRENKEL, M.; SHWARTZ, R.; GARTI, N. Multiple emulsions I. Stability: Inversion, apparent and weighted HLB. **Journal Colloid Interface Science**, v. 94, n. 1, p. 174-178, 1983.

FREUDIG, B.; TESCH, S.; SCHUBERT, H. Production of emulsions in high-pressure homogenizers: Influence of cavitation on droplet breakup. **Engineering in Life Science**, v. 3, n. 6, p. 266-270, 2003.

GARCÍA-FUENTES, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27, p. 159-168, 2003.

GARTI, N. Double emulsions - scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123-124, p. 233- 246, 1997a.

GARTI, N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 222-235, 1997b.

GARTI, N.; BISPERINK, C. Double emulsions: progress and applications. **Current Opinion Colloid Interface Science**, v.3, p. 657-667, 1998.

GARTI, N.; FRENKEL, M.; SCHWARTZ, R. Multiple Emulsions, Part II: Proposed Technique to Overcome Unpleasant Taste of Drugs. **Journal Dispersion Science Technology**, v. 4, p. 237–252, 1983.

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsions and microemulsions, In: BENITA, S. **Microencapsulation - Methods and Industrial Applications**. New York: Marcel Dekker, p. 411-534, 1996a.

GARTI, N.; ASERIN, A. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 65, p. 37-69, 1996b.

GEIGER, S. et al. Kinetics of swelling-breakdown of a W/O/W multiple emulsion: possible mechanisms for the lipophilic surfactant effect. **Journal Controlled Release**, v. 52, p. 99-107, 1998.

GHEORGHE, A.; STOICA, A.; FLOAREA, O. Emulsion liquid membranes stability, **Scientific Bulletin-University Politehnica of Bucharest**, Series B, v. 70, n. 3, p. 23-30, 2008.

GHOSH, S. Formulation and Characterisation of Multiple Emulsions With Various Additives. **Int. J. Res. Pharm. Biomedical Science**, v. 2, n. 2, p. 751-759, 2011.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". **Journal Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, n. 5, p. 311-326, 1949.

GRIFFIN, W. C. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. **Journal Society of Cosmetic Chemists**, v. 5, n. 4, p. 249-256, 1954.

GUO, X.; RONG, Z.; YING, X. Calculation of hydrophile-lipophile balance for polyethoxylated surfactants by group contribution method. **Journal Colloid Interface Science**, v. 298, p. 441-450, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, p. 245-251, 2008.

HAMILTON, R. Structure and general properties of mineral and vegetable oils used as spray adjuvants. **Journal Pesticide Science**, v. 37, p. 141-146, 1993.

HIPPALGAONKAR, K. et al. Indomethacin-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization, and in vitro evaluation, **J. Ocul. Pharmacol Ther.**, v. 29, n. 2, pp. 216-228, 2013.

ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48-57, 2012.

JAENICKE, R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions, **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 715-728, 1991.

JAGER-LEZER, N. et al. Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. **Journal Controlled Release**, v. 45, p. 1-13, 1997.

JIAO, J.; BURGESS, D, J. Multiple emulsion stability: pressure balance and interfacial film strength, Ch. 1, In: ASERIN A. (Ed.). **Multiple Emulsions: Technology and Applications**. John Wiley & Sons, 2008.

JIGAR, V. et al. Development of stable multiple emulsion of atorvastatin. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 2, p. 419-428, 2011.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. **Food Research International**, v. 52, p. 64-74, 2013.

JYOTHI, T. C. et al. Napin from Brassica juncea: thermodynamic and structural analysis of stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1774, p. 907-919, 2007.

- KANOUNI, M.; ROSANO, H.; NAOULI, N. Preparation of a stable double emulsion (W1/O/W2): role of the interfacial films on the stability of the system. **Adv. Colloid Interface Science**, v. 99, p. 229-254, 2002.
- KATAYAMA, K. et al. Diffusion coefficients for nanoparticles under flow and stop-flow conditions. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 11, pp. 10494-10499, 2009.
- KHAN, A. Y. et al. Multiple emulsions: an overview. **Curr. Drug Delivery**, v. 3, p. 429-443, 2006.
- KHATRI, N. L. et al. Emulsion layer growth in continuous oil-water separation. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 384, p. 630-642, 2011.
- KNOTH, A.; SCHERZE, I.; MUSCHIOLIK, G. Stability of water-in-oil-emulsions containing phosphatidylcholine-depleted lecithin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 635-640, 2005.
- KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Effect of emulsifiers on the preparation of food-grade oil-in-water emulsions using a straight-through extrusion filter. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, p. 720-727, 2002.
- KOBAYASHI, I. et al. Preparation of monodisperse micron-scale microspheres by microchannel emulsification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 8, p. 797-802, 2001.
- KOBAYASHI, Y. et al. Preparation of monodisperse water-in-oil-in-water emulsions using microfluidization and straight-through microchannel emulsification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, n. 1, p. 65-71, 2005.
- KOBERSTEIN-HAJDA, A.; DICKINSON, E. Stability of water-in-oil-in-water emulsions containing faba bean proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 2, p 251-254, 1996.
- KOROLEVA, M.; YURTOV, E. Effect of ionic strength of dispersed phase on Ostwald ripening in water-in-oil emulsions. **Colloid Journal**, v. 65, n. 1, p. 40-43, 2003.
- KUMAR, R.; KUMAR, M. S.; MAHADEVAN, N. Multiple emulsions: a review. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, v.2, n. 1, p. 9-19, 2012.
- LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 56, n. 6, pp. 600–612, 2003.
- LEAL-CALDERON, F. et al. W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 30-41, 2012.

LEE, K. Y.; YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. **Prog. Polymer Science**, v. 32, p. 669-697, 2007.

LIU, E.; McGRATH, K. Emulsion microstructure and energy input, roles in emulsion stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 262, p. 101-112, 2005.

LIU, H.-J. et al. Controlling Water Transport in W/O/W Multiple Emulsion. **Acta Physica Sinica**, v. 23, n. 6, p. 935-939, 2007.

LO, I. et al. The influence of surfactant HLB and the nature of the oil phase on the phase diagrams of nonionic surfactant-oil-water systems. **Journal Colloid Interface Science**, v. 59, n. 2, p. 319-327, 1977.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Journal Biomaterials Nanobiotech**, v. 2, p. 626-639, 2011.

LUZAR, A. Water-hydrogen bond dynamics close to hydrophobic and hydrophilic groups. **Faraday Discussions**, v. 103, p. 29-40, 1996.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal Nanoscience and Nanotechnology**, v.8, p. 1-14, 2008.

MATSUMOTO, S. W/O/W-type multiple emulsions with a view to possible food applications. **Journal Texture Studies**, v. 17, n. 2, p. 141-159, 1985.

MATSUMOTO, S.; KANG, W. Formation and applications of multiple emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 10, n. 4&5, p. 455-482, 1989.

MENG, F. T. et al. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 33, p. 177-183, 2004.

MINE, Y.; SHIMIZU, M.; NAKASHIMA, T. Preparation and stabilization of single and multiple emulsions using microporous class membrane. **Colloids Surface B: Biointerfaces**, v. 6, p. 261-268, 1996.

MIYAWAKI, O.; TATSUNO, M. Thermodynamic analysis of alcohol effect on thermal stability of proteins. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v.111, p. 198-203, 2011.

MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments, 5th ed. Wiley, New York, 2001.

MOUTINHO, C. G. et al. Nanocarrier possibilities for functional targeting of bioactive peptides and proteins: state-of-the-art. **Journal Drug Targeting**, v. 20, p. 114-141, 2012.

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

MUN, S. et al. Release properties of gel-type W/O/W encapsulation system prepared using enzymatically-modified starch. **Food Chemistry**, v.157, p. 77-83, 2014.

MUSCHIOLIK, G. Multiple emulsions for food use. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 213-200, 2007.

MUSCHIOLIK, G. et al. Multiple emulsions - preparation and stability. In: World Congress of Food Science & Technology 13th, 10.1051/IUFoST:20060043. pp. 123-137, 2006.

MYERS, J. K.; TREVINO, S. R. Increasing globular protein stability. **Chemistry Today**, v. 30, p. 30-33, 2012.

Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization – recent experimental progress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 137-149, 2003.

OKOCHI, H.; NAKANO, M. Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 5–26, 2000.

OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsions: structure and application as drug delivery systems, **Quím. Nova** 27 (1): 131-138, 2004.

OMOTOSHO, J. et al. The nature of the oil phase and the release of solutes from multiple (W/O/W) emulsions. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 38, p. 865-870, 1986.

ONUKI, Y.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K. Formulation optimization of water-in-oil-water multiple emulsion for intestinal insulin delivery. **Journal Controlled Release**, v. 97, p. 91-99, 2004.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, p. 241-249, 2002.

OWUSU, R.; ZHU, Q.; DICKINSON, E. Controlled release of L-tryptophan and vitamin B2 from model water/oil/water multiple emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n. 5, p. 443-453, 1992.

PAL, R. Viscosity models for multiple emulsions. **Food hydrocolloids**, v. 22, p. 428-438, 2008.

PAL, R. Rheology of simple and multiple emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.16, p. 41-60, 2011.

- PASQUALI, R. C.; TAUROZZI, M. P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 44-51, 2008.
- PAYS, K. et al. Coalescence in surfactant-stabilized double emulsions. **Langmuir**, v. 17, p. 7758-7769, 2001.
- PAYS, K. et al. Double emulsions: how does release occur? **Journal Control. Release**, v.79, p. 193-205, 2002.
- PENG, L.-C. et al. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. **Colloids Surface A: Phys. Eng. Aspects**, v. 370, p. 136-142, 2010.
- PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. **Journal Food Engineering**, v. 97, p.441-448, 2010.
- PERRIER-CORNET, J. M.; MARIE, P.; GERVAIS, P. Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. **Journal Food Engineering**, v. 66, n. 2, p. 211-217, 2005.
- PETERSEN, S. B. et al. Protein engineering the surface of enzymes. **Journal Biotechnology**, v. 66, p. 11-26, 1998.
- PIANOVSKI, A. R. et al. Development and evaluation of O/W/O multiple emulsions stability containing pequi oil (Caryocar brasiliense), **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 2, pp. 155-159, 2008.
- PORRAS, M. et al. Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method. **Colloids Surface A: Phys. Eng. Aspects**, v. 324, p. 181-188, 2008.
- PRINDERRE, P. et al. Formulation and evaluation of o/w emulsions using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v.163, p. 73-79, 1998.
- PUAPERMPHOONSIRI, U.; SPENCER, J.; VAN DER WALLE, C.F. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. **European Journal Pharmaceutics Biopharm**, v. 72, p. 26-33, 2009.
- R Development Core Team, Developed by Ross Ihaka and Robert Gentleman, **R - a programming language and software environment for statistical computing and graphics**, version 3.2.2., 2015.
- RAYNAL, S. et al. A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. **Journal Controlled Release**, v. 26, n. 2, p. 129-140, 1993.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 53-65, 2006a.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.2, p. 8-21, 2006b.

ROSANO, H. L.; GANDOLFO, F. G.; HIDROT, J.-D. P. Stability of W1/O/W2 multiple emulsions: Influence of ripening and interfacial interactions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 138, p. 109-121, 1998.

SANJULA, B. et al. EFFECT of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement. **Journal Drug Targeting**, v. 17, p. 249-256, 2009.

SAPEI, L.; NAQVI, M. A.; ROUSSEAU, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 316-323, 2012.

SCHARNAGL, C.; REIF, M.; FRIEDRICH, J. Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1749, p. 187-213, 2005.

SCHERZE, I.; KNOTH, A.; MUSCHIOLIK, G. Effect of emulsification method on the properties of lecithin- and PGPR-stabilized water-in-oil emulsions. **Journal Dispersion Science Technology**, v. 27, p. 427-434, 2006.

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

SCHMIDTS, T. et al. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.398, p. 107-113, 2010.

SCHMIDTS, T. et al. Multiple W/O/W emulsions-Using the required HLB for emulsifier evaluation. **Colloids Surface A: Phys. Eng. Aspects**, v. 372, p. 48-54, 2010b.

SCHMIDTS, T. et al. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNazymes. **Int. Journal Pharmaceutics**, v. 431, p. 61-69, 2012.

SCHUBERT, H.; ARMBRUSTER, H. Principles of formation and stability of emulsions. **Int. Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 14-28, 1992.

SCHUCH, A. et al. Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water. **Journal Colloid Interface Science**, v. 402, p. 157-164, 2013.

SCHULLER, R.; ROMANOWSKY, P. Understanding emulsions. **Cosmetic & Toiletries**, v. 113, pp. 39-44, 1998.

SCHULTZ, N. et al. Zeta potential measurements as a diagnostic tool in enzyme immobilization, **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 39-44, 2008.

SEIFRIZ, W. Studies in emulsion. **Journal Physical Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 738-749, 1925.

SEVCIKOVÁ, P. et al. On the preparation and characterization of nanoemulsions produced by phase inversion emulsification. **Colloids Surface A: Phys. Eng. Aspects**, v. 410, p. 130-135, 2012.

SEVERINO, P. et al. Polymers for drug delivery systems formulations. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p.361-368, 2011.

SHIMA, M. et al. Preparation of fine W/O/W emulsion through membrane filtration of coarse W/O/W emulsion and disappearance of the inclusion of outer phase solution. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 61-70, 2004.

SHIMA, M. et al. Hydrolysis of the oil phase of a W/O/W emulsion by pancreatic lipase. **Journal Controlled Release**, v. 94, p. 53-61, 2004b.

SHIMA, M. et al. Effect of the hydrophilic surfactants on the preparation and encapsulation efficiency in coarse and fine W/O/W type emulsions. **Colloids Surface A: Phys. Eng. Aspects**, v. 238, p. 83-90, 2004c.

SHIMIZU, M.; NAKANE, Y. Encapsulation of biologically active proteins in a multiple emulsion. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 492-496, 1995.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 854–867, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. (2007) Principles of Instrumental Analysis, 6th ed., Canada: Thomson, 2007.

SOMA, J.; PAPADOPOULOS, K. Ostwald ripening in sodium dodecyl sulfate-stabilized decane-in-water emulsions. **Journal Colloid Interface Science**, v.181, n. 1, p. 225-231, 1996.

SOURDET, S. et al. Composition of fat protein layer in complex food emulsions at various weight ratios of casein-to-whey proteins. **Lait**, v. 82, p. 567-578, 2002.

SRINIVAS, P. R. et al. Nanotechnology research: applications in nutritional sciences. **Journal Nutrition**, v. 140, p. 119-124, 2010.

SRINIVASAN, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. Sodium caseinate-stabilized emulsions: factors affecting coverage and composition of surface proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3807-3811, 1996.

STAIT-GARDNER, T. et al. NMR Diffusion Measurements of Complex Systems. **www.diffusion-fundamentals.org** (The Open-Access Journal for the Basic Principles of Diffusion Theory, Experiment and Application), v.15, p. 1-22, 2009.

STANG, M.; SCHUCHMANN, H.; SCHUBERT, H. Emulsification in high-pressure homogenizers. **Engineering Life Science**, v. 1, n. 4, p. 151-157, 2001.

SU, J. Formation and stability of food-grade water in oil in water emulsions, PhD thesis, Riddet Institute, Massey University, New Zealand, p. 226, 2008.

SU, J.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. Improving encapsulation efficiency and stability of water-in-oil-in-water emulsions using a modified gum arabic (Acacia (sen) SUPER GUM™). **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 112-120, 2008.

SUGIURA, S.; NAKAJIMA, M.; SEKI, M. Preparation of monodispersed emulsions with large droplets in microchannel emulsification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 515-519, 2002.

SUTERA, S. P.; SKALAK, R. The history of Poiseuille's law. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 25, p. 1-19, 1993.

TADROS, T. F. Emulsion formation, stability and rheology, In: THARWAT, F.; TADROS, T. F. (Ed.). **Emulsion Formation and Stability**, First Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2013. p. 1-75.

TAISNE, L.; WALSTRA, P.; CABANE, B. Transfer of oil between emulsion droplets. **Journal Colloid Interface Science**, v. 184, p. 378-390, 1996.

TAL-FIGIEL, B. The formation of stable W/O, O/W, W/O/W cosmetic emulsions in an ultrasonic field. **Chemical Engineering Research and Design Part A**, v. 85, n. A5, p. 730-734, 2007.

TANG, K. E. S.; DILL, K. A. Native protein fluctuations: the conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 16, p. 397-411, 1998.

TIRNAKSIZ, F.; KALSIN, O. A topical w/o/w multiple emulsions prepared with Tetronic 908 as a hydrophilic surfactant: Formulation, characterization and release study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 299-315, 2005.

TROTТА, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53: 203-208, 2002.

URSICA, L. et al. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p. 931-936, 2005.

VAN DER GRAAF, S.; SCHROEN, C.; BOOM, R. Preparation of double emulsions by membrane emulsification - a review. **Journal Membrane Science**, v. 251, p. 7-15, 2005.

VASILJEVIC, D. et al. An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 171-177, 2006.

VASILJEVIC, D. et al. Rheological and droplet size analysis of W/O/W multiple emulsions containing low concentrations of polymeric emulsifiers. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 74, n. 7, p. 801-816, 2009.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Thermoenzymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **Trends Biotechnology**, v. 14, p. 183-191, 1996.

VLADISAVLJEVIC, G. T.; SHIMIZU, M.; NAKASHIMA, T. Production of multiple emulsions for drug delivery systems by repeated SPG membrane homogenization: Influence of mean pore size, interfacial tension and continuous phase viscosity. **Journal Membrane Science**, v. 284, p. 373-383, 2006.

WANG, Y. F.; TAO, Z.; GANG, H. Structural evolution of polymer-stabilized double emulsions. **Langmuir**, v. 22, p. 67-73, 2006.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v.185, p. 129-188, 1999.

WALSTRA, P. Formation of emulsions, In: *Encyclopaedia of Emulsion Technology*. LISSANT, K. J. (Ed.). New York, Marcel Dekker, p. 57, 1985.

WEISS, J.; SCHERZE, I.; MUSCHIOLIK, G. Polysaccharide gel with multiple emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 605-615, 2005.

WEBER, A. et al. Effect of nebulizer type and antibiotic concentration on device performance. *Pediatric Pulmonol.* 1997; 23: 249-260.

XIE, G.; TIMASHEFF, S.N. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. **Biophysical Chemistry**, v. 64, p. 25-43, 1997.

YANG, S.; YUAN, W.; JIN, T. Formulating protein therapeutics into particulate forms. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, p. 1123-1133, 2009.

YENER, G.; BAITOKOVA, A. Development of a w/o/w emulsion for chemical peeling applications containing glycolic acid. **Journal of Cosmetic Science**, v.57, p. 487-494, 2006.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 213-230, 2001.

ZHENG, S. et al. Hemoglobin multiple emulsion as an oxygen delivery system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1158, p. 65-74, 1993.

**ANEXOS**

**ANEXO A** - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico **XIV SLAP / XII CIP – XIV Latin American Symposium on Polymers / XII Ibero American Congress on Polymers** (Porto de Galinhas PE, 12 a 16 de Outubro de 2014).



**ANEXO B** - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico I **Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental**, realizado no Parque Tecnológico de Sorocaba (Sorocaba SP, 26 a 28 de Novembro de 2014).



**I Simpósio em Tecnologia,  
Inovação e Sustentabilidade Ambiental**

**Certificado de Menção Honrosa**

Certificamos que o trabalho:

**Experimental factorial design of a w/o/w multiple emulsion integrating biomimetic aqueous-core lipid nanoballoons for housing protein entities**

foi apresentado por: **Cássia A. Glasser**

na sessão de apresentação de pôster no **I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental**, realizado nos dias 26, 27 e 28 de novembro de 2014, no Parque Tecnológico, em Sorocaba-SP.

*M. T. G.*  
Programa de Pós-graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais  
UNISO - Universidade de Sorocaba

*Elaine C. M. Silva Zaccarin*  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental  
UFSCAR - Câmpus Sorocaba

*Rosendo Almeida Neto*  
Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais  
Unesp - Câmpus de Sorocaba

ORGANIZAÇÃO:

ufscar UNISO unesp

APOIO:

PROPG ColdLab Malvern Waters THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE PerkinElmer For the Better Leica

**ANEXO C** - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico **5th ANM - International Conference on Advanced Nanomaterials** (Aveiro, Portugal, julho de 2014).



## Optimizing a multiple emulsion formulation as a housing system for viable lytic bacteriophages

Victor Balcao<sup>1,2,\*</sup>, Cássia Glasser<sup>1</sup>, Marco Chaud<sup>1</sup>, Matthieu Tubino<sup>3</sup> and Marta Vila<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>LaBNUS – Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil,  
victor.balcao@prof.uniso.br

<sup>2</sup>CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

<sup>3</sup>Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas/SP, Brazil

**Development of a nanotechnological process for housing bacteriophage particles was pursued. As a proof-of-concept for the aforementioned strategy, bacteriophage particles with broad lytic spectrum were entrapped within the aqueous core of oil nanodroplets integrating a W/O/W multiple emulsion.**

### INTRODUCTION

The major advantage of bacteriophage-based antibiotherapy relative to its chemical counterpart lies probably in the fact that phage particles (the natural predators of bacteria) replicate directly at the site of infection, becoming profusely available where they are most needed as long as viable host cells still exist. In water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple emulsions, dispersions of small water droplets within larger oil droplets are themselves dispersed in a continuous (outer) aqueous phase<sup>1,3,4</sup>. Due to their compartmentalized internal structure, multiple emulsions present advantages for encapsulation of bioentities, such as the ability to carry both polar and non-polar molecules, and a better control over releasing of therapeutic molecules<sup>2,4,5,6</sup>. In this research effort, development of a nanotechnological process for the housing of phage particles within W/O/W multiple emulsions was pursued.

### EXPERIMENTAL/THEORETICAL STUDY

To test the *proof-of-concept*, phage particles with broad lytic spectrum able to infect *E. coli* were entrapped within W/O/W multiple emulsions. For preparation of the multiple emulsion systems (Table 1), an oily phase (O) was prepared by melting together 0.5 g Softisan 100™ and 0.05 g lecithin on a thermostatted bath set at ca. 40 °C and maintained at this temperature. In a separate beaker, 5 mL glicerol was heated up to ca. 40 °C in the same thermostatted bath. For the internal aqueous phase (Win), 5 mL HCl 0.01 M and 0.05 g Tween 80™ were heated together up to ca. 40 °C in the same thermostatted bath, and added with 5 mg lyophilized bacteriophage preparation. When Softisan 100™ and lecithin were melted down, both glicerol and 1 mL of Win were added and thoroughly mixed with an UltraTurrax IKA T25 for 10 min, set at 10000 RPM, in the thermostatted bath, thus forming an Win/O emulsion. The external aqueous phase (Wext) was prepared by dissolving 0.4 g Lutrol F68 in 40 mL water. 20 mL Wext was heated up in a thermostatted bath set at ca. 40 °C, added to the Win/O emulsion, and thoroughly mixed with the UltraTurrax for 10 min at 10000 RPM. The remainder 20 mL of Lutrol was added

to the emulsion thus produced and homogenized using a magnetic stirrer until room temperature.

	Phage amount (mg)	Tween 80 (mg)	Softisan 100 (mg)	Soy Lecithin (mg)	Glicerol (mg)	Lutrol F-68 (mg)	RPM	Macroscopic characteristics
Initial formulation	5.3	54.9	520	51.9	5	399.7	10000	Clear
+25% Lecithin	5.3	54.9	520.1	75.7	5	399.7	10000	Precipitate
+25% Tween/Lecithin	6.2	58.8	508.9	85.3	5	508.9	10000	Clear
+25% Tween 80	4.4	58.9	508.9	51.8	5	411.0	10000	Clear

Table 1: Formulation and optimization of the multiple W/O/W emulsion system housing phage particles.

### DISCUSSION OF RESULTS AND CONCLUSION

No phase separation whatsoever could be found for the optimized multiple emulsion, integrating lipid nanodroplets with an aqueous core possessing an average size of ca. 114 nm and an average Zeta Potential of ca. -13 mV, kept stable over a storage timeframe of ca. 90 days. Compatibility between increased amounts of Tween 80 and other components of the internal aqueous phase can be attributed to hydrogen bonding and to the lower crystalline lattice energy of this polymer, which had a notorious impact in the melting profile of the optimized nanoemulsion. In W/O/W multiple emulsions, there is a positive correlation between emulsion stability and fatty acid chain length and a negative correlation with the dielectric constant of the emulsifier. Increasing molecular weight of the lipid (such as in Softisan 100™, with C10-C18 fatty acid moieties) and decreasing dielectric constant (such as in Tween 80) indicates greater hydrophobicity, leading to a greater impregnation of the interface and therefore to a more stable emulsion, which is in clear agreement with the long-term stability observed for our multiple nanoemulsion systems.

### REFERENCES

1. J. Bibette et al., Rep. Prog. Phys. 62, 969–1033 (1999).
2. S. S. Davis and I. M. Walker, Methods Enzymol. 149, 51–64 (1987).
3. M. F. Ficheux et al., Langmuir 14, 2702–2706 (1998).
4. J. A. Hanson et al., Nature 455, 85–88 (2008).
5. H. Okochi and M. Nakano, Adv. Drug Deliv. Rev. 45, 5–26 (2000).
6. K. Pays et al., J. Control. Release. 79, 193-205 (2002).

### ACKNOWLEDGEMENTS

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (FAPESP Ref. No. 2013/03181-6, Project **PneumoPhageKill**), is hereby gratefully acknowledged.

## Characterization of a Water-In-Oil-In-Water Multiple Emulsion Integrating Biomimetic Aqueous-Core Lipid Nanoballoons Housing Protein Entities

Marta M.D.C. Vila<sup>1,2</sup>, Cássia A. Glasser<sup>1</sup>, Júlio C. Pereira<sup>3</sup>, Marco V. Chaud<sup>1</sup>, José M. Oliveira Júnior<sup>1</sup>, Matthieu Tubino<sup>2</sup> and Victor M. Balcão<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> LaBNUS – Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, i(bs)<sup>2</sup> – intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil, [marta.vila@prof.uniso.br](mailto:marta.vila@prof.uniso.br).

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas/SP, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Environmental Sciences, Federal University of São Carlos, Sorocaba/SP, Brazil.

<sup>4</sup> CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.

ANM - nanomaterials - Poster

### INTRODUCTION

Due to the increasing awareness related to the worldwide appearance of multiple bacterial resistance to conventional chemical antibiotics, bacteriophage particles are being re-discovered as high-potential candidates for biopharmaceutical applications.<sup>1</sup> However, phage particles are fragile, and therefore their full structural and functional stabilization is required.<sup>2</sup> Solubilization of these protein-like entities in the aqueous-core of lipid nanoballoons integrating multiple emulsions of the type water-in-oil-in-water, will protect them.<sup>1</sup> The aim of the study entertained herein was to optimize a water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple emulsion formulation integrating aqueous-core lipid nanoballoons encasing a macromolecular protein entity and entail its thorough physicochemical characterization.

### EXPERIMENTAL/THEORETICAL STUDY

Two emulsions were prepared sequentially, a primary emulsion (W/O), followed by emulsification of this emulsion in another (external) aqueous phase (W), thus forming a multiple emulsion (W/O/W). The inner aqueous phase was constituted by HCl 10 mM, Tween 80 and pure protein entity; the intermediate oily phase encompassed glycerol, Softisan 100™ and soybean phosphatidylcholine; the outer aqueous phase encompassed poloxamer 188 and UP water. W/O/W multiple emulsion formulation was characterized via DLS by measuring particle hydrodynamic size, size distribution and particle charge via Zeta potential analysis, surface morphology and diffusion coefficient via Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), thermal analyses via Thermogravimetry (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC), infrared spectrophotometry with Fourier transform (FTIR), and X-ray diffraction (XRD).

### RESULTS AND DISCUSSION

Two homogenization cycles of 10 min at 12500 rpm, 0.015% (w/w) protein, 0.75%, (w/w) lecithin and 0.50% (w/w) poloxamer 188, were found to be critical variables for producing stable (aqueous-core) lipid nanoballoon dispersions with average hydrodynamic diameters ranging from 184 nm to 189 nm, average polydispersity index ranging from 0.192 to 0.220 and average Zeta potential values ranging from -37.38 mV to -35.52 mV. No phase separation whatsoever could be found for the

optimized multiple emulsion system, kept stable over a storage timeframe of 120 days. Figure 1 displays a frozen high-resolution frame of the lipid nanoballoons integrating the optimized W/O/W multiple emulsion housing protein entities, allowing to observe the spherical shape of the particles and the absence of aggregation. The analysis performed allowed to determine the diffusion coefficient of the lipid nanoballoons as  $2.64879 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , using the Stokes-Einstein equation. Diffusion coefficients for nanoparticles are typically of the order of magnitude of  $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . The lower the diffusion coefficient, the more stable the multiple emulsion is, and this was indeed observed during the long-term storage of our statistically optimized W/O/W multiple emulsion housing protein entities.

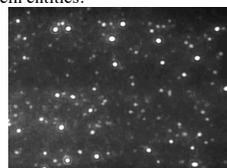


Figure 1. W/O/W emulsion using a NanoSight NS300.

A comparison between XRD, TGA, DSC and FTIR spectra of optimized multiple emulsions without and with encapsulated protein, allowed to conclude that there was no chemical interaction between the protein and the chemical components of the emulsion.

### CONCLUSION

The multiple emulsion proved to be stable for 120 days and was able to encapsulate protein entities.

### REFERENCES

1. V.M. Balcão et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **123**: 478-485 (2014)
2. V.M. Balcão and M.M.D.C.Vila, *Advanced Drug Delivery Reviews* [Accepted, in press] (2015) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.005>

### ACKNOWLEDGMENTS

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (FAPESP Ref. No. 2013/03181-6, Project PneumoPhageKill), is hereby gratefully acknowledged.

**ANEXO E - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico 10th CIFARP - International Congress of Pharmaceutical Sciences (Ribeirão Preto, Brasil, setembro de 2015).**

**10<sup>th</sup> International Congress of Pharmaceutical Sciences**  
**CIFARP 2015**  
Ribeirão Preto, Brazil, September 5-9 2015  
Translating science into health pipeline

## CERTIFICATE

We certify that

**MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA**

presented the **POSTER** entitled **MULTIPLE EMULSION (W/O/W) FOR SOLUBILIZATION OF PROTEIN ENTITIES**

Authors: **MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA, CASSIA ANTUNES GLASSER, ALESSANDRA CÂNDIDA RIOS, MARCO VINICIUS CHAUD, MATTHIEU TUBINO, VICTOR MANUEL BALCÃO**

in the **POSTER SESSION** at the **10th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP 2015** held on September 5-9, 2015.

Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, September 9th, 2015.

  
Flávia da Silva Emery  
Organizing Committee

  
Maria Vitória Lopes Badra Bentley  
DEAN - FCRRP - USP



**MULTIPLE EMULSION (W/O/W) FOR SOLUBILIZATION OF PROTEIN ENTITIES**

Marta M.D.C. Vila<sup>1,2</sup>, Cássia A. Glasser<sup>1</sup>, Alessandra Rios<sup>1</sup>, Marco V. Chaud<sup>3</sup>, Matthieu Tubino<sup>3</sup>, Victor M. Balcão<sup>1,3</sup>



<sup>1</sup> LabNUS – Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas/SP, Brazil

<sup>3</sup> Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal



**INTRODUCTION**

Due to the increasing awareness related to the worldwide appearance of multiple bacterial resistance to chemical antibiotics, bacteriophage particles are being re-discovered as high-potential candidates for biopharmaceutical applications. However, phage particles are fragile, and therefore their full structural and functional stabilization is required. Solubilization of these protein-like entities in the aqueous-core of lipid nanoballoons integrating multiple emulsions of the type water-in-oil-in-water, so as to protect them. The aim of the study was the optimized the water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion formulation integrating aqueous-core lipid nanoballoons encasing a protein entity and your characterization.

**EXPERIMENTAL**

1<sup>st</sup> Step: Preparation of multiple emulsion system (W/O/W) ( Fig 1)

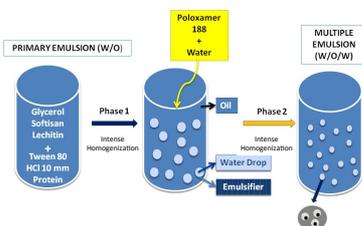


Figure 1. Schematic representation of the preparation of W/O/W multiple emulsion.

2<sup>nd</sup> Step: Characterization of multiple emulsion

Analyses

- ❖ Hydrodynamic size
- ❖ Polydispersity index
- ❖ Zeta potential
- ❖ Differential Scanning Calorimetry
- ❖ Surface morphology via Nanoparticle Tracking Analysis
- ❖ Infrared spectrophotometry with Fourier transform

**RESULTS AND DISCUSSION**

The statistical factorial design performed let to production of an optimum multiple emulsion ( Table 1).

Table 1. Values HS, PI and ZP (n=3) of the multiple emulsion produced by varying three factors (protein, lecithin, poloxamer P188).

Multiple emulsion	Protein (% w/w)	Lecithin (% w/w)	P188 (% w/w)	12500 rpm		
				HS ± σ (nm)	PI ± σ	ZP ± σ (mV)
ME01	0.015	0.25	0.50	140.72 ± 2.83	0.244 ± 0.001	-28.23 ± 4.18
ME02	0.015	0.25	1.50	187.39 ± 1.95	0.256 ± 0.004	-28.25 ± 0.02
ME03	0.015	0.75	0.50	130.20 ± 2.80	0.204 ± 0.004	-26.45 ± 0.93
ME04	0.015	0.75	1.50	219.53 ± 3.35	0.215 ± 0.002	-22.87 ± 0.51
ME05	0.005	0.75	1.50	197.62 ± 4.28	0.250 ± 0.006	-22.47 ± 1.27
ME06	0.005	0.75	0.50	212.90 ± 1.39	0.221 ± 0.003	-24.45 ± 2.14
ME07	0.005	0.25	1.50	178.71 ± 2.59	0.282 ± 0.004	-24.17 ± 9.61
ME08	0.005	0.25	0.50	149.59 ± 2.32	0.231 ± 0.002	-22.13 ± 1.12
ME09	0.010	0.50	1.00	154.61 ± 1.46	0.232 ± 0.002	-25.34 ± 0.37
ME10	0.010	0.50	1.00	183.29 ± 6.90	0.245 ± 0.010	-23.68 ± 4.25
ME11	0.010	0.50	1.00	172.11 ± 2.28	0.211 ± 0.008	-23.72 ± 1.80

**RESULTS AND DISCUSSION**

- ❖ Storage of multiple emulsion with encapsulated protein led to maintenance of the hydrodynamic size between 180 nm and 200 nm.
- ❖ Small increase of the polydispersity index during the first seven days (from 0.206 to 0.276) and little increase in the values of Zeta potential (from -36.45 mV to -29.81 mV), presumably due to ion concentration at lipid nanoballoons interface.
- ❖ A comparison between the infrared spectra of multiple emulsions without (b) and encapsulated protein (c) indicated that there were no displacement of major peaks.
- ❖ Neither the existence of the characteristic peaks of free protein (a)(1525 cm<sup>-1</sup>, 1441 cm<sup>-1</sup>, 1236cm<sup>-1</sup>, 1082 cm<sup>-1</sup>), which indicates that all protein was encapsulated.

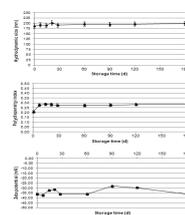


Figure 2. Time evolution of Hydrodynamic size, Polydispersity index and Zeta potential of W/O/W multiple emulsion.

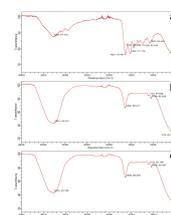


Figure 3. FTIR spectra of protein (a), W/O/W emulsion without encapsulated protein (b), W/O/W multiple emulsion with encapsulated protein (c).

- ❖ The spherical shape of the particles and the absence of aggregation observed in a high-resolution video frozen frame of the lipid nanoballoons integrating the W/O/W multiple emulsion housing protein.

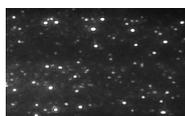


Figure 4. High-resolution video frozen frame of W/O/W multiple emulsion with encapsulated protein obtained with a CMOS high-resolution camera, following irradiation with a UV-light laser beam at 405 nm.

- ❖ The thermal analyses showed a transition from a crystalline state of the lipid nanoballoons to an amorphous counterpart, due to the imprisonment of an hydrophilic macromolecule (protein) leading to the increased stability observed for the emulsion.

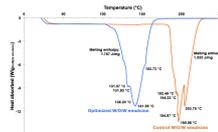


Figure 5. DSC thermograms of the W/O/W multiple emulsion with encapsulated protein (blue line) and W/O/W multiple emulsion without encapsulated protein (orange line).

**CONCLUSION**

The optimized multiple emulsion was stable at 4°C for 180 days and able to encapsulate protein entities.

**ACKNOWLEDGEMENTS**



**ANEXO F** - Artigo científico publicado na forma de Capítulo de Livro: **Balcão, V. M.; Glasser, C. A.; Chaud, M. V.; Vila, M. M. D. C. (2015) (2015) Water-in-Oil-in-Water Nanoencapsulation Systems, *In: Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*, Leonard Sagis (Ed.), Ch. 19, pp. 95-129; Elsevier, ISBN: 978-0-12-800350-3.**

# Water-in-Oil-in-Water Nanoencapsulation Systems

Victor M. Balcão<sup>1,2,\*</sup>, Cássia A. Glasser<sup>1</sup>, Marco V. Chaud<sup>1</sup> and  
Marta M.D.C. Vila<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LaBNUS—Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, *i(bs)*<sup>2</sup>—Intelligent Biosensing and Biomolecule Stabilization Research Group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil

<sup>2</sup>CEB—Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

## 6.1 Introduction

In W/O/W multiple emulsions, dispersions of small aqueous droplets within the core of larger oily droplets are themselves dispersed in a continuous (external) aqueous phase (Bibette et al., 1999; Ficheux et al., 1998; Garti and Bisperink, 1998; García-Fuentes et al., 2002; Ursica et al., 2005; Khan et al., 2006; Wang et al., 2006; Hanson et al., 2008; Dupeyrón et al., 2009; Kumar et al., 2012; Mun et al., 2013; Schuch et al., 2013; Tadros, 2013; Balcão et al., 2013). Due to their compartmentalized internal structure, W/O/W multiple emulsions offer advantages over simple oil-in-water (O/W) or water-in-oil (W/O) emulsions for encapsulation, such as the ability to carry both hydrophilic and lipophilic molecules, while allowing better control over the release of (therapeutic) bioactive moieties (Pays et al., 2002; Davis and Walker, 1987; Okochi and Nakano, 2000; Khan et al., 2006; Marcato and Durán, 2008). Within the context of biomedicine, food, cosmetic, and pharmaceutical sciences, the issue of biomolecule stabilization assumes particular relevance. In particular, stabilization of proteins and protein-like entities translates into preservation of both structure and functionality during storage and/or targeting (Balcão and Vila, 2014), and such stabilization is mostly attained through establishment of a thermodynamic equilibrium with the (bio)entity's (micro)environment. There is a delicate balance between stability and flexibility needed for biomolecular function (Brodin and Frank, 1978; Brodin et al. 1978), added to an increasing awareness of the importance of the protein's surface for stability (Becher, 1965; Florence and Whitehill, 1982), since it is through this interface that

---

\* Author to whom all correspondence should be addressed at LaBNUS – Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba at Sorocaba's Technological Park, University of Sorocaba, Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Rod. Raposo Tavares km 92.5, CEP 18023-000 Sorocaba, São Paulo, Brazil [[victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br); Tel.: 00 55 (15) 2101 7181; Fax: 00 55 (15) 2101 7000].

a protein entity senses the “external world” (Balcão and Vila, 2014). It is generally accepted that functionally important amino acid moieties are mainly solvent-accessible residues on the protein surface, while structurally important moieties are likely part of the protein core (Davis et al., 1985; Brodin and Frank, 1978; Dickinson and Stainsby, 1988). According to Jaenicke (1991) and Vieille and Zeikus (1996), the core packing in native (folded) protein molecules is so well arranged that virtually all solvent molecules are essentially excluded, making the protein core more like a crystalline solid than a nonpolar fluid. More than 95% of all charged moieties are located on the surface of the protein (Petersen et al., 1998), consisting mostly of hydrophilic moieties, while most of the hydrophobic ones are buried deep inside the core (Becktel and Schellman, 1987; Xie and Timasheff, 1997; Jyothi et al., 2007), and since the static or dynamic conditions of the physicochemical microenvironment of the protein are sensed intrinsically through those moieties on the surface, the protein surface thus constitutes a very challenging and attractive target for protein engineering, aiming at enhancing its stability (Ó’Fágáin, 2003; Foss et al., 2005). Water is the universal and natural solvent for proteins, dictating both the molecular motion and the structure and function of these molecules (Scharnagl et al., 2005). Globular proteins are only marginally stable, and such metastability makes proteins difficult to handle experimentally (Arakawa et al., 1993, 2001; Moutinho et al., 2012; Myers and Trevino, 2012).

Protein stability is directly correlated with the ability of water molecules in the hydration layer of the biomolecule to fluctuate among different equilibrium structures; additionally, internal water molecules contribute to protein stability by providing the necessary flexibility for biological activity, by acting as lubricants and by providing the protein a certain level of plasticity (Scharnagl et al., 2005; Illanes et al., 2012; Doster and Settles, 2005). A protein molecule can only move if the nearest molecular neighbors also move, a collective phenomenon resembling a continuous search for escape from a cage rather than a discontinuous jump across an energetic barrier (Doster and Settles, 2005). The (liquid, aqueous) cage becomes a trap when the density reaches a critical value, a moment when the liquid is arrested on a macroscopic scale. Water, therefore, acts as a plasticizer to protein motions, expanding the accessible protein conformational space by decreasing friction (Doster and Settles, 2005), via changing allegiances of hydrogen bonds between donors and acceptors (Luzar, 1996). Structural plasticity is thus dominated by polar interactions (Doster and Settles, 2005). Stabilizing a biomolecule involves dampening its molecular motions, and this can be achieved by reducing the chemical activity of the water present in its microenvironment. Hence, protein stability inversely correlates with its flexibility, with the flexible patches in proteins typically being the labile areas (Wang, 1999; Vieille and Zeikus, 1996; Tang and Dill, 1998). A folded protein in an aqueous environment (solution) has hydrophobic regions sequestered from, and hydrophilic areas in contact with, the aqueous environment. But, when the polarity of an aqueous solvent decreases via addition of a nonaqueous solvent, protein hydrophobic cores tend to dissipate in contact with the latter, which leads to disruption of the protein hydration shell, with concomitant destabilization and unfolding of the macromolecule (Wang, 1999; Miyawaki and Tatsuno, 2011). W/O/W multiple emulsions, therefore, constitute very attractive

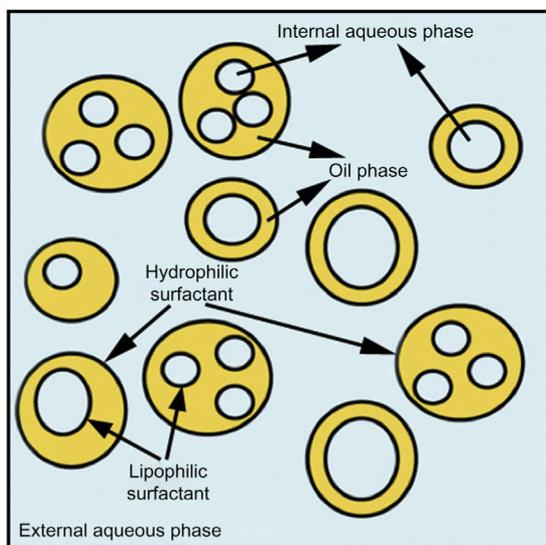
systems for the structural and functional stabilization of biomolecules within the inner aqueous cores entrapped in their oily droplets.

## 6.2 General Picture of a W/O/W Multiple Emulsion

A simple (either W/O or O/W) emulsion is prepared by dispersing one immiscible liquid in another, and then stabilizing it using an emulsifier (Walstra, 1985). However, multiple emulsions are far more complex systems, termed “emulsions of emulsions” (Garti and Bisperink, 1998; Khan et al., 2006; Kumar et al., 2012), in which the dispersed phase is itself an emulsion; these more complex emulsions can be classified into two major types: W/O/W multiple emulsions and oil-in-water-in-oil (O/W/O) multiple emulsions. In particular, W/O/W multiple emulsions are vesicular systems in which very small water droplets are entrapped within the core of oily droplets, with these oily droplets being themselves dispersed in an aqueous (outer) phase (Raynal et al., 1993; Khan et al., 2006; Kumar et al., 2012) (see Figure 6.1).

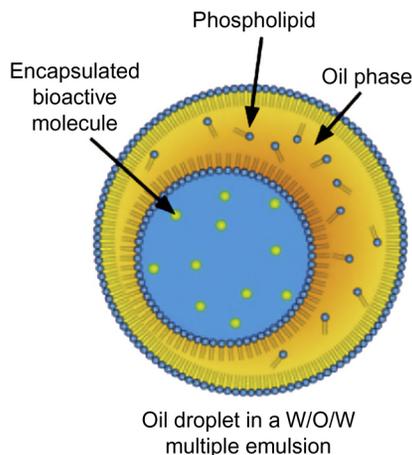
Hence, W/O/W multiple emulsions are emulsions within emulsions, and are traditionally stabilized by monomeric emulsifiers at both the inner and outer interfaces. The hydrophobic surfactants are located at the inner water/oil interfaces, while the hydrophilic surfactants are located at the outer oil/water interfaces (Raynal et al., 1993; Shima et al., 2004c; Tirnaksiz and Kalsin, 2005; Su, 2008; Schmidts et al., 2009) (see Figure 6.2).

Multiple emulsions were first described in 1925 (Seifriz, 1925), but more detailed studies of these systems have attracted attention only in the past two decades. Such systems have been studied in attempts to find industrial applications for nanoencapsulation in various fields



**Figure 6.1**

Schematic representation of a W/O/W multiple emulsion, showing the internal and external aqueous phases, as well as the putative location of surfactants.



**Figure 6.2**

Schematic representation of an oily droplet in a W/O/W multiple emulsion, showing the aqueous core where bioactive entities may be entrapped.

such as pharmaceuticals, cosmetics, and foods (Shimizu and Nakane, 1995; Couvreur et al., 1997; Okochi and Nakano, 2000; Farahmand et al., 2006; Yener and Baitokova, 2006; Schmidts et al., 2009; Akhtar et al., 2010; Ghosh, 2011; Jigar et al., 2011; Lovelyn and Attama, 2011; Kumar et al., 2012; Sapei et al., 2012; Schmidts et al., 2012). A bioactive entity (protein, peptide, phage particle, antioxidant) imprisoned in the core of a lipid nanovesicle becomes an independent phase within a food/pharmaceutical/cosmetic formulation, with the added advantage of being protected and having its useful active life extended. Encapsulated biomolecules can therefore be considered as localized in a given defined region of space, limited by an imaginary (e.g., a hydration shell) or physical (e.g., a porous membrane) barrier that allows physical separation between the biomolecule and the surrounding food/pharmaceutical/cosmetic formulation, and between the biomolecule and the immune/digestive system (Balcão and Vila, 2014). Each dispersed oily globule in the multiple emulsion forms a vesicular structure with single or multiple aqueous compartments separated from the outer aqueous phase by a layer of oil phase. A schematic representation of an oily droplet in a W/O/W multiple emulsion is shown in Figure 6.2.

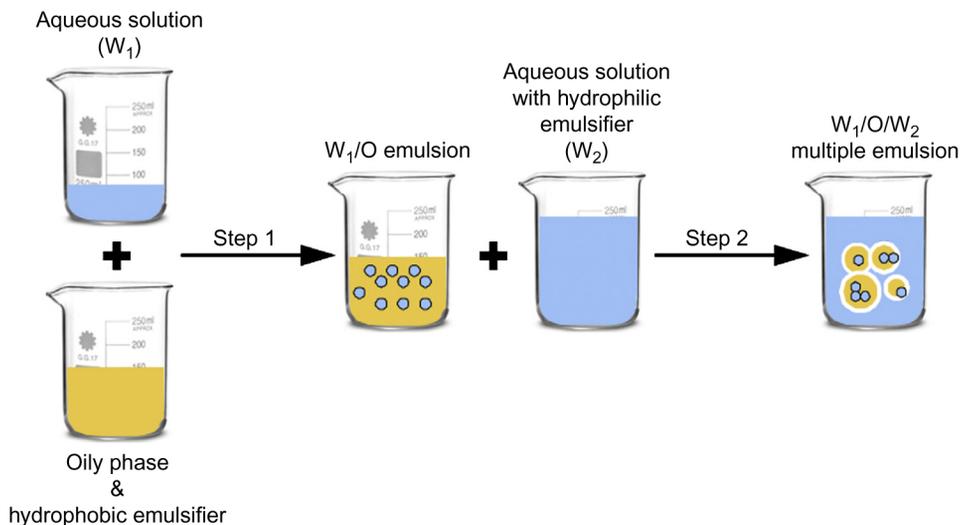
### 6.3 Major Production Processes and Phase Composition of W/O/W Multiple Emulsions

#### 6.3.1 Production Processes

There are several methods available for manufacturing W/O/W multiple emulsions, all sharing a common feature: all start with the formation of a simple (primary) W/O emulsion

by applying mechanical (stirring) energy (Garti and Aserin, 1996a,b; Ursica et al., 2005; Cai et al., 2010; Kumar et al., 2012; Balcão et al., 2014). Consequently, the interface between the two immiscible phases (water and oil) is deformed, forming a liquid film between the two immiscible liquids (Su, 2008). By continuously applying mechanical force, the oily droplets formed are disrupted into smaller ones. During the emulsification process, surfactant molecules are transported from the bulk solution to the W/O interface, thus stabilizing the oily droplets formed; further disruption of the larger oily droplets into smaller ones occurs only when such transport is faster than droplet deformation (Garti and Aserin, 1996a; Benichou et al., 2001; Su, 2008; Peng et al., 2010). There are two major methodologies for the production of W/O/W multiple emulsions: (i) one-step emulsification and (ii) two-step emulsification (Jager-Lezer et al., 1997; Benichou et al., 2001; Allouche et al., 2003; Erdal and Araman, 2006; Leal-Calderon et al., 2012; Atul and Mitali, 2012; Mun et al., 2013, 2014; Schuch et al., 2013). Briefly, the one-step emulsification method involves strong mechanical stirring and phase inversion (Anton et al., 2008; Sevciková et al., 2012). An aqueous solution (W) of a hydrophilic emulsifier is vigorously blended with an oil phase (O) containing a larger amount of hydrophobic emulsifier, thus initially forming a primary W/O emulsion; subsequently, part of the W/O emulsion inverts and forms a W/O/W multiple emulsion (Eley, et al., 1988; Matsumoto and Kang, 1989). Phase inversion methods involve the gradual addition of an aqueous solution of hydrophilic emulsifier (the external water phase) to a previously formed (primary) W/O emulsion. As in the mechanical stirring method, only part of the primary W/O emulsion converts to a W/O/W multiple emulsion, and the extent of inversion appears to be directly dependent on the chemical nature of the hydrophilic emulsifier (Dickinson and McClements, 1996). On the other hand, two-step emulsification production methods involve the production of a primary W/O emulsion and then dispersing this primary emulsion in an aqueous solution containing a hydrophilic emulsifier (i.e., the outer aqueous phase) (Leal-Calderon et al., 2012; Schuch et al., 2013; Mun et al., 2014) (see Figure 6.3).

The effectiveness of this production method strongly depends on the intrinsic stability of the internal primary W/O emulsion (Dickinson and McClements, 1996; Csóka and Erős, 1997; Su et al., 2008; Kumar et al., 2012; Balcão et al., 2014), and thus it is of vital importance that hydrodynamic disturbances produced during the second emulsification stage do not lead to any significant disruption of the primary W/O emulsion (Dickinson and McClements, 1996; van der Graaf et al., 2005; Su, 2008). When comparing two-step methods with one-step methods, the former can be used systematically to obtain stable multiple emulsions of well-defined composition and reproducible droplet size distribution (Florence and Whitehill, 1985; Matsumoto, 1985; Leal-Calderon et al., 2012), while the latter is hardly reproducible. In the vast majority of recent studies, multiple emulsions were prepared using a two-step emulsification process with two sets of emulsifiers: a hydrophobic emulsifier (for the primary W/O emulsion) and a hydrophilic

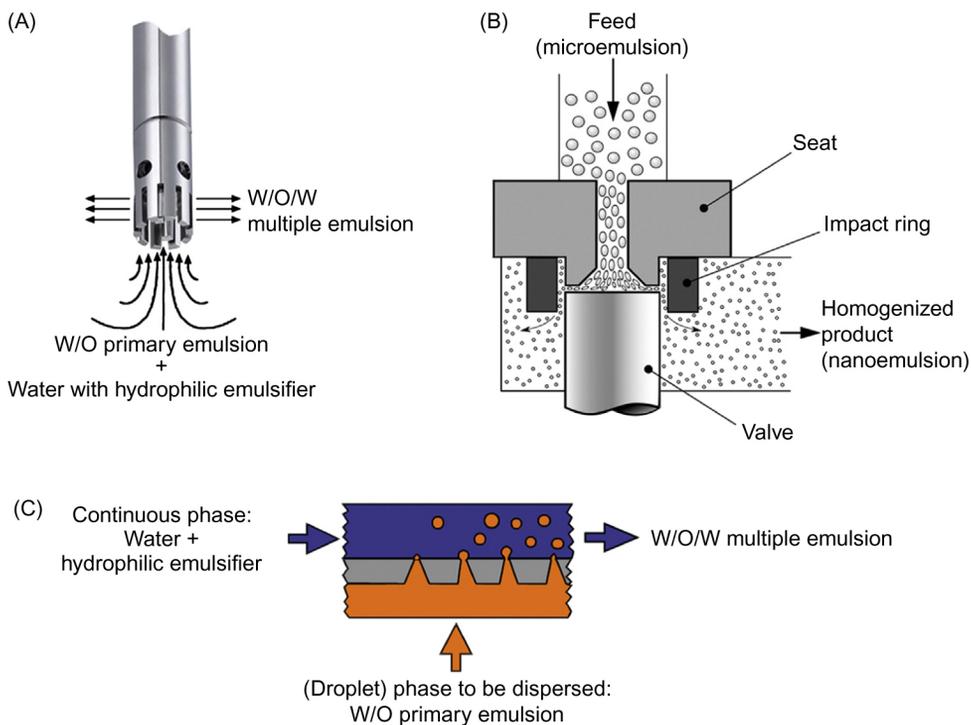


**Figure 6.3**

Schematic representation of the two-step emulsification method for producing a W/O/W multiple emulsion.

emulsifier (for the (W/O)/W multiple emulsion). Several methods have been used in two-step processes, and each method introduces energy into the system in a different manner, resulting in different emulsion microstructures. For a given formulation, the microstructure of the final multiple emulsion is imparted by the production process, which largely contributes both to the lifetime of the emulsion and the mechanism of its destabilization (Liu and McGrath, 2005; Scherze et al., 2006; Sapei et al., 2012). The most important conventional emulsification devices are (A) (high-speed) stirrers, (B) high-pressure homogenizers (Perrechil and Cunha, 2010), and (C) membrane systems (Schubert and Armbruster, 1992; Vladislavljevic et al., 2006) (see Figure 6.4). The parameters (both composition and processing method) for production of a W/O/W multiple emulsion are of vital importance, as they will directly affect both particle hydrodynamic size and interface decoration with the emulsifier, characteristics of utmost importance for the properties and stability of W/O/W multiple emulsions (Srinivasan et al., 1996; Benichou et al., 2001; Sourdet et al., 2002; Shima et al., 2004a; Su et al., 2008; Jiao and Burgess, 2008; Kumar et al., 2012; Balcão et al., 2013, 2014).

In the two-step methodology for producing a W/O/W multiple emulsion, the primary W/O emulsion is prepared under high-shear conditions (high-speed stirring homogenization), while the secondary emulsification step (leading to obtention of a W/O/W multiple emulsion) is usually performed without any severe mixing (since at this stage a high-speed stirring could disrupt the primary W/O droplets, resulting in coalescence of the internal and external water phases, and producing a simple O/W emulsion). However, several



**Figure 6.4**

Schematic representation of commonly used emulsification methodologies for producing a W/O/W multiple emulsion: (A) high-speed stirring/homogenization, (B) high-pressure homogenization, and (C) membrane emulsification.

researchers have recently been using two high-speed homogenization/stirring cycles to produce W/O/W multiple emulsions, and the resulting multiple emulsions have presented quite homogeneous hydrodynamic sizes with low polydispersity indices (Balcão et al., 2013, 2014).

### 6.3.1.1 High-speed stirring/homogenization

By using a high-speed stirrer (see Figure 6.4A), the dispersed phase is broken up by the shear stress of high turbulence, which is the primary cause of fluid disruption, thus leading to the formation of tiny droplets. Several authors argue that it is important not to use high-shear stresses when preparation of W/O/W multiple emulsions is sought, to prevent disruption of the internal emulsion and coalescence of its internal aqueous core with the external aqueous phase (van der Graaf et al., 2005), but in fact, more recently, Balcão et al. (2013, 2014) demonstrated that the use of two cycles of high-speed stirring was suitable for producing W/O/W multiple emulsions encasing protein entities (viz. bioactive lactoferrin

and bacteriophage particles) in their inner aqueous core, which were kept stable over a storage timeframe of more than 3 months.

### 6.3.1.2 High-pressure homogenization

In the case of (classical) high-pressure homogenization systems, the mixture of primary W/O emulsion and external aqueous phase is forced through a narrow channel (or orifice valve) under high pressure ( $5 \times 10^6$ – $3.5 \times 10^7$  Pa), deflected at right angles, and forced to impact against an impact ring (see [Figure 6.4B](#)), promoting a sudden pressure drop (with concomitant dissipation of energy), which causes the oily droplets in the (external) aqueous phase to be disrupted and further emulsified ([Burgaud et al., 1990](#); [Floury et al., 2004](#); [Perrier-Cornet et al., 2005](#)). In this high-pressure process, emulsification is caused by turbulence, cavitation effects, and high-shear forces ([Burgaud et al., 1990](#); [Stang et al., 2001](#); [Freudig et al., 2003](#); [Floury et al., 2004](#); [Perrier-Cornet et al., 2005](#)). When comparing high-speed stirring and high-pressure homogenization processes, the difference in produced droplet sizes is directly correlated with the energy densities: the higher the energy density, the smaller are the (oily) droplets in the (W/O/W multiple) emulsion produced ([Karbstein and Schubert, 1995](#); [Marie and Perrier-Cornet, 2002](#); [Schubert and Engel, 2004](#)). In the early stage of the emulsification process via high-pressure homogenization, cavitation of the water droplets promotes a reduction in interfacial tension, and thus new water-oil interfaces are quickly formed ([Stang et al., 2001](#); [Freudig et al., 2003](#); [Schubert and Engel, 2004](#)). The average droplet size in the multiple emulsions following their production depends on both droplet disruption and re-coalescence ([Burgaud et al., 1990](#); [Karbstein and Schubert, 1995](#)). Above certain values of pressure, the reduction in droplet size accomplished by high-pressure homogenization decreases. Possible reasons for this might be (i) insufficient emulsifier initially present to cover all the new interfaces created at high pressure, and (ii) structural changes in the emulsifier due to both the high pressure and the associated increasing temperature ([Burgaud et al., 1990](#); [Stang et al., 2001](#); [Tesch and Schubert, 2002](#); [Floury et al., 2004](#); [Schubert and Engel, 2004](#); [Perrier-Cornet et al., 2005](#)). The detrimental effect of high pressure on the emulsion droplet size(s) may be considerably reduced by changing the composition of the emulsion, specifically, (i) increasing the emulsifier concentration, (ii) reducing the volume fraction of the dispersed (W/O) phase, or (iii) increasing the viscosity of the continuous (external aqueous) phase ([Burgaud et al., 1990](#); [Einhorn-Stoll et al., 2002](#); [Pal, 2008](#)).

### 6.3.1.3 Membrane emulsification

Membrane emulsification is a relatively recent method used to prepare W/O/W multiple emulsions (see [Figure 6.4C](#)). In this method, W/O (primary) emulsion mixtures are forced under high pressure through narrow gaps of a few hundred microns in diameter in a microporous membrane. A combination of turbulence and laminar shear flow causes disruption of the droplets, leading to obtention of fine monodispersed emulsions with good

stability toward creaming and flocculation phenomena (Kobayashi and Nakajima, 2002; Kobayashi et al., 2005). Advantages of this production technique, such as low energy consumption, better control of droplet size and droplet size distribution, and mildness of the process (Shima et al., 2004a; Kobayashi et al., 2001, 2005; Mine et al., 1996; Sugiura et al., 2002), are only surpassed by major drawbacks such as time consumption and low productivity (Muschiolik, 2007).

### 6.3.2 Phase Composition

The stability of the disrupted oily droplets, after production of the W/O/W multiple emulsion, is determined by the correct composition of the multiple emulsion (Taisne et al., 1996; Gheorghe et al., 2008). The major components of a W/O/W multiple emulsion are the internal aqueous phase, hydrophobic emulsifier(s), the oil phase, hydrophilic emulsifier(s), and the external aqueous phase. The composition of the W/O/W multiple emulsion is therefore of vital importance, since different surfactants, together with the nature and concentration of the oily phase, will affect the stability of the multiple emulsion (Davis et al., 1985; Garti and Aserin, 1996a,b; Gheorghe et al., 2008). Ionic and nonionic surfactants have been used for different applications of W/O/W multiple emulsions, according to health restrictions (Garti and Aserin, 1996a,b). It is, however, well established that combinations of emulsifiers at the outer aqueous phase have a beneficial effect on the stability of a multiple emulsion, and that the hydrophobic emulsifier at the inner oily phase must be used in great excess (10–30% (w/w) of the inner W/O emulsion), while the hydrophilic emulsifier must be used in low concentration (0.5–5% (w/w)) (Garti and Aserin, 1996a,b). The hydrophilic-lipophilic balance (HLB, a measure of the degree to which a surfactant is hydrophilic or lipophilic) (Griffin, 1949, 1954; Boyd et al., 1972; Lo et al., 1977; Prinderre et al., 1998; Orafidiya and Oladimeji, 2002; Shima et al., 2004c; Guo et al., 2006; Pasquali et al., 2008; Peng et al., 2010; Schmidts et al., 2010b; Corin and O'Connor, 2014) of the outer emulsion (viz. (W/O)/W) was found to be a weighted HLB of the contribution of the two types of emulsifiers (Frenkel et al., 1983; Garti et al., 1983; Gutiérrez et al., 2008; Schmidts et al., 2009, 2010b). In addition, processing parameters such as the volume of the oily phase and the nature of the bioactive entities entrapped in the inner aqueous phase also play a decisive role in maintaining the stability of W/O/W multiple emulsions (Garti and Aserin, 1996a,b; Gheorghe et al., 2008).

#### 6.3.2.1 Internal (discrete, inner cores) and external (continuous) aqueous phases

The aqueous phase plays two distinct roles in W/O/W multiple emulsions: it is, on the one hand, the dispersed phase in the primary W/O emulsion and, on the other, the continuous (outer) phase in a (W/O)/W multiple emulsion. While the discrete internal aqueous phase(s) are often solutions of encapsulated bioactive entities, such as peptides, proteins, or bacteriophage particles (Garti and Aserin, 1996a,b; Puapermpoonsiri et al., 2009;

Balcão et al., 2013, 2014), the external (continuum) aqueous phase is usually a solution of emulsifiers (e.g., poloxamers) and stabilizers (e.g., polysaccharides) (Su, 2008; Su et al., 2008). The volume fraction of both types of aqueous phases and the addition of materials to them have considerable effect on the stability of a W/O/W multiple emulsion.

### 6.3.2.2 Oily phase

The stability of a (secondary) (W/O)/W multiple emulsion depends strongly on a stable primary W/O emulsion, which in turn is strongly correlated with the hydrophobicity of the oily phase (Kanouni et al., 2002; Su, 2008; Su et al., 2008; Kumar et al., 2012). The nature of the oily phase in W/O/W multiple emulsions has a direct influence on both the EE of the internal aqueous core retained in the final W/O/W multiple emulsion and the rate of transport of entrapped entities through the oily phase (Omotosho et al., 1986; Weiss et al., 2005; Su, 2008; Su et al., 2008; Mun et al., 2013, 2014; Schuch et al., 2013). Production of stable, food-grade, W/O/W multiple emulsions needs (ideally) an oily phase with both low viscosity and low water solubility (Hamilton, 1993; Garti, 1997a,b; Prinderre et al., 1998; Su, 2008; Sapei et al., 2012). In general, production of emulsions with (highly unsaturated) vegetable oils requires a high energy input, and the resulting emulsions are less stable to the migration of water both into and out of the internal aqueous phase. Notwithstanding the fact that highly hydrophobic (but not GRAS (Generally Recognized As Safe)) oils such as mineral oils or hydrocarbons are commonly used as the oily phase in studies of production of W/O or W/O/W multiple emulsions (Dickinson et al., 1994; Dickinson and McClements, 1996; Benichou et al., 2001), it is possible to use vegetable oils in the production of W/O or W/O/W multiple emulsions, provided that suitable emulsifiers are used (Matsumoto, 1985; Matsumoto et al., 1985; Dickinson et al., 1994; Dickinson and McClements, 1996; Benichou et al., 2001; Kanouni et al., 2002), or saturated fats such as Softisan100™ (Balcão et al., 2013, 2014), among other types of fats.

### 6.3.2.3 Fraction of dispersed primary W/O emulsion

For establishing an optimum mass fraction of the dispersed phase (W/O primary emulsion) in a W/O/W multiple emulsion, one needs to take into account both stability and EE (Zheng et al., 1993; Dickinson and McClements, 1996; Dickinson et al., 1994; Su, 2008; Su et al., 2008; Sapei et al., 2012; Mun et al., 2013; Schuch et al., 2013). It has been shown that an optimum weight fraction between the (W/O) dispersed phase and the continuous (outer, aqueous) phase should lie between 0.20 and 0.30 (w/w). At higher fractional contents of the dispersed (primary W/O emulsion) phase, multiple emulsions become more condensed, with increased viscosity (due to the higher oil content), with bigger droplet sizes, all of which lead to instability (Danner and Schubert, 2001). On the other hand, a multiple emulsion with a small fractional volume of dispersed (W/O) phase will exhibit a low EE, which counteracts any commercial potential applications (Dickinson et al., 1993, 1994; Su, 2008; Su et al., 2008; Sapei et al., 2012; Mun et al., 2013).

#### 6.3.2.4 Emulsifiers

Emulsifiers are substances that possess two distinct groups in the same molecule: a hydrophobic group (with affinity for the oily phase) and a hydrophilic group (with affinity for water) (Garti, 1997a,b; Kanouni et al., 2002); for this reason, they are termed amphiphilic molecules. These amphiphilic molecules lower the interfacial tension and thus facilitate droplet disruption (which results in smaller droplets), determining which phase is the continuous phase and which is the dispersed phase (Fennema, 1996; Benichou et al., 2001). Emulsifiers are often classified by their HLB value, which ranges from zero to more than 20 (but less than 30). The HLB scale allows one to draw conclusions pertaining to the relative overall attraction of the emulsifier to either oil or water (Orafidiya and Oladimeji, 2002; Guo et al., 2006; Pasquali et al., 2008; Schmidts et al., 2009, 2010b; Kumar et al., 2012). A low HLB index indicates a strongly lipophilic emulsifier, whereas a high HLB index indicates a strongly hydrophilic emulsifier. The HLB index is also useful as a general indicator of the solubility of an emulsifier in oil and water (Griffin, 1949, 1954; Fennema, 1996; Guo et al., 2006; Pasquali et al., 2008; Schmidts et al., 2009). In early studies of W/O/W multiple emulsions, several ionic and nonionic monomeric emulsifiers were used, but, over time, classical W/O/W multiple emulsions came to be prepared with two sets of monomeric emulsifiers—hydrophobic (e.g., Span 80), to stabilize the inner W/O interface, and hydrophilic (e.g., Tween 80), to stabilize the outer O/W interface (Garti and Aserin, 1996a,b; Schmidts et al., 2009, 2010a). However, these monomeric emulsifiers failed in providing long-term stability to W/O/W multiple emulsions (Owusu and Zhu, 1996; Garti, 1997a,b; Hou and Papadopoulos, 1996, 1997; Pays et al., 2001, 2002), mainly due to the fact that they served as both stabilizing and transporting agents. The W/O/W multiple emulsions produced using these emulsifiers usually exhibited relatively large droplet sizes and short-term stability, caused by migration of the emulsifiers from one interface to the other (Kanouni et al., 2002; Su et al., 2008). More recently, polymeric emulsifiers or macromolecular amphiphiles have progressively replaced monomeric emulsifiers, being able to form strong and more rigid films at the interface(s) (Bobin et al., 1999; Benichou et al., 2001, 2002, 2004, 2007; Allouche et al., 2003; Vasiljevic et al., 2006, 2009). Additionally, polymeric and nonionic emulsifiers can form cross-linked interfaces following adsorption. These polymeric interfacial complexes are able to withstand extensive thinning (caused by osmotic pressure-driven influx of water), with resulting swelling of the internal water cores (Garti and Aserin, 1996a,b; Benichou et al., 2002; Schmidts et al., 2009; Khatri et al., 2011; Leal-Calderon et al., 2012). Polymeric hydrophobic emulsifiers commonly used to prepare W/O/W multiple emulsions include (but are not limited to) polyglycerol polyricinoleate (PGPR) (an emulsifier derived from castor oil, with an HLB value of 4), known to be one of the most efficient oligomeric emulsifiers for W/O simple emulsions and extensively used by the food industry (alone or in combination with soy lecithin) to improve the flow properties of molten chocolate while reducing the amount of cocoa butter

needed (Wilson et al., 1998; Benichou et al., 2001; Vladisavljevic et al., 2006; Su, 2008; Frasc-Melnik et al., 2010; Bonnet et al., 2009; Saglam et al., 2011; Leal-Calderon et al., 2012; Mun et al., 2013). W/O/W multiple emulsions produced using PGPR as the emulsifier and vegetable oil as the oily phase are generally the most stable (Frasc-Melnik et al., 2010; Mun et al., 2013). The functional components of lecithin are phospholipids, which have a hydrophilic polar head and two hydrophobic fatty acid tails. Phospholipids stabilize emulsions mainly by providing electrostatic repulsive barriers to the emulsion droplets (Akhtar and Dickinson, 2001; Adachi et al., 2003; Capek, 2004; Knoth et al., 2005; Muschiolik et al., 2006; Schmidts et al., 2009), thus decreasing (toward more negative values) the zeta potential and providing good stability to the W/O/W multiple emulsion. Macromolecular amphiphilic/hydrophilic emulsifiers are also used to prepare W/O/W multiple emulsions, both synthetic and naturally occurring, known to improve interfacial coverage during the emulsification process and, concomitantly, providing both a better EE and controlled release of the entrapped entity (Kim and Shah, 1990; Zheng et al., 1993; Cornec et al., 1998; Rosano et al., 1998; Garti and Bisperink, 1998; Shima et al., 2004b; Vladisavljevic et al., 2006; Su et al., 2008; Sapei et al., 2012; Schuch et al., 2013). Typical examples of macromolecular amphiphilic/hydrophilic emulsifiers are proteins and polysaccharides. The rationale underlying the principal mechanisms of stabilization of W/O/W multiple emulsions by polymeric amphiphilic molecules involve, apparently, electrostatic repulsion between oily droplets carrying the same electrical charge, and steric stabilization resulting from biopolymers adsorbed at the interface (Benichou et al., 2004; Capek, 2004). For instance, the ability of (milk) sodium caseinate to act as an emulsifier and stabilizer at oil–water interfaces is well documented (Srinivasan et al., 2000; Ye and Singh, 2001; Day et al., 2007; Bonnet et al., 2009; Perrechil and Cunha, 2010). All caseins are amphiphilic proteins with a strong tendency to adsorb at oil–water interfaces during the production of emulsions, lowering the interfacial tension and producing a layer of adsorbed protein around the oily droplets, which protects them against subsequent coalescence and Brownian flocculation (Srinivasan et al., 2000; Ye and Singh, 2001). The high proline content of caseins is responsible for a disordered and flexible structure. During the highly dynamic conditions of homogenization in the production of W/O/W multiple emulsions, the major part of the protein is transported by convection (rather than diffusion) into the oil–water interface. The rate of adsorption of protein at the interface is determined by both its size and the immediately available binding sites on the molecule (Dickinson, 1997, 1998). As mentioned above, electrostatic interactions and steric stabilization are the main postulated mechanisms by which stabilization occurs in protein-stabilized emulsions. Regarding polysaccharide molecules, gum arabic is highly versatile and is used in food systems, mainly due to its molecular flexibility (Islam et al., 1997; Su et al., 2008; Leal-Calderon et al., 2012). It can be used in a variety of processes, including emulsification, encapsulation, stabilization, water binding, adhesion, and film formation (Dickinson and Galazka, 1991; McNamee et al., 1998; Verbeken et al., 2003; Street and Anderson, 1983;

Dickinson et al., 1991a,b; Islam et al., 1997). In W/O/W multiple emulsions stabilized by gum arabic, the postulated stabilization mechanism involves mainly steric repulsion (Chanamai and McClements, 2002; Benichou et al., 2004; Su et al., 2008; Leal-Calderon et al., 2012). Synthetic block copolymers based on silicon backbones and polyethylene oxide side chains, or poloxamers (nonionic triblock copolymers with a central hydrophobic core of polyoxypropylene, flanked by two hydrophilic chains of polyoxyethylene) have also been studied (Boyd et al., 1972; Garti and Aserin, 1996a,b; Cho et al., 2007; Balcão et al., 2013, 2014) for the production of W/O/W multiple emulsions.

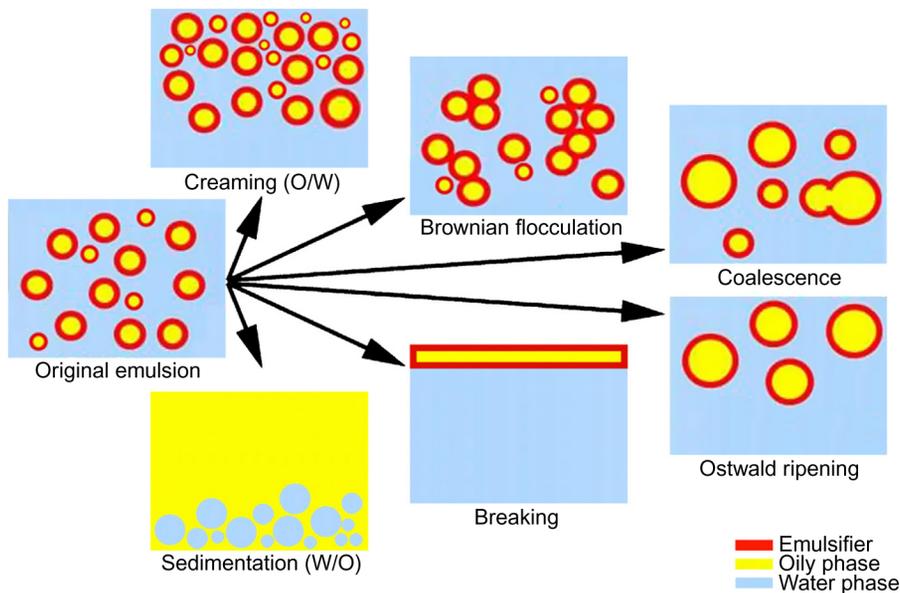
## 6.4 Spontaneous Destabilization of W/O/W Multiple Emulsions

Multiple emulsions are thermodynamically unstable by nature, and fast coalescence as well as fast release of entrapped entities have been the major drawbacks of W/O/W multiple emulsions hindering successful commercial applications. The two most relevant intrinsic problems related to W/O/W multiple emulsions are the thermodynamic instability derived from the hydrodynamic size of the oily droplets integrating the emulsions, and the uncontrolled release of entities entrapped within the inner aqueous phase; tentative approaches for counteracting such problems involve design, production, and use of polymeric emulsifiers (Bobin et al., 1999; Allouche et al., 2003; Vasiljevic et al., 2006, 2009). The inherent thermodynamic instability of W/O/W multiple emulsions largely restricts their applications in food, pharmaceutical, and cosmetic matrices (Dickinson and McClements, 1996; Garti and Aserin, 1996a,b; Einhorn-Stoll et al., 2002; Pays et al., 2001, 2002; Akhtar and Yazan, 2005; Tirnaksiz and Kalsin, 2005; Erdal and Araman, 2006; Yener and Baitokova, 2006; Tal-Figiel, 2007; Gutiérrez et al., 2008; Akhtar et al., 2010; Ghosh, 2011; Lovelyn and Attama, 2011; Jigar et al., 2011; Jiménez-Colmenero, 2013). The mechanisms that contribute to the destabilization of W/O/W multiple emulsions, with concomitant release of water and entrapped entities from the internal aqueous core to the external aqueous phase, are still not fully understood.

### 6.4.1 Destabilization Phenomena of Simple Emulsions

Plain O/W emulsions may undergo several types of physical phenomena, as illustrated in Figure 6.5. The one difference relative to W/O emulsions is that downward sedimentation rather than creaming would occur (see Figure 6.5). Creaming, Brownian flocculation, and coalescence can occur either in parallel or in sequence in each type of emulsion, and all these physical changes will eventually lead to emulsion breakdown and phase separation (Fennema, 1996). All these physical phenomena will be discussed in more detail below.

Creaming is the rise of dispersed oily droplets, which remain separated when they touch each other. This phenomenon takes place in any continuous aqueous phase if the dispersed phase



**Figure 6.5**

Schematic representation of the instability processes occurring in an O/W emulsion.

is not exactly equal in density. The smaller the dispersed oily droplets, the more resistant they are to creaming (Dickinson et al., 1991b), and thus the rate of creaming can be lowered either by decreasing the hydrodynamic sizes of droplets in the emulsion, by equalizing the densities of the two phases, or by increasing the viscosity of the continuous (aqueous) phase (Dickinson et al., 1991a,b; Garti and Aserin, 1996a,b). In the case of W/O emulsions, instead of creaming phenomena we would have sedimentation under the action of gravity, with the aqueous droplets remaining separated when they touch. Brownian flocculation consists of the aggregation of droplets in suspension, with concomitant formation of three-dimensional clusters. This is a physical process in which aggregation of dispersed oily droplets occurs as a result of collisions in combination with inter-droplet adhesive forces. Brownian flocculation is thus a complex phenomenon caused by the Brownian movement and shear motions of the dispersed oily droplets. In thermodynamically unstable emulsion systems, Brownian flocculation may be prevented if there is a sufficiently high free energy barrier between the droplets, derived from interfacial forces such as long-range van der Waals forces and electrostatic interactions (Capek, 2004). The net result of these two sets of interactions influences the behavior of the emulsion droplets with respect to Brownian flocculation and further coalescence (Dickinson et al., 1991a,b; Garti and Aserin, 1996a,b; Khatri et al., 2011). Coalescence is also a physical phenomenon, induced by the rupture of the thin films (lamellae) between closely approaching oily (or water) droplets, leading to fusion of contacting droplets, with increases in droplet hydrodynamic sizes. In this process, both the

interfacial tension and the surface area of the droplets are greatly reduced (Garti and Aserin, 1996a,b) by the considerable increase in hydrodynamic sizes. The longer the time the droplets are close to each other, the greater the probability of coalescence. Coalescence is thus a first-order process, with the probability of rupture of the films of close oily droplets occurring being proportional to their contacting area. Coalescence is less likely to occur in small and very small oily droplets, or in droplets with a thick emulsifier film, since such tiny droplets have a smaller film area between them, whereas droplets with a thick emulsifier film exhibit stronger repulsive forces (Fennema, 1996). As mentioned above, coalescence leads to larger droplets and, eventually, to phase separation (see Figure 6.5). Regarding the so-called “Ostwald ripening” phenomenon, it occurs in emulsions with polydispersed droplet sizes, and also leads to destabilization of the emulsion (Capek, 2004; Porras et al., 2008). In Ostwald ripening, collisions between two oily (or water) droplets of different sizes will lead to growth of the bigger droplet, and the smaller droplets eventually becoming very small and being solubilized in the continuous aqueous phase, thus leading to a decrease in the polydispersity index of the system (Soma and Papadopoulos, 1996; Capek, 2004). The Ostwald ripening phenomenon occurs more frequently in W/O emulsions, when the aqueous phase is sufficiently soluble in the continuous oily phase. The main driving force for Ostwald ripening is generally agreed to be Laplace pressure (i.e., the pressure difference between the inside and the outside of a curved surface, caused by the surface tension at the interface), and it can be counteracted by increasing the osmotic pressure via addition of a suitable solute to the aqueous phase, thus delaying the rate of Ostwald ripening. Upon addition of a suitable solute and as soon as a small droplet shrinks, there will be an increase in both its salt concentration and osmotic pressure, producing a driving force for water transport in the opposite direction. The net result is a stable distribution in droplet sizes (Fennema, 1996; Jager-Lezer et al., 1997; Rosano et al., 1998; Koroleva and Yurtov, 2003; Liu et al., 2007; Frasc-Melnik et al., 2010; Leal-Calderon et al., 2012). The last phenomenon to be discussed, breaking, consists in the demulsification of a O/W emulsion into separated oil and water phases.

#### **6.4.2 Coalescence Between the Internal (Discrete, Inner Core) and the External (Continuous) Aqueous Phases**

Coalescence between the internal water droplets ( $W_1$ ) and the interface of the oily droplet can lead to complete transport of the internal aqueous phase to the external aqueous phase (Ficheux et al., 1998). In a relatively recent study (Villa et al., 2003), capillary microscopy was used to study the coalescence process between internal water droplets, and between internal and external aqueous phases, in a single W/O/W multiple emulsion droplet; the researchers concluded that the interaction between individual water droplets entrapped in the core of an oily droplet is in fact similar to the interaction between water droplets in a plain W/O emulsion. In the absence of an emulsifier, and also at low emulsifier concentrations, the energy produced through the interaction between internal water droplets

exhibits a barrier, which becomes more pronounced at increasing emulsifier concentrations. Convex-convex surface interactions are much more stable than convex-concave surface interactions and, as a result, coalescence between the interior water droplets always occurs simultaneously with coalescence between the internal and external aqueous phases (Villa et al., 2003). However, when the oily droplets are destabilized, the tiny water droplets constituting the internal aqueous core may not coalesce between themselves but rather may merge with the external (continuous) aqueous phase (Hou and Papadopoulos, 1996), and although the mechanism by which this happens is not yet fully understood, Mezzenga (2007) suggested that unbalanced Laplace pressures might play an important role in this process. In a W/O/W multiple emulsion, without any osmotic pressure, the Laplace pressure associated with the small (internal) water droplets will promote water diffusion from the internal aqueous core to the external aqueous phase. Normally, the Laplace pressure needs to be equilibrated by an opposite, osmotic pressure (Leal-Calderon et al., 2012). This might be achieved by dissolving in the internal aqueous phase compounds that are not soluble in the oily phase. Salts, sugars, and even polysaccharides are able to effectively decrease the chemical potential of water, thus inducing an osmotic pressure opposing the Laplace pressure (Rosano et al., 1998; Koroleva and Yurtov, 2003; Mezzenga et al., 2004; Leal-Calderon et al., 2012). On the other hand, the stability of a W/O/W multiple emulsion can be significantly altered by an unbalanced osmotic pressure between the internal and external aqueous phases. Hence, a large osmotic pressure gradient between the internal and external aqueous phases can lead to either swelling (Geiger et al., 1998; Leal-Calderon et al., 2012) or shrinkage of the water droplets making up the aqueous core within the oily droplets, as a result of diffusive passage of water molecules across the oily layer (Dickinson and McClements, 1996; Akhtar and Dickinson, 2001). It is generally accepted that the rate of breakdown of the oily layer, or the loss of water droplets through coalescence between the internal and external aqueous phases, might be accelerated following swelling of the water droplets constituting the internal aqueous core, a process that can be controlled via regulation of the osmotic pressure gradient (Raynal et al., 1993; Csóka and Erős, 1997; Geiger et al., 1998; Benichou et al., 2004; Leal-Calderon et al., 2012).

## 6.5 Stability Enhancement in W/O/W Multiple Emulsions

In more recent studies of W/O/W multiple emulsions, the major focus has been on improving their stability and controlling the release of entrapped bioactive entities and water (Su et al., 2008; Schmidts et al., 2010a). The composition and processing conditions that directly influence the properties of W/O/W multiple emulsions have been the subject of various modifications aimed at achieving improved stability (Garti and Aserin, 1996a,b; Benichou et al., 2004; Su et al., 2008; Gutiérrez et al., 2008; Bonnet et al., 2009). One can think of several (new) approaches to improve both the stability and the controlled release in W/O/W multiple emulsions: (i) stabilization of the inner (primary) W/O emulsion, via

(a) reducing its droplet size(s), (b) formation of microspheres, (c) increasing the viscosity of the inner aqueous phase; (ii) modification of the nature of the oily phase, via (a) increasing its viscosity, (b) addition of carriers, (c) addition of complexants; and (iii) stabilization of the inner and/or outer emulsion, via (a) using polymeric emulsifiers (Bobin et al., 1999; Allouche et al., 2003; Vasiljevic et al., 2006, 2009) or (b) adding colloidal solid particles to form a stronger and more rigid film at the interface (Garti and Aserin, 1996a,b). The use of polymeric emulsifiers has been suggested to stabilize both the inner and outer interfaces (Bobin et al., 1999; Vasiljevic et al., 2009). Either naturally occurring macromolecules (gums and proteins) or synthetic, amphiphilic grafted block copolymers can be considered (Garti and Bisperink, 1998; Su et al., 2008). An extensive review of the use of such polymeric emulsifiers can be found elsewhere (Garti and Aserin, 1996b).

### **6.5.1 Control of the Size of the Internal Aqueous Droplets**

As mentioned above, the stability of W/O/W multiple emulsions might be improved via stabilization of the internal (primary) W/O emulsion by (i) mechanically reducing its droplet hydrodynamic size(s) (thus forming microemulsions), (ii) increasing the viscosity of the internal aqueous phase, or (iii) forming microspheres (Garti and Aserin, 1996b). The smaller the internal water droplets, the more aqueous droplets will be entrapped within the oily droplets. Some authors suggest that oily droplets entrapping large numbers of small internal aqueous droplets tend to exhibit the best stability, and are generally regarded as being better controlled-release carriers than oily droplets containing only a few aqueous droplets, since the internal aqueous droplets are (more) susceptible to flocculation (Dickinson and McClements, 1996; Bonnet et al., 2009). More recently, other researchers have proposed that the size(s) of the internal aqueous droplets can be controlled by changing the chemical potential of both the external and internal aqueous phases via dissolution of neutral linear polysaccharides (Mezzenga et al., 2004). Hence, as a consequence of the different chemical potentials in the two aqueous phases, transport of water occurs, leading to modification of the initial morphology of the W/O/W multiple emulsion (by altering the osmotic pressure balance between the two aqueous phases).

### **6.5.2 Modification of the Oily Phase**

Modification of the oily phase of W/O/W multiple emulsions has the potential to enhance the stability and slow down the release of entrapped entities from the internal aqueous core (Bonnet et al., 2009). Several researchers (Sela et al., 1995; Su et al., 2008) have proposed that Pickering emulsions (emulsions that are stabilized by solid particles (e.g., colloidal silica) which adsorb onto the interface between the two phases (Ramsden, 1903; Pickering, 1907)) might be shear resistant and slowly release entrapped entities. In a study by Sela et al. (1995), this concept was duly tested: fast freezing followed by slow thawing were

successively applied to a W/O/W multiple emulsion in order to accelerate microcrystallization of triglycerides in the oily phase, thus producing aqueous droplets covered by fat crystals rather than by liquid oil. In another (more recent) study by Frasch-Melnik and collaborators (Frasch-Melnik et al., 2010), water/oil ( $W_1/O$ ) emulsions containing fat crystals were incorporated into an aqueous phase ( $W_2$ ) containing sodium caseinate as the emulsifier, thus creating a stable  $W_1/O/W_2$  multiple emulsion where the  $W_1/O$  primary emulsion was exclusively stabilized by monoacylglycerol and triacylglycerol crystal shells. Other researchers have succeeded in producing W/O/W multiple emulsions using oily phases containing different types and concentrations of solid fat (Weiss et al., 2005). The solidified oily phase was shown to play an important role in the release of the entrapped entity. These researchers found that, by increasing the content of high-melting fat in the oily phase, the rate of release of entrapped L-tryptophan was reduced. Oily crystals were produced in an uncontrolled fashion in the lipid phase of the emulsion and exhibited large sizes, making the W/O/W multiple emulsion susceptible to coalescence. In spite of this disadvantage, the concept of Pickering emulsions might provide a good solution to the controlled release of entrapped entities from the aqueous core of oily droplets in W/O/W multiple emulsions.

### 6.5.3 Solubilization of Macromolecules in the Internal Aqueous Phase

Addition to the internal aqueous phase of naturally occurring macromolecular moieties such as gums or proteins improves the stability of both plain W/O emulsions and W/O/W multiple emulsions, while slowing down the release of entrapped entities (Garti and Aserin, 1996a,b; Garti, 1997b; Benichou et al., 2004; Lawson and Papadopoulos, 2004). Bovine serum albumin (BSA) is the most extensively studied macromolecule to partially replace monomeric emulsifiers in the internal aqueous phase of W/O/W multiple emulsions (Omotosho et al., 1986; Dickinson et al., 1993; Garti and Aserin, 1996a,b; Pays et al., 2001, 2002). BSA was able to improve the stability of W/O/W multiple emulsions when it was added to the internal aqueous phase in the core of the oily droplets. Other proteins and polysaccharides have also been extensively studied as partial substitutes for monomeric emulsifiers, including gelatin (Vaziri and Warburton, 1994; Sapei et al., 2012), xanthan gum (Hoppel et al., 2014), human serum albumin (HSA) (Koberstein-Hajda and Dickinson, 1996), whey proteins (Cornec et al., 1998; Saglam et al., 2011), and cyclodextrins (Yu et al., 1999). The formation of an interfacial complex between the polymers added to the internal aqueous phase and the hydrophobic emulsifiers in the oily phase was considered as a possible reason for the tremendous enhancements in stability observed in W/O/W multiple emulsions (Dickinson and McClements, 1996). The addition of a macromolecule to the internal aqueous phase may potentially slow down both diffusion of the entrapped entity and coalescence between the internal and external aqueous phases; a putative rationale by Garti (1997b) suggested that added polymers and hydrophobic emulsifiers might possibly

form an interfacial layer composed of loops and tails well anchored into both the oily and aqueous phases, while increasing the repulsion between discrete oily droplets. The stabilizing effect promoted by added polymers strongly depends on the experimental conditions used, including the concentration of polymers and the type(s) of emulsifiers utilized (Benichou et al., 2004).

#### 6.5.4 Oily Droplet Stabilization in W/O/W Multiple Emulsions

Although small oily droplets (less than 1000 nm in diameter) produced either by high-pressure homogenization or membrane homogenization exhibit good stability, further high shear should (in principle) be avoided in the second emulsification stage; otherwise, relatively large W/O/W multiple emulsion oily droplets will be formed, characterized by thermodynamic instability even when polymeric emulsifiers are utilized, as reported by several researchers (Garti and Aserin, 1996a,b). If high-shear conditions are used in the second emulsification step, the oily droplets produced undergo destabilization processes such as creaming, Brownian flocculation, and coalescence. As stated above, these types of physical instability might be reduced by decreasing the size of the oily droplets, which can be achieved by using mild stirring (Goubault et al., 2001), by using polymeric emulsifiers, or by increasing the viscosity of the external aqueous phase via addition of polymeric stabilizers or thickeners. Although some stabilizers or thickeners exhibit poor emulsifying properties (or no emulsifying properties at all) and do not interact with other ingredients (Fennema, 1996; Kanouni et al., 2002; Tesch and Schubert, 2002; Benna-Zayani et al., 2008), others might form complexes with hydrophilic emulsifiers and, through such interactions, enhance the stability of multiple emulsions (Benichou et al., 2004). In recent studies focusing on the stability of W/O/W multiple emulsions, combinations of hydrophilic (monomeric) emulsifiers and macromolecules (e.g., proteins, polysaccharides, or phospholipids) in the external (continuous) aqueous phase were used, aiming not only at reducing creaming phenomena of the oily droplets but also at reducing the size of said droplets and slowing down the release of the inner aqueous phase or entrapped entities (Muguet et al., 2001; Lawson and Papadopoulos, 2004; Schuch et al., 2013). Proteins, polysaccharides, and phospholipids are natural surface-active biopolymers. Under specific conditions, polysaccharide molecules may interact with proteins in solution as well as at the interface, resulting in the formation of polysaccharide–protein complexes with concomitant immiscibility of the two biopolymers. Complexation of polysaccharides and proteins also alters both the viscosity and the behavior of these polymers at the interfaces, and enhances functional properties when compared with proteins and polysaccharides alone (Rosano et al., 1998; Benichou et al., 2004). Factors that influence such interactions are the ratio of protein/polysaccharide, pH, ionic strength, molecular weight, net charge, and the three-dimensional (tertiary) structure and plasticity of the protein molecules (Garti, 1997a,b; Benichou et al., 2004). In emulsion systems, electrostatic aggregation between protein

molecules with opposite charges and polysaccharide molecules allows a better anchoring of the newly formed macromolecular amphiphiles onto oil–water interfaces (Benichou et al., 2002, 2004). However, in complex emulsion systems, such as W/O/W multiple emulsions, not much has been done on the use of protein-polysaccharide conjugates. Caseinate-dextran conjugates and whey protein isolate-xanthan gum complexes were reported to increase stability in regard to coalescence and slow down the release of entrapped entities, even at low pH values, where proteins usually cannot work well (Benichou et al., 2007). Mixtures of biopolymers (as long as they are compatible) usually increase the viscosity of the aqueous phases, complex either with the oil or the emulsifier(s), and produce systems that will behave much like microcapsules, microspheres, and mesospheric liquid crystals, systems that are more stable than emulsions (Benichou et al., 2004).

## 6.6 Physicochemical Characteristics of W/O/W Multiple Emulsions

W/O/W multiple emulsions are complex systems in nature and are thermodynamically unstable, with a tendency to suffer coalescence; rupture of oily droplets, coalescence phenomena, and changes of interfacial tension within the oily droplets are in fact very difficult to detect (Dickinson and McClements, 1996; Garti, 1997a,b; Porras et al., 2008). Usually, the morphological characteristics of W/O/W multiple emulsions are defined using (cryo-)scanning electron microscopic (cryo-SEM) examination (photomicrography), by counting the volume, size, and number of oily droplets (polydispersity index) immediately after production of the W/O/W multiple emulsion and after prolonged storage (Balcão et al., 2013, 2014), by performing viscosity measurements (Pal, 2008), and by quantitative estimation of the entrapped entity transported from the internal aqueous phase to the external aqueous phase (EE) and vice versa. Additionally, the interfacial tension may also be measured, calculated, and interpreted in terms of stability of the W/O/W multiple emulsion (Garti, 1997a,b; Kanouni et al., 2002; Shima et al., 2004b).

### 6.6.1 Hydrodynamic Size Distribution of Oily Droplets

The hydrodynamic size distribution of the oily droplets, or polydispersity index, is one of the most important parameters of any emulsion, since it will influence the rheology, stability, color, and taste of the emulsion (Boyd et al., 1972; Danner and Schubert, 2001; Pal, 2011; Tadros, 2013). The hydrodynamic size distribution of the oily droplets is generally measured by dynamic laser light scattering (DLS) techniques (an analytical technique that can be used to determine the size distribution profile of small particles in suspension, or polymers in solution, producing results such as hydrodynamic size, polydispersity index, and zeta potential of the emulsion) and (cryo-)scanning electron microscopy (allowing one to observe morphological characteristics and size distribution of

the oily droplets) (Balcão et al., 2013, 2014); very recent and new analytical techniques such as pulsed-field-gradient nuclear magnetic resonance, for determining self-diffusion coefficients calculated from the Stejskal–Tanner equation (Ghi et al., 2002; Hrabe et al., 2007; Stait-Gardner et al., 2009), have also started to be used in the characterization of W/O/W multiple emulsions. When using DLS (also known as photon correlation spectroscopy or quasi-elastic light scattering) to analyze a W/O/W multiple emulsion, there is an index mismatch between the internal water phase and the oily droplets, in addition to the mismatch between the oily droplets and the external aqueous phase. The structure and dynamics inside the oily droplets complicates the interpretation of laser light scattering; the results are obtained based on the assumption that the internal water phase do not significantly change the refractive index of the oily droplets (Dickinson et al., 1994; Wang et al., 2006).

### 6.6.2 Entrapment Efficiency

When characterizing the success of a W/O/W multiple emulsion, the most important parameter is the EE (Owusu et al., 1992; Koberstein-Hajda and Dickinson, 1996; Meng et al., 2004; Su et al., 2008; Mun et al., 2013; Schuch et al., 2013). EE is the volume fraction (% , v/v) of the aqueous phase of the primary W/O emulsion, or the bioactive entity, that is retained as the internal aqueous phase in the final W/O/W multiple emulsion (Leal-Calderon et al., 2012). This parameter can be determined by measuring the release into the W/O/W multiple emulsion continuous phase of an oil-impermeable solute marker present in the dispersed aqueous phase of the primary W/O emulsion (Dickinson and Galazka, 1991; Dickinson et al., 1991a,b; Owusu et al., 1992). The EE can then be calculated as  $EE(\%) = \left\{ 1 - \frac{C_w^* \times V_w^*}{C_w \times V_w} \right\} \times 100$ , where  $C_w^*$  is the concentration of marker or bioactive entity in the external aqueous phase of the W/O/W multiple emulsion,  $V_w^*$  is the volume of the external aqueous phase of the W/O/W multiple emulsion,  $C_w$  is the known value of the concentration of the solution of marker or bioactive entity initially encapsulated, and  $V_w$  is the volume of the internal aqueous phase of the primary W/O emulsion. An (ideal) EE value of 100% would correspond to a situation in which all the internal aqueous phase and entrapped bioactive entity in the original primary W/O emulsion remain intact during the subsequent (second-stage) emulsification and storage. However, the real EE value is affected by the severity of the second-stage emulsification process. In practice, since the primary W/O emulsion breaks down to some extent under the influence of the hydrodynamic forces involved in the second-stage emulsification, the aim is to minimize (as far as possible) the extent of such breakdown (Dickinson and McClements, 1996). Once the W/O/W multiple emulsions are produced, the change in EE values can be correlated with the stability of the multiple emulsion (Mun et al., 2013).

## **6.7 Kinetics of the Release of Water-Soluble Entities Entrapped in the (Internal) Aqueous Core of a W/O/W Multiple Emulsion**

The use of amphiphilic proteins (such as BSA and casein) together with monomeric emulsifiers has been linked to improved stability and slow-release properties of W/O/W multiple emulsions. Kinetic results published by several researchers have clearly demonstrated the role of BSA as both the inner and outer emulsifier (Garti and Aserin, 1996a,b); diffusion-controlled mechanisms were suggested by the same authors pertaining to the release mechanism in the presence of macromolecular amphiphiles. Water-soluble entrapped entities appear to be released via reverse micelles that are formed in the oily phase (mainly by the monomeric emulsifiers) and whose rate is diffusion-controlled (Garti and Aserin, 1996a,b; Garti and Bisperink, 1998). These same authors also reported that the lag time and release rates can be modified by addition of variable amounts of monomeric emulsifiers. Studies of the release of bioactive entities entrapped in the inner aqueous core, using rheometry and conductimetry, showed that two simultaneous release mechanisms may exist: (i) a breakdown of the oily membrane followed by expulsion of the entrapped entity, and (ii) a diffusion of the entrapped entity through the oily membrane (Raynal et al., 1993; Jager-Lezer et al., 1997; Geiger et al., 1998; Sapei et al., 2012).

## **6.8 Potential Practical Applications of W/O/W Multiple Emulsions**

As is clear by now, W/O/W multiple emulsions are complex vesicular systems which have the potential to be used in many ways. These systems protect the entrapped entities in the inner aqueous phase, and can prolong their release to the outer aqueous phase (Balcão et al., 2013, 2014). For example, bacteriophage (or simply phage) particles possess a high potential for water and food decontamination as well as for biopharmaceutical applications (Gutiérrez et al., 2008; Puapermpoonsiri et al., 2009; Chan and Abedon, 2012; Balcão et al., 2014). However, like most protein entities or enzymes, phage particles are fragile, and therefore stabilization is required (Balcão et al., 2013, 2014; Balcão and Vila, 2014). One possibility is to encapsulate these protein particles into nanometer-sized vesicles so as to protect them from deactivation (Balcão and Vila, 2014; Balcão et al., 2014). The development of strategies that may permit structural and functional stabilization of phage particles via nanoencapsulation in W/O/W multiple emulsions may increase both their food and biopharmaceutical applicability (Anton et al., 2008; Ghosh, 2011; Srinivas et al., 2010; Atul and Mitali, 2012; Silva et al., 2012; Balcão et al., 2013, 2014; Balcão and Vila, 2014). Such lytic phage-encasing nanovesicles could be utilized, for example, in the formulation of aerosols to eliminate bacterial infections and/or contaminations, with one clear advantage: the adhesive nanovesicles could slowly liberate their bacterial predatory content, thus reducing both the need for chemical disinfectants and antibiotics, and infection elimination time. Oral/nasal delivery of protein molecules has been long identified as one of the main

challenges in drug delivery science and technology (Yeo et al., 2001; García-Fuentes et al., 2002; Onuki et al., 2004; Reis et al., 2006a,b; Almeida and Souto, 2007; Lee and Yuk, 2007; Sanjula et al., 2009; Yang et al., 2009; Atul and Mitali, 2012). Increasingly, techniques aiming at the full stabilization of protein entities based on nanoencapsulation procedures have gained momentum (Balcão and Vila, 2014). Due to being entrapped in very confined environments, the molecular motions of water molecules are altered due to their dipolar nature, causing them to slow down. Confinement in nanoporous matrices or nanocapsules (such as the aqueous-core oily vesicles that integrate W/O/W multiple emulsions) has, therefore, the same effect as the osmolytes with respect to changing water activity. Due to increased viscosity (translational, vibrational, and rotational) and entropic confinement (physical entrapment), the protein entities can be fully stabilized for storage (Balcão et al., 2013, 2014; Balcão and Vila, 2014). W/O/W multiple emulsions do have more potential applications for food than O/W/O emulsions, because most food matrices are water based (Bonnet et al., 2009, 2010; Silva et al., 2012; Jiménez-Colmenero, 2013). However, and despite their immense potential, the application of W/O/W multiple emulsion systems in food matrices has been quite limited by their inherent thermodynamic instability, which causes, among other problems, leakage of the entrapped entities from the internal aqueous phase, Brownian flocculation of the oily droplets, or phase separation during processing and storage (Hino et al., 2001; Benichou et al., 2004; Gutiérrez et al., 2008; Mun et al., 2013). As stated before, the stability of W/O/W multiple emulsions is largely determined by their composition (including the nature of the oily phase, the type of emulsifier(s), and the nature of entrapped entities, particularly if the entity was entrapped along with electrolytes), production methodologies, and storage conditions (Dickinson et al., 1994; Onuki et al., 2004). When compared with single W/O or O/W emulsions, the destabilization processes experienced by W/O/W multiple emulsion systems are much more varied (Florence and Whitehill, 1985; Sapei et al., 2012). Hence, a better understanding of the unique properties and characteristics of W/O/W multiple emulsions subject to different physical conditions would greatly increase the opportunity to both improve their stability and enhance their potential applications in the food industry (Bonnet et al., 2009, 2010; Ghosh, 2011; Silva et al., 2012; Jiménez-Colmenero, 2013). In spite of the aforementioned problems, W/O/W multiple emulsions do have a great potential to be used in the cosmetic (Akhtar and Yazan, 2005; Yener and Baitokova, 2006; Tal-Figiel, 2007; Akhtar et al., 2010; Ghosh, 2011), pharmaceutical (Tirnaksiz and Kalsin, 2005; Schmidts et al., 2010a; Ghosh, 2011; Jigar et al., 2011; Lovelyn and Attama, 2011; Atul and Mitali, 2012), and food industries (Balcão et al., 2013; Jiménez-Colmenero, 2013), for the slow or controlled release of entrapped bioactive entities through the intermediate oily phase. The extent of such release depends on many factors, including the solubility of the entrapped bioactive entity in the oily phase, the nature of the oily phase, and the viscoelasticity of the emulsifier layer adsorbed at the oily phase (Matsumoto and Kang, 1989; Dickinson and McClements, 1996). But the practical applications of W/O/W multiple emulsions have been quite limited,

the biggest hurdle(s) being their inherent thermodynamic instability, coupled with difficulties in stabilizing these complex systems using GRAS and cost-effective ingredients with processing methodologies prone to scale-up (Hino et al., 2001; Benichou et al., 2004). The presence of an additional component in the internal aqueous phase may itself compromise the stability of the system by interfering with the stabilizing properties of the hydrophobic emulsifier or by promoting an osmotic pressure gradient (Frasch-Melnik et al., 2010). The occurrence and type of instability also depends on the chemical type of the entrapped entity, the oily droplet hydrodynamic sizes in the emulsion, and the nature of the emulsifiers in the system (Matsumoto, 1985; Muschiolik, 2007). Although relevant studies to date have been mostly limited to pharmaceutical and cosmetic applications (Akhtar and Yazan, 2005; Yener and Baitokova, 2006; Tal-Figiel, 2007; Akhtar et al., 2010; Jigar et al., 2011; Lovelyn and Attama, 2011), due to the fact that in these fields the systems are simpler and there is a wider choice of components, the potential applications of W/O/W multiple emulsions in food systems are gathering increased interest among the scientific community (Jiménez-Colmenero, 2013), notwithstanding the fact that food matrices contain multiple ingredients, all of which might have an impact on the stability of these complex W/O/W multiple emulsions, added to the strict regulation of food ingredients by governmental agencies. In the pharmaceutical industry, W/O/W multiple emulsions possess the potential to improve biological availability, prolonged delivery of the active principle, function as sorbent reservoirs of drugs for overdose treatments, and in the immobilization of enzymes (Garti and Aserin, 1996a,b; Couvreur et al., 1997; Garti, 1997a; Okochi and Nakano, 2000; Yeo et al., 2001; Onuki et al., 2004; Farahmand et al., 2006; Vasiljevic et al., 2006; Jigar et al., 2011; Atul and Mitali, 2012; Schmidts et al., 2012). Also, potential biopharmaceutical applications as a consequence of the dispersal of one aqueous phase inside the oily droplets dispersed in another aqueous phase include uses such as vaccine adjuvants (Herbert, 1965; Engel et al., 1968; Garti and Aserin, 1996a,b; Eratalay et al., 2004; Solans et al., 2005; Kumar et al., 2012), intestinal delivery of insulin (Onuki et al., 2004), or encapsulation of atorvastatin (Jigar et al., 2011). In the cosmetic industry, potential applications of W/O/W multiple emulsions include the slow release of antioxidants such as antocyanins, lycopene, beta-carotene, lutein, and resveratrol, among others (Yazan et al., 1997; Ribeiro et al., 2003; Rodríguez-Huezo et al., 2004; Akhtar and Yazan, 2005; Yener and Baitokova, 2006; Akhtar et al., 2010; Hemar et al., 2010; Ferrari and Rocha-Filho, 2011; Özkan and Bilek, 2014). In the food industry, two major potential applications of W/O/W multiple emulsions exist: (i) encapsulation of bioactive compounds, with attainment of EE values of up to 100% of the internal aqueous phase during the production process of the emulsion (e.g., in supplementing products with sensitive micronutrients in the internal aqueous phase), to mask unpleasant flavors of bioactive ingredients, or to achieve controlled release of flavors (Owusu et al., 1992; Dickinson and McClements, 1996; Muschiolik, 2007); practical examples of food applications include patented salted creams (encapsulation of salt) and aromatic

mayonnaises (Su, 2008; Sapei et al., 2012); and (ii) functional foods, where the use of W/O/W multiple emulsions allows the use of less oil, thus indicating the potential for taking up less oil in the diet and lowering costs (Dickinson and McClements, 1996; Garti and Aserin, 1996a,b; Jiménez-Colmenero, 2013). Another (but this time promising) application is in the formulation of reduced-fat cheese-like products and dairy-like products. The development of dairy-like products containing less milkfat associated with a smaller ratio between saturated fat (SF) and unsaturated fat (UF) has the potential to contribute to improving the health of consumers (Lobato-Calleros et al., 2006). In spite of all the potential uses of W/O/W multiple emulsions, no real commercial products yet exist in the market; the two major reasons for this are the inherent instability of the multiple emulsion preparations and the uncontrolled release of the entrapped bioactive entities (both on the shelf and within the time of the application). Naturally occurring (bio) macromolecules, such as selected proteins (BSA, HSA, gelatin), and hydrocolloids (gum arabic (Su et al., 2008)) have been used by several researchers (Garti and Bisperink, 1998) with great success to improve the formation of films on the aqueous and the oily phases (allowing better anchoring, full coverage, a thick layer, low desorption, no interfacial migration) together with monomeric classical hydrophobic and hydrophilic emulsifiers. The polymer-surfactant complex constitutes an ideal interfacial barrier for the diffusion-controlled transport of both hydrophobic (nonionized, lipid-like molecules) and hydrophilic (ionized molecules, hydrophilic organic molecules, and electrolytes) entities, significantly improving both the thermodynamic stability and EE, while at the same time reducing micellar transport via reverse micelles with concomitant limitation of migration (Garti and Aserin, 1996a,b; Shima et al., 2004b; Capek, 2004; Su et al., 2008). Polymeric surfactants, in combination with conventional smaller molecular weight emulsifiers, were suggested by several researchers as future emulsifiers for W/O/W multiple emulsions (Garti and Aserin, 1996a,b; Garti and Bisperink, 1998).

## Acknowledgments

Funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (FAPESP Ref. No. 2013/03181-6, Project PneumoPhageKill; and FAPESP Ref. No. 2013/19300-4, Auxílio Pesquisa—Reserva Técnica para Infra-estrutura Institucional de Pesquisa), is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development - Brazil) in the form of a Productivity in Research (PQ) fellowship granted to Victor M. Balcão.

## References

Adachi, S., Imaoka, H., Hasegawa, Y., Matsuno, R., 2003. Preparation of water-in-oil-in-water (W/O/W) type microcapsules by a single-droplet-drying method and change in encapsulation efficiency of a hydrophilic substance during storage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (6), 1376–1381.

- Akhtar, M., Dickinson, E., 2001. Water-in-oil-in-water multiple emulsions stabilized by polymeric and natural emulsifiers. In: Dickinson, E., Miller, R. (Eds.), *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 133–143.
- Akhtar, N., Yazan, Y., 2005. Formulation and characterization of a cosmetic multiple emulsion system containing macadamia nut oil and two antiaging agents. *Turkish J. Pharm. Sci.* 2 (3), 173–185.
- Akhtar, N., Ahmad, M., Khan, H.M.S., Akram, J., Gulfishan, Mahmood, A., et al., 2010. Formulation and characterization of a multiple emulsion containing 1% L-ascorbic acid. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 24 (1), 1–10.
- Allouche, J., Tyrode, E., Sadtler, V., Choplin, L., Salager, J.-L., 2003. Single- and two-step emulsification to prepare a persistent multiple emulsion with a surfactant-polymer mixture. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 3982–3988.
- Almeida, A.J., Souto, E., 2007. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 478–490.
- Anton, N., Benoit, J.-P., Saulnier, P., 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *J. Control. Release.* 128, 185–199.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C., Carpenter, J.F., 1993. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 10, 1–28.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C., Carpenter, J.F., 2001. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 307–326.
- Atul, P., Mitali, B., 2012. Self double emulsifying drug delivery system (sdedds): a review. *J. Drug Deliv. Ther.* 2 (6), 124–127.
- Balcão, V.M., Vila, M.M.D.C., 2014. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. *Adv. Drug Deliv. Rev.* In Press. Available online: 12 October. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.005>.
- Balcão, V.M., Costa, C.I., Matos, C.M., Moutinho, C.G., Amorim, M., Pintado, M.E., et al., 2013. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. *Food Hydrocolloids.* 32 (2), 425–431.
- Balcão, V.M., Glasser, C.A., Chaud, M.V., del Fiol, F.S., Tubino, M., Vila, M.M.D.C., 2014. Biomimetic aqueous-core lipid nanoballoons integrating a multiple emulsion formulation: a suitable housing system for viable lytic bacteriophages. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 123, 478–485.
- Becher, P., 1965. *Emulsions: Theory and Practice*. second ed. Reinhold, New York, NY.
- Becktel, W.J., Schellman, J.A., 1987. Protein stability curves. *Biopolymers.* 26, 1859–1877.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N., 2001. Polyols, high pressure, and refractive indices equalization for improved stability of W/O emulsions for food applications. *J. Dispers. Sci. Technol.* 22 (2–3), 269–280.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N., 2002. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *J. Dispers. Sci. Technol.* 23 (1–3), 93–123.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N., 2004. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109, 29–41.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N., 2007. Oil-in-water-in-oil double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide conjugates. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 297 (1–3), 211–220.
- Benna-Zayani, M., Kbir-Arighuib, N., Trabelsi-Ayadi, M., Grossiord, J.L., 2008. Stabilisation of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 316 (1–3), 46–54.
- Bibette, J., Calderon, F.L., Poulin, P., 1999. Emulsions: basic principles. *Rep. Prog. Phys.* 62, 969–1033.
- Bobin, M.-F., Michel, V., Martini, M.-C., 1999. Study of formulation and stability of emulsions with polymeric emulsifiers. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 152, 53–58.
- Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M.H., Anton, M., Leal-Calderon, F., 2009. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids.* 23, 92–101.
- Bonnet, M., Cansell, M., Placin, F., Monteil, J., Anton, M., Leal-Calderon, F., 2010. Influence of the oil globule fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 78, 44–52.

- Boyd, J., Parkinson, C., Sherman, P., 1972. Factors affecting emulsion stability, and the HLB concept. *J. Colloid Interface Sci.* 41 (2), 359–370.
- Brodin, A.F., Frank, S.G., 1978. Drug release from o/w/o multiple emulsion systems. *Acta Pharm. Suec.* 15 (2), 111–118.
- Brodin, A.F., Kavaliunas, D.R., Frank, S.G., 1978. Prolonged drug release from multiple emulsions. *Acta Pharm. Suec.* 15 (1), 1–12.
- Burgaud, I., Dickinson, E., Nelson, P., 1990. An improved high-pressure homogenizer for making fine emulsions on a small scale. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25, 39–46.
- Cai, P.-J., Tang, Y.-J., Wang, Y.-T., Cao, Y.-J., 2010. Fabrication of polystyrene hollow spheres in W/O/W multiple emulsions. *Mater. Chem. Phys.* 124, 10–12.
- Capek, I., 2004. Degradation of kinetically-stable O/W emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 107, 125–155.
- Chan, B.K., Abedon, S.T., 2012. Phage therapy pharmacology: phage cocktails. In: Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*, vol. 78. Academic Press, Burlington, VT, pp. 1–23. (Chapter 1).
- Chanamai, R., McClemonds, D., 2002. Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: influence of pH, CaCl<sub>2</sub> and temperature. *J. Food Sci.* 67 (1), 120–124.
- Cho, H.K., Cho, J.H., Cheong, I.W., 2007. Effects of biodegradable triblock copolymers on the microencapsulation of ascorbic acid-2-glucoside in W1/O/W2 multi-emulsions. *Macromol. Symp.* 249–250, 96–102.
- Corin, K.C., O'Connor, C.T., 2014. A proposal to use excess Gibbs energy rather than HLB number as an indicator of the hydrophilic–lipophilic behavior of surfactants. *Miner. Eng.* 58, 17–21.
- Cornec, M., Wilde, P., Gunning, P., Macckie, A., Husband, F., Parker, M., et al., 1998. Emulsion stability as affected by competitive adsorption between an oil-soluble emulsifier and milk proteins at the interface. *J. Food Sci.* 63 (1), 39–43.
- Couveur, M., Blanco-Prieto, M., Puisieux, F., Roques, B., Fattal, E., 1997. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28, 85–96.
- Csóka, I., Erős, I., 1997. Stability of multiple emulsions I. Determination of factors influencing multiple drop breakdown. *Int. J. Pharm.* 156, 119–123.
- Danner, T., Schubert, H., 2001. Coalescence processes in emulsions. In: Dickinson, E., Miller, R. (Eds.), *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*. Royal Society of Chemistry (Great Britain), pp. 116–124.
- Davis, S.S., Walker, I.M., 1987. Multiple emulsions as targetable delivery systems. *Methods Enzymol.* 149, 51–64.
- Davis, S.S., Hadgraft, J., Palin, K.J., 1985. Medical and pharmaceutical applications of emulsions. In: Becher, P. (Ed.), *Encyclopedia of Emulsion Technology*, vol. 2. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 159–238.
- Day, L., Xu, M., Hoobin, P., Burgar, I., Augustin, M.A., 2007. Characterization of fish oil emulsions stabilized by sodium caseinate. *Food Chem.* 105, 469–479.
- Dickinson, E., 1997. Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids.* 11 (1), 13–18.
- Dickinson, E., 1998. Proteins at interfaces and in emulsions: stability, rheology and interactions. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94 (12), 1657–1669.
- Dickinson, E., Galazka, V., 1991. Emulsifying behaviour of Gum Arabic. Part 1: effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydr. Polym.* 14, 373–383.
- Dickinson, E., McClements, D.J., 1996. Water-in-oil-in-water multiple emulsions. In: Dickinson, E., McClements, D.J. (Eds.), *Advances in Food Colloids*. Blackie academic & Professional, Cambridge, UK, pp. 280–300.
- Dickinson, E., Stainsby, G., 1988. Emulsion stability. In: Dickinson, E., Stainsby, G. (Eds.), *Advances in Food Emulsions and Foams*. Elsevier, London, pp. 1–25.
- Dickinson, E., Galazka, V., Anderson, D., 1991a. Emulsifying behavior of gum-arabic. Part 2. Effect of the gum molecular-weight on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydr. Polym.* 14 (4), 385–392.

- Dickinson, E., Evison, J., Owusu, R., 1991b. Preparation of fine protein-stabilized water-in-oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*. 5 (5), 481–485.
- Dickinson, E., Evison, J., Owusu, R., Zhu, Q., 1993. Studies of water-in-oil-in-water (w/o/w) multiple emulsions: stabilization and controlled nutrient release. In: Dickinson, E., Walstra, P. (Eds.), *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. Royal Society of Chemistry, London, pp. 276–279.
- Dickinson, E., Evison, J., Owusu, R., Williams, A., 1994. Protein-stabilized water-in-oil-in-water emulsions. In: Phillips, G., Williams, A., Wedlock, D. (Eds.), *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 91–101.
- Doster, W., Settles, M., 2005. Protein-water displacement distributions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1749, 173–186.
- Dupeyrón, D., Rieumont, J., González, M., Castaño, V.M., 2009. Protein delivery by enteric copolymer nanoparticles. *J. Dispers. Sci. Technol.* 30, 1188–1194.
- Einhorn-Stoll, U., Weiss, M., Kunzek, H., 2002. Influence of the emulsion components and preparation method on the laboratory-scal preparation of O/W emulsions containing different types of dispersed phases and/or emulsifiers. *Nahrung/Food*. 46 (4), 294–301.
- Eley, D., Hey, M., Symonds, J., 1988. Emulsions of water in asphaltene-containing oils. 1. Droplet size distribution and emulsification rates. *Colloids Surf.* 32, 87–101.
- Engel, R.H., Riggi, S.J., Fahrenbach, M.J., 1968. Insulin: intestinal absorption as water-in-oil-in-water emulsions. *Nature*. 219, 856–857. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/219856a0>.
- Eratalay, A., Öner, F., Özcengiz, E., Alpar, R., 2004. Adjuvant effects of niosome and water/oil/water multiple emulsion carrier systems for recombinant hepatitis B surface antigen. *Hacettepe Univ. J. Faculty Pharm.* 24 (2), 81–94.
- Erdal, M.S., Araman, A., 2006. Development and evaluation of multiple emulsion systems containing cholesterol and squalene. *Turkish J. Pharm. Sci.* 3 (2), 105–121.
- Farahmand, S., Tajerzadeh, H., Farboud, E., 2006. Formulation and evaluation of vitamin C multiple emulsion. *Pharm. Dev.* 11, 255–261.
- Fennema, O. (Ed.), 1996. *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Ferrari, M., Rocha-Filho, P.A., 2011. Multiple emulsions containing amazon oil: açai oil (*Euterpe oleracea*). *Braz. J. Pharmacogn.* 21 (4), 737–743.
- Ficheux, M.F., Bonakdar, L., Leal-Calderon, F., Bibette, J., 1998. Some stability criteria for double emulsions. *Langmuir*. 14, 2702–2706.
- Florence, A.T., Whitehill, D., 1982. The formulation and stability of multiple emulsions. *Int. J. Pharm.* 11, 277–308.
- Florence, A.T., Whitehill, D., 1985. Stabilization of water-in-oil-in-water multiple emulsions. In: Shar, D. (Ed.), *Macro and Micro Emulsions: Theory and Application*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 359–380.
- Floury, J., Legrand, J., Desrumaux, A., 2004. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. Study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. *Chem. Eng. Sci.* 59, 1285–1294.
- Foss, T.R., Kelker, M.S., Wiseman, R.L., Wilson, I.A., Kelly, J.W., 2005. Kinetic stabilization of the native state by protein engineering: implications for inhibition of transthyretin amyloidogenesis. *J. Mol. Biol.* 347, 841–854.
- Frasch-Melnik, S., Spyropoulos, F., Norton, I.T., 2010. W1/O/W2 double emulsions stabilized by fat crystals—formulation, stability and salt release. *J. Colloid Interface Sci.* 350, 178–185.
- Frenkel, M., Shwartz, R., Garti, N., 1983. Multiple emulsions I. Stability: inversion, apparent and weighted HLB. *J. Colloid Interface Sci.* 94 (1), 174–178.
- Freudig, B., Tesch, S., Schubert, H., 2003. Production of emulsions in high-pressure homogenizers: influence of cavitation on droplet breakup. *Eng. Life Sci.* 3 (6), 266–270.
- García-Fuentes, M., Torres, D., Alonso, M.J., 2002. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 27, 159–168.
- Garti, N., 1997a. Double emulsions—scope, limitations and new achievements. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 123–124, 233–246.

- Garti, N., 1997b. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *Food Sci. Technol.* 30 (3), 222–235.
- Garti, N., Aserin, A., 1996a. Pharmaceutical emulsions, double emulsions and microemulsions. In: Benita, S. (Ed.), *Microencapsulation—Methods and Industrial Applications*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 411–534.
- Garti, N., Aserin, A., 1996b. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 65, 37–69.
- Garti, N., Bisperink, C., 1998. Double emulsions: progress and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 3, 657–667.
- Garti, N., Frenkel, M., Schwartz, R., 1983. Multiple emulsions, Part II: proposed technique to overcome unpleasant taste of drugs. *J. Dispers. Sci. Technol.* 4, 237–252.
- Geiger, S., Tokgoz, S., Fructus, A., Jager-Lezer, N., Seiller, M., Lacombe, C., et al., 1998. Kinetics of swelling-breakdown of a W/O/W multiple emulsion: possible mechanisms for the lipophilic surfactant effect. *J. Control. Release.* 52, 99–107.
- Gheorghe, A., Stoica, A., Floarea, O., 2008. Emulsion liquid membranes stability. *U.P.B. Sci. Bull. B.* 70 (3), 23–30.
- Ghi, P.Y., Hill, D.J., Whittaker, A.K., 2002. PFG-NMR measurements of the self-diffusion coefficients of water in equilibrium poly(HEMA-co-THFMA) hydrogels. *Biomacromolecules.* 3 (3), 554–559.
- Ghosh, S., 2011. Formulation and characterisation of multiple emulsions with various additives. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 2 (2), 751–759.
- Goubault, C., Pays, K., Olea, D., Gorria, P., Bibette, J., Schmitt, V., et al., 2001. Shear rupturing of complex fluids: application to the preparation of quasi-monodisperse water-in-oil-in-water double emulsions. *Langmuir.* 17, 5184–5188.
- Griffin, W.C., 1949. Classification of surface-active agents by “HLB”. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1 (5), 311–326.
- Griffin, W.C., 1954. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 5 (4), 249–256.
- Guo, X., Rong, Z., Ying, X., 2006. Calculation of hydrophile-lipophile balance for polyethoxylated surfactants by group contribution method. *J. Colloid Interface Sci.* 298, 441–450.
- Gutiérrez, J.M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C.M., Nolla, J., 2008. Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation. *Curr. Opin. Colloid Interface. Sci.* 13, 245–251.
- Hamilton, R., 1993. Structure and general properties of mineral and vegetable oils used as spray adjuvants. *J. Pesticide Sci.* 37, 141–146.
- Hanson, J.A., Chang, C.B., Graves, S.M., Li, Z., Mason, T.G., Deming, T.J., 2008. Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides. *Nature.* 455, 85–88.
- Hemar, Y., Cheng, L.J., Oliver, C.M., Sanguansri, L., Augustin, M., 2010. Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions. *Food Biophys.* 5, 120–127.
- Herbert, W.J., 1965. Multiple emulsions—a new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet.* II, 771.
- Hino, T., Shimabayashi, S., Tanaka, M., Nakano, M., Okochi, H., 2001. Improvement of encapsulation efficiency of water-in-oil-in-water emulsion with hypertonic inner aqueous phase. *J. Microencapsul.* 18 (1), 19–28.
- Hoppel, M., Mahrhauser, D., Stallinger, C., Wagner, F., Wirth, M., Valenta, C., 2014. Natural polymer-stabilized multiple water-in-oil-in-water emulsions: a novel dermal drug delivery system for 5-fluorouracil. *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (5), 658–667.
- Hou, W., Papadopoulos, D., 1996. Stability of water-in-oil-in-water type globules. *Chem. Eng. Sci.* 51 (22), 5043–5051.
- Hou, W., Papadopoulos, K., 1997. W1/O/W2 and O1/W/O2 globules stabilized with Span 80 and Tween 80. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 125, 181–187.
- Hrabe, J., Kaur, G., Guilfoyle, D.N., 2007. Principles and limitations of NMR diffusion measurements. *J. Med. Phys.* 32 (1), 34–42.

- Illanes, A., Cauereff, A., Wilson, L., Castro, G.R., 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.* 115, 48–57.
- Islam, A., Phillips, G., Sljivo, A., Snowden, M., Williams, P., 1997. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids*. 11 (4), 493–505.
- Jaenicke, R., 1991. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* 202, 715–728.
- Jager-Lezer, N., Terrisse, I., Bruneau, F., Tokgoz, S., Ferreira, L., Clausse, D., et al., 1997. Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. *J. Control. Release*. 45, 1–13.
- Jiao, J., Burgess, D.J., 2008. Multiple emulsion stability: pressure balance and interfacial film strength. In: Aserin, A. (Ed.), *Multiple Emulsions: Technology and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ (Chapter 1).
- Jigar, V., Adarsh, S., Dhaval, R., Vijay, P., 2011. Development of stable multiple emulsion of atorvastatin. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2 (2), 419–428.
- Jiménez-Colmenero, F., 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Res. Int.* 52, 64–74.
- Jyothi, T.C., Sinha, S., Singh, S.A., Suroliya, A., Rao, A.G.A., 2007. Napin from *Brassica juncea*: thermodynamic and structural analysis of stability. *Biochim. Biophys. Acta*. 1774, 907–919.
- Kanouni, M., Rosano, H., Naouli, N., 2002. Preparation of a stable double emulsion (W1/O/W2): role of the interfacial films on the stability of the system. *Adv. Colloid Interface Sci.* 99, 229–254.
- Karbstein, H., Schubert, H., 1995. Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions. *Chem. Eng. Process.* 34, 205–211.
- Khan, A.Y., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Ahmed, F.J., Khar, R.K., 2006. Multiple emulsions: an overview. *Curr. Drug Deliv.* 3, 429–443.
- Khatri, N.L., Andrade, J., Baydak, E.N., Yarranton, H.W., 2011. Emulsion layer growth in continuous oil-water separation. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 384, 630–642.
- Kim, M., Shah, D.O., 1990. Mass transfer studies on multiple emulsion as a controlled mass release system. *Korean J. Chem. Eng.* 7 (3), 163–168.
- Knöth, A., Scherze, I., Muschiolik, G., 2005. Stability of water-in-oil-emulsions containing phosphatidylcholine-depleted lecithin. *Food Hydrocolloids*. 19, 635–640.
- Kobayashi, I., Nakajima, M., 2002. Effect of emulsifiers on the preparation of food-grade oil-in-water emulsions using a straight-through extrusion filter. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 720–727.
- Kobayashi, I., Nakajima, M., Nabetani, H., Kikuchi, Y., Shohno, A., Satoh, K., 2001. Preparation of monodisperse micron-scale microspheres by microchannel emulsification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (8), 797–802.
- Kobayashi, Y., Lou, X., Mukataka, S., Nakajima, M., 2005. Preparation of monodisperse water-in-oil-in-water emulsions using microfluidization and straight-through microchannel emulsification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (1), 65–71.
- Koberstein-Hajda, A., Dickinson, E., 1996. Stability of water-in-oil-in-water emulsions containing faba bean proteins. *Food Hydrocolloids*. 10 (2), 251–254.
- Koroleva, M., Yurtov, E., 2003. Effect of ionic strength of dispersed phase on Ostwald ripening in water-in-oil emulsions. *Colloid J.* 65 (1), 40–43.
- Kumar, R., Kumar, M.S., Mahadevan, N., 2012. Multiple emulsions: a review. *Int. J. Recent Adv. Pharm. Res.* 2 (1), 9–19.
- Lawson, L., Papadopoulos, K., 2004. Effects of a phospholipid cosurfactant on external coalescence in water-in-oil-in-water double emulsions globules. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 250, 337–342.
- Leal-Calderon, F., Homer, S., Goh, A., Lundin, L., 2012. W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. *Food Hydrocolloids*. 27, 30–41.
- Lee, K.Y., Yuk, S.H., 2007. Polymeric protein delivery systems. *Prog. Polym. Sci.* 32, 669–697.

- Liu, E., McGrath, K., 2005. Emulsion microstructure and energy input, roles in emulsion stability. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 262, 101–112.
- Liu, H.-J., He, G.-H., Lin, C., Zhao, W., Xiao, G.-K., 2007. Controlling water transport in W/O/W multiple emulsion. *Acta Phys. Chim. Sin.* 23 (6), 935–939.
- Lo, I., Florence, A.T., Treguier, J.-P., Seiller, M., Puisieux, F., 1977. The influence of surfactant HLB and the nature of the oil phase on the phase diagrams of nonionic surfactant-oil-water systems. *J. Colloid Interface Sci.* 59 (2), 319–327.
- Lozano-Calleros, C., Rodrigues, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., 2006. Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Res. Int.* 39, 678–685.
- Lovelyn, C., Attama, A.A., 2011. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *J. Biomater. Nanobiotech.* 2, 626–639.
- Luzar, A., 1996. Water-hydrogen bond dynamics close to hydrophobic and hydrophilic groups. *Faraday Discuss.* 103, 29–40.
- Marcato, P.D., Durán, N., 2008. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 1–14.
- Marie, P., Perrier-Cornet, J., 2002. Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. *J. Food Eng.* 53, 43–51.
- Matsumoto, S., 1985. W/O/W-type multiple emulsions with a view to possible food applications. *J. Texture Stud.* 17 (2), 141–159.
- Matsumoto, S., Kang, W., 1989. Formation and applications of multiple emulsions. *J. Dispers. Sci. Technol.* 10 (4–5), 455–482.
- Matsumoto, S., Koh, Y., Michiura, A., 1985. Preparation of W/O/W emulsions in an edible form on the basis of phase inversion technique. *J. Dispers. Sci. Technol.* 6 (5), 507–520.
- McNamee, B., O’Riordan, E., O’Sullivan, M., 1998. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. *J. Agric. Food Chem.* 46 (11), 4551–4555.
- Meng, F.T., Ma, G.H., Liu, Y.D., Qiu, W., Su, Z.G., 2004. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 33, 177–183.
- Mezzenga, R., 2007. Equilibrium and non-equilibrium structures in complex food systems. *Food Hydrocolloids.* 21, 674–682.
- Mezzenga, R., Folmer, B., Hughes, E., 2004. Design of double emulsions by osmotic pressure tailoring. *Langmuir.* 20, 3574–3582.
- Mine, Y., Shimizu, M., Nakashima, T., 1996. Preparation and stabilization of single and multiple emulsions using microporous class membrane. *Colloids Surface B Biointerfaces.* 6, 261–268.
- Miyawaki, O., Tatsuno, M., 2011. Thermodynamic analysis of alcohol effect on thermal stability of proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 198–203.
- Moutinho, C.G., Matos, C.M., Teixeira, J.A., Balcão, V.M., 2012. Nanocarrier possibilities for functional targeting of bioactive peptides and proteins: *state-of-the-art*. *J. Drug Target.* 20, 114–141.
- Muguet, V., Seiller, M., Barratt, G., Ozer, O., Marty, J.P., Grossiord, J.L., 2001. Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. *J. Control. Release.* 70, 37–49.
- Mun, S., Choi, Y., Park, K.-H., Shim, J.-Y., Kim, Y.-R., 2013. Influence of environmental stresses on the stability of W/O/W emulsions containing enzymatically modified starch. *Carbohydr. Polym.* 92, 1503–1511.
- Mun, S., Choi, Y., Park, S., Surh, J., Kim, Y.-R., 2014. Release properties of gel-type W/O/W encapsulation system prepared using enzymatically-modified starch. *Food Chem.* 157, 77–83.
- Muschliolik, G., 2007. Multiple emulsions for food use. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12, 200–213.
- Muschliolik, G., Scherze, I., Preissler, P., Weiss, J., Knoth, A., Fechner, A., 2006. Multiple emulsions—preparation and stability. In: 13th World Congress of Food Science & Technology, IUFoST2006, pp. 123–137. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/IUFoST:20060043>.

- Myers, J.K., Trevino, S.R., 2012. Increasing globular protein stability. *Chem. Today*. 30, 30–33.
- Ó'Fágáin, C., 2003. Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 137–149.
- Okochi, H., Nakano, M., 2000. Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45 (1), 5–26.
- Omotosho, J., Whateley, T., Law, T., Florence, A., 1986. The nature of the oil phase and the release of solutes from multiple (W/O/W) emulsions. *J. Pharm. Pharmacol.* 38, 865–870.
- Onuki, Y., Morishita, M., Takayama, K., 2004. Formulation optimization of water-in-oil-water multiple emulsion for intestinal insulin delivery. *J. Control. Release*. 97, 91–99.
- Orafidiya, L.O., Oladimeji, F.A., 2002. Determination of the required HLB values of some essential oils. *Int. J. Pharm.* 237, 241–249.
- Owusu, R., Zhu, Q., 1996. Interfacial parameters for Spans and Tweens in relation to water-in-oil-in-water multiple emulsion stability. *Food Hydrocolloids*. 10 (2), 245–250.
- Owusu, R., Zhu, Q., Dickinson, E., 1992. Controlled release of L-tryptophan and vitamin B2 from model water/oil/water multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*. 6 (5), 443–453.
- Özkan, G., Bilek, S.E., 2014. Microencapsulation of natural food colourants. *Int. J. Nutr. Food Sci.* 3 (3), 145–156. Available from: <http://dx.doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140303.13>.
- Pal, R., 2008. Viscosity models for multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*. 22, 428–438.
- Pal, R., 2011. Rheology of simple and multiple emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 41–60.
- Pasquali, R.C., Taurozzi, M.P., Bregni, C., 2008. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *Int. J. Pharm.* 356, 44–51.
- Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., Leal-Calderon, F., 2001. Coalescence in surfactant-stabilized double emulsions. *Langmuir*. 17, 7758–7769.
- Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., Leal-Calderon, F., 2002. Double emulsions: how does release occur? *J. Control. Release*. 79, 193–205.
- Peng, L.-C., Liu, C.-H., Kwan, C.-C., Huang, K.-F., 2010. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. *Colloids Surf. A Phys. Eng. Asp.* 370, 136–142.
- Perrechil, F.A., Cunha, R.L., 2010. Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. *J. Food Eng.* 97, 441–448.
- Perrier-Cornet, J.M., Marie, P., Gervais, P., 2005. Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *J. Food Eng.* 66 (2), 211–217.
- Petersen, S.B., Jonson, P.H., Fojan, P., Petersen, E.I., Petersen, M.T.N., Hansen, S., et al., 1998. Protein engineering the surface of enzymes. *J. Biotechnol.* 66, 11–26.
- Pickering, S.U., 1907. Emulsions. *J. Chem. Soc. Trans.* 91, 2001–2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/CT9079102001>.
- Porras, M., Solans, C., González, C., Gutiérrez, J.M., 2008. Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method. *Colloids Surf. A Phys. Eng. Asp.* 324, 181–188.
- Prinderre, P., Piccerelle, Ph., Cature, E., Kalantzis, G., Reynier, J.P., Joachim, J., 1998. Formulation and evaluation of o/w emulsions using experimental design. *Int. J. Pharm.* 163, 73–79.
- Puapermpoonsiri, U., Spencer, J., van der Walle, C.F., 2009. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 26–33.
- Ramsden, W., 1903. Separation of solids in the surface-layers of solutions and “suspensions” (Observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation)—preliminary account. *Proc. R. Soc. London*. 72 (477–486), 156–164. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsp1.1903.0034>.
- Raynal, S., Grossiord, J.L., Seiller, M., Clause, D., 1993. A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. *J. Control. Release*. 26 (2), 129–140.
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006a. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2, 53–65.

- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006b. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2, 8–21.
- Ribeiro, H.S., Ax, K., Schubert, H., 2003. Stability of lycopene emulsions in food systems. *J. Food Sci.* 68 (9), 2730–2734.
- Rodríguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J., 2004. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *J. Food Sci. E Food Eng Phys. Prop.* 69 (7), E351–E359.
- Rosano, H.L., Gandolfo, F.G., Hidrot, J.-D.P., 1998. Stability of W1/O/W2 multiple emulsions: influence of ripening and interfacial interactions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 138, 109–121.
- Saglam, D., Venema, P., de Vries, R., Sagis, L.M.C., van der Linden, E., 2011. Preparation of high protein micro-particles using two-step emulsification. *Food Hydrocolloids.* 25, 1139–1148.
- Sanjula, B., Shah, F.M., Javed, A., Alka, A., 2009. Effect of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement. *J. Drug Target.* 17, 249–256.
- Sapei, L., Naqvi, M.A., Rousseau, D., 2012. Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids.* 27, 316–323.
- Scharnagl, C., Reif, M., Friedrich, J., 2005. Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochim. Biophys. Acta.* 1749, 187–213.
- Scherze, I., Knoth, A., Muschiolik, G., 2006. Effect of emulsification method on the properties of lecithin- and PGPR-stabilized water-in-oil emulsions. *J. Dispers. Sci. Technol.* 27, 427–434.
- Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F., 2009. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 338, 184–192.
- Schmidts, T., Dobler, D., Schlupp, P., Nissing, C., Garn, H., Runkel, F., 2010a. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: effect of additives on emulsion stability. *Int. J. Pharm.* 398, 107–113.
- Schmidts, T., Dobler, D., Guldan, A.-C., Paulus, N., Runkel, F., 2010b. Multiple W/O/W emulsions—using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 372, 48–54.
- Schmidts, T., Marquardt, K., Schlupp, P., Dobler, D., Heinz, F., Mäder, U., et al., 2012. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNAszymes. *Int. J. Pharm.* 431, 61–69.
- Schubert, H., Armbruster, H., 1992. Principles of formation and stability of emulsions. *Int. Chem. Eng.* 32 (1), 14–28.
- Schubert, H., Engel, R., 2004. Product and formulation engineering of emulsions. *Trans IChemE, Part A Chem. Eng. Res. Des.* 82 (A9), 1137–1143.
- Schuch, A., Deiters, P., Henne, J., Köhler, K., Schuchmann, H.P., 2013. Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water. *J. Colloid Interface Sci.* 402, 157–164.
- Seifriz, W., 1925. Studies in emulsion. *J. Phys. Chem.* 29, 738–749.
- Sela, Y., Magdassi, S., Garti, N., 1995. Release of markers from the inner water phase of W/O/W emulsions stabilized by silicone-based polymeric surfactants. *J. Control. Release.* 33 (1), 1–12.
- Sevciková, P., Kaspárková, V., Vltavská, P., Krejci, J., 2012. On the preparation and characterization of nanoemulsions produced by phase inversion emulsification. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 410, 130–135.
- Shima, M., Kobayashi, Y., Fujii, T., Tanaka, M., Kimura, Y., Adachi, S., et al., 2004a. Preparation of fine W/O/W emulsion through membrane filtration of coarse W/O/W emulsion and disappearance of the inclusion of outer phase solution. *Food Hydrocolloids.* 18, 61–70.
- Shima, M., Tanaka, M., Kimura, Y., Adachi, S., Matsuno, R., 2004b. Hydrolysis of the oil phase of a W/O/W emulsion by pancreatic lipase. *J. Control. Release.* 94, 53–61.
- Shima, M., Kobayashi, Y., Kimura, Y., Adachi, S., Matsuno, R., 2004c. Effect of the hydrophilic surfactants on the preparation and encapsulation efficiency in coarse and fine W/O/W type emulsions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 238, 83–90.
- Shimizu, M., Nakane, Y., 1995. Encapsulation of biologically active proteins in a multiple emulsion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (3), 492–496.

- Silva, H.D., Cerqueira, M.Â., Vicente, A.A., 2012. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food Bioprocess Technol.* 5, 854–867.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J., 2005. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102–110.
- Soma, J., Papadopoulos, K., 1996. Ostwald ripening in sodium dodecyl sulfate-stabilized decane-in-water emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 181 (1), 225–231.
- Sourdet, S., Relkin, P., Fosseux, P., Aubry, V., 2002. Composition of fat protein layer in complex food emulsions at various weight ratios of casein-to-whey proteins. *Lait.* 82, 567–578.
- Srinivas, P.R., Philbert, M., Vu, T.Q., Huang, Q., Kokini, J.L., Saos, E., et al., 2010. Nanotechnology research: applications in nutritional sciences. *J. Nutr.* 140, 119–124.
- Srinivasan, M., Singh, H., Munro, P., 1996. Sodium caseinate-stabilized emulsions: factors affecting coverage and composition of surface proteins. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3807–3811.
- Srinivasan, M., Singh, H., Munro, P., 2000. The effect of sodium chloride on the formation and stability of sodium caseinate emulsions. *Food Hydrocolloids.* 14 (5), 497–507.
- Stait-Gardner, T., Willis, S.A., Yadav, N.N., Zheng, G., Price, W.S., 2009. NMR Diffusion Measurements of Complex Systems, *diffusion-fundamentals.org* (The Open-Access Journal for the Basic Principles of Diffusion Theory, Experiment and Application) 11, 15, pp. 1–22.
- Stang, M., Schuchmann, H., Schubert, H., 2001. Emulsification in high-pressure homogenizers. *Eng. Life Sci.* 1 (4), 151–157.
- Street, C., Anderson, D., 1983. Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other acacia gum exudates. *Talanta.* 30, 887–893.
- Su, J., 2008. Formation and stability of food-grade water in oil in water emulsions (Ph.D. thesis). Riddet Institute, Massey University, New Zealand, p. 226.
- Su, J., Flanagan, J., Singh, H., 2008. Improving encapsulation efficiency and stability of water-in-oil-in-water emulsions using a modified gum arabic (Acacia (sen) SUPER GUM™). *Food Hydrocolloids.* 22, 112–120.
- Sugiura, S., Nakajima, M., Seki, M., 2002. Preparation of monodispersed emulsions with large droplets in microchannel emulsification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 515–519.
- Tadros, T.F., 2013. Emulsion formation, stability and rheology. In: Tadros, T.F. (Ed.), *Emulsion Formation and Stability*, first ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany, pp. 1–75.
- Taisne, L., Walstra, P., Cabane, B., 1996. Transfer of oil between emulsion droplets. *J. Colloid Interface Sci.* 184, 378–390.
- Tal-Figiel, B., 2007. The formation of stable W/O, O/W, W/O/W cosmetic emulsions in an ultrasonic field. *Chem. Eng. Res. Des. A.* 85 (A5), 730–734.
- Tang, K.E.S., Dill, K.A., 1998. Native protein fluctuations: the conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16, 397–411.
- Tesch, S., Schubert, H., 2002. Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short-term stability of protein stabilized emulsions. *J. Food Eng.* 52, 305–312.
- Tirnaksiz, F., Kalsin, O., 2005. A topical w/o/w multiple emulsions prepared with Tetronic 908 as a hydrophilic surfactant: formulation, characterization and release study. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 8 (2), 299–315.
- Ursica, L., Tita, D., Palici, I., Tita, B., Vlaia, V., 2005. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 931–936.
- van der Graaf, S., Schroen, C., Boom, R., 2005. Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review. *J. Membr. Sci.* 251, 7–15.
- Vasiljevic, D., Parojcic, J., Primorac, M., Vuleta, G., 2006. An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. *Int. J. Pharm.* 309, 171–177.
- Vasiljevic, D.D., Parojcic, J.V., Primorac, M.M., Vuleta, G.M., 2009. Rheological and droplet size analysis of W/O/W multiple emulsions containing low concentrations of polymeric emulsifiers. *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (7), 801–816.

- Vaziri, A., Warburton, B., 1994. Some preparative variables influencing the properties of W/O/W multiple emulsions. *J. Microencapsul.* 11 (6), 649–656.
- Verbeken, D., Dierckx, S., Dewettinck, K., 2003. Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 10–21.
- Vieille, C., Zeikus, J.G., 1996. Thermoenzymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends Biotechnol.* 14, 183–191.
- Villa, C., Lawson, L., Li, Y., Papadopoulos, K., 2003. Internal coalescence as a mechanism of instability in water-in-oil-in-water double-emulsion globules. *Langmuir.* 19, 244–249.
- Vladislavljevic, G.T., Shimizu, M., Nakashima, T., 2006. Production of multiple emulsions for drug delivery systems by repeated SPG membrane homogenization: influence of mean pore size, interfacial tension and continuous phase viscosity. *J. Membr. Sci.* 284, 373–383.
- Walstra, P., 1985. Formation of emulsions. In: Lissant, K.J. (Ed.), *Encyclopaedia of Emulsion Technology*. Marcel Dekker, New York, NY, p. 57.
- Wang, W., 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 185, 129–188.
- Wang, Y.F., Tao, Z., Gang, H., 2006. Structural evolution of polymer-stabilized double emulsions. *Langmuir.* 22, 67–73.
- Weiss, J., Scherze, I., Muschiolik, G., 2005. Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids.* 19, 605–615.
- Wilson, R., Van Schie, B., Howes, D., 1998. Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR). *Food Chem. Toxicol.* 36, 711–718.
- Xie, G., Timasheff, S.N., 1997. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.* 64, 25–43.
- Yang, S., Yuan, W., Jin, T., 2009. Formulating protein therapeutics into particulate forms. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 1123–1133.
- Yazan, Y., Seiller, M., Arslan, K., 1997. Formulation and evaluation of a multiple emulsion containing glycolic acid. *Drug Cosmet. Ind.* 160, 30–37.
- Ye, A., Singh, H., 2001. Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids.* 15 (2), 195–207.
- Yener, G., Baitokova, A., 2006. Development of a w/o/w emulsion for chemical peeling applications containing glycolic acid. *J. Cosmet. Sci.* 57, 487–494.
- Yeo, Y., Baek, N., Park, K., 2001. Microencapsulation methods for delivery of Protein drugs. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6, 213–230.
- Yu, S., Bochot, A., Cheron, M., Seiller, M., Grossiord, J., Le Bas, G., et al., 1999. Design and evaluation of an original O/W/O multiple emulsion containing natural cyclodextrins as the emulsifier. *S.T.P. Pharma Sci.* 9 (3), 273–277.
- Zheng, S., Zheng, Y., Beissinger, R.L., Wasan, D.T., McCormick, D.L., 1993. Hemoglobin multiple emulsion as an oxygen delivery system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1158, 65–74.

**ANEXO G** - Artigo científico publicado: **Victor M. Balcão; Cássia A. Glasser; Marco V. Chaud; Fernando S. del Fiol; Matthieu Tubino; Marta M.D.C. Vila** (2014) **Biomimetic aqueous-core lipid nanoballoons integrating a multiple emulsion formulation: a suitable housing system for viable lytic bacteriophages**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123: 478-485.



# Biomimetic aqueous-core lipid nanoballoons integrating a multiple emulsion formulation: A suitable housing system for viable lytic bacteriophages



Victor M. Balcão<sup>a,b,\*</sup>, Cássia A. Glasser<sup>a</sup>, Marco V. Chaud<sup>a</sup>, Fernando S. del Fiol<sup>a</sup>,  
Matthieu Tubino<sup>c</sup>, Marta M.D.C. Vila<sup>a</sup>

<sup>a</sup> LaBNUS – Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, i(bs)<sup>2</sup> Intelligent Biosensing and Biomolecule Stabilization Research Group, University of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil

<sup>b</sup> CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 June 2014

Received in revised form

17 September 2014

Accepted 22 September 2014

Available online 30 September 2014

### Keywords:

Lytic bacteriophage particles

Aqueous-core lipid nanoballoons

Multiple water-in-oil-in-water emulsions

Structural stabilization

Antimicrobial activity

## ABSTRACT

The emergence of antibiotic-resistant bacterial strains and the weak penetration of antibiotics into bacterial biofilms put an emphasis in the need for safe and effective alternatives for antimicrobial treatments. The application of strictly lytic bacteriophages (or phages) has been proposed as an alternative (or complement) to conventional antibiotics, allowing release of the natural predators of bacteria directly to the site of infection. In the present research effort, production of bacteriophage derivatives (starting from lytic phage particle isolates), encompassing full stabilization of their three-dimensional structure, has been attempted via housing said bacteriophage particles within lipid nanovesicles integrating a multiple water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion. As a *proof-of-concept* for the aforementioned strategy, bacteriophage particles with broad lytic spectrum were entrapped within the aqueous core of lipid nanoballoons integrating a W/O/W multiple emulsion. Long-term storage of the multiple emulsions produced did not lead to leaching of phage particles, thus proving the effectiveness of the encapsulation procedure.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The emergence of antibiotic-resistant bacterial strains and the weak penetration of antibiotics into bacterial biofilms put an emphasis in the need for safe and effective alternatives for antimicrobial treatments. The application of strictly lytic bacteriophages (or phages) has been proposed as an alternative (or complement) to conventional antibiotics, allowing release of the natural predators of bacteria directly to the site of infection [9]. The major advantage of bacteriophage-based antibiotherapy relative to its chemical counterpart lies probably in the fact that phage particles (the natural predators of bacteria) replicate directly at the site of infection, becoming profusely available where they are most needed as long

as viable host cells still exist. When compared to antibiotics, phages present many relevant advantages: (i) permanently high concentrations at the infection site, increasing in the presence of (viable) bacterial host cells, with elimination occurring only after eradication of the later; (ii) total compatibility with antibiotics; (iii) high specificity against target-bacteria; (iv) higher penetration into bacterial biofilms, by inducing production of enzymes that hydrolyze biofilm polymeric matrix; and (v) while bacteria can develop resistance to phages, isolation and large-scale production of new lytic phages is much simpler and economical than developing a new antibiotic [17,34,35]. Water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions are examples of multiple emulsions, in which dispersions of small water droplets within larger oil droplets are themselves dispersed in a continuous aqueous phase [5,7,11,14–16,36]. Due to their compartmentalized internal structure, multiple emulsions present advantages over simple oil-in-water (O/W) emulsions for encapsulation, such as the ability to carry both polar and non-polar molecules, and a better control over releasing of therapeutic molecules [10,19,21,23]. Phage particles possess a high potential for biopharmaceutical applications. However, as most proteins or enzymes, they are fragile, and therefore stabilization

\* Corresponding author at: LaBNUS – Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba at Sorocaba's Technological Park, University of Sorocaba, Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Rodovia Raposo Tavares, km 92.5, CEP 18023-000 Sorocaba, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 15 2101 7181; fax: +55 15 2101 7000.

E-mail addresses: [victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br), [vbcalcao@gmail.com](mailto:vbcalcao@gmail.com) (V.M. Balcão).

is required [3,4,6]. One possibility is to encapsulate these protein particles into nanometer-sized vesicles so as to protect them from deactivation by the immune system and dilution effects. The development of strategies that may permit structural and functional stabilization of phage particles via nanoencapsulation may increase their biopharmaceutical applicability [3,33]. Such lytic phage-encasing nanovesicles could be utilized, e.g. in the formulation of aerosols to eliminate bacterial pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* with one clear advantage: the adhesive nanovesicles could slowly liberate their bacterial predatory content, thus reducing both the need for chemical antibiotics and infection elimination time. Oral/nasal delivery of protein molecules has been long identified as one of the main challenges in drug delivery science and technology [2,15,18,28–30,37]. Lipid-based carriers have attracted increasing scientific and commercial attention during the last few years as alternative materials for the delivery of peptides and proteins concerned with stability issues [1,8,25,27]. Recently, a newly developed technique for stabilization of proteins and enzymes based on nanoencapsulation procedures has started to gain momentum, based on encapsulation of macromolecules in a nanoporous matrix by the gelation of a solution [12,13,26]. Confinement of protein molecules within nanoporous matrices (or coatings) changes the water activity in their micro-neighborhood and therefore modifies the biochemical reaction rates. Due to increased viscosity and entropic confinement (physical entrapment), the (degradation) reaction rates are slowed down and thus the biological materials can be stabilized for storage [20,26]. In the present research work, development of a nanotechnological process for housing bacteriophage particles was pursued, aiming at their structural and functional stabilization. As a *proof-of-concept* for the aforementioned strategy, bacteriophage particles with broad lytic spectrum were entrapped within the aqueous core of oil nanodroplets integrating a W/O/W multiple emulsion, aiming at mimicking the multifunctional design of biological membranes. The composition of the stabilizing layer of the nanosystem was changed by using different proportions of lecithin and different poloxamers (nonionic triblock copolymers with a central hydrophobic core of polyoxypropylene flanked by two hydrophilic chains of polyoxyethylene), thus allowing to control degradation times of the nanovesicles. For the production of nanoemulsions, bioactive phage particles were previously dissolved in the aqueous phase prior to be dispersed in the melted lipid during homogenization in a UltraTurrax (model T25D from IKA) under heating (ca 40 °C). The optimized phage-encasing multiple emulsion formulations were subsequently fully characterized physicochemically, encompassing determination of particle size, size distribution and particle charge, via zeta potential analysis, surface morphology via cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM), and thermal analysis via differential scanning calorimetry (DSC). The antimicrobial activity of the nanoemulsions was also assessed *in vitro*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Biological materials

**Phage:** The phage particles used were a kind gift from the University of Minho (Braga, Portugal), and consisted in crude bacteriophage isolates from poultry production sewage water (code name: phi-2/2, possessing a broad lytic spectrum against enteric *Salmonella* and *Escherichia coli*). These isolates were utilized in all nanoencapsulation procedures. Bacterial host: Phage phi-2/2 was propagated in a *Salmonella* enteric *Enteritidis* host, grown in Luria-Bertani molten agar. A total volume of 40 mL of SM-buffer containing 10<sup>9</sup> PFU (plaque-forming units)/mL was lyophilized,

the lyophilizate maintained at –80 °C until use, and subsequently utilized in all multiple emulsion formulations. Dynamic laser scattering analysis of an (ultrapure) aqueous suspension of this crude bacteriophage isolate revealed an average particle size of ca. 65.2 nm.

#### 2.1.2. Chemicals

**Lipids:** Softisan100<sup>TM</sup> was a kind gift from Sasol (Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburg, Germany). Precirol ATO5 (glycerol distearate) and Compritol 888ATO (glycerol dibehenate) were kindly supplied from Gattefossé SAS (Saint Priest, France). Glycerol (anhydrous) was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). **Surfactants:** Tween 80 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Lutrol F68<sup>TM</sup> (poloxamer 188) and Lutrol F127<sup>TM</sup> were kindly supplied by BASF ChemTrade GmbH (Ludwigshafen, Germany). **Other chemicals:** CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O was obtained from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Commercial HCl (37%) and NaCl were purchased from Vaz Pereira (Lisbon, Portugal). Soybean phosphatidylcholine (lecithin) was purchased from Acofarma (Barcelona, Spain). Filter paper (0.22 μm) was purchased from Nalgene (New York NY, USA), and nonsterile filters (0.45 μm) were purchased from Nucleopore (Cambridge MA, USA). Tap water was purified in a Milli-Q Plus 185 system (Molsheim, France) to a final conductivity of ca. 18.2 MΩ cm<sup>-1</sup>. The solvents used were all of analytical grade or better, and were used without further purification.

#### 2.1.3. Analytical equipment

The zeta potential and hydrodynamic size of the multiple emulsion particles were determined in a Zetasizer (model Nanoseries Nano-ZS) from Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, United Kingdom). Calorimetric studies were carried out in a differential scanning calorimeter from Shimadzu (Kyoto, Japan), which comprised a detector (DSC-50) and a thermal analyzer (TA-501). SEM and Cryo-SEM analyses of multiple emulsions were carried out in a scanning electron microscope from JEOL (model JSM 6301F from JEOL, Tokyo, Japan), coupled with a Ion Sputter-Coater JSC1100 (JEOL, Tokyo, Japan), an INCA 350 Energy X-Ray microanalysis system via Energy Dispersive Spectrometry (SEM/EDS) from Oxford Instruments GmbH (Wiesbaden, Germany), and a cryo transfer system from Gatan Inc. (model Alto 2500 from Gatan Inc., Pleasanton CA, USA).

## 2.2. Experimental procedures

### 2.2.1. Propagation and purification of bacteriophage phi-2/2

The bacteriophage utilized in this research effort was propagated using a specific host microorganism, namely *Salmonella* enteric *Enteritidis*, grown in LB molten agar.

**2.2.1.1. Propagation of the bacteriophage.** For propagation of the bacteriophage (maintained at 4 °C as a suspension in phosphate buffer, PBS, pH 7.0), sterile filter paper strips were submerged in samples of a stock preparation of the bacteriophage solution, which were then spread on 90 mm-Petri dishes (Plastiques Gosselin, Borre, France) on the surface of a *top agar* layer (on top of a lower LB agar layer) containing the respective bacterial host. The Petri dishes were then incubated overnight at 37 °C.

**2.2.1.2. Purification of the bacteriophage.** After the incubation period, 3 mL of SM-buffer solution (100 mM NaCl; 8 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 50 mM Tris-Cl (1 M, pH 7.5); 0.002% (w/v) gelatin (2%, w/v)) were added to each Petri plate, after which they were isolated with Parafilm<sup>TM</sup> (in order to prevent them from drying out) and incubated overnight at 4 °C. Following this time period, the SM-buffer solution was recovered from each Petri plate and gathered together in a sterile centrifuge tube. The resulting mixture was

then centrifuged at  $9000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  during 10 min, so as to remove the bacterial cells. The supernatant was carefully transferred into a sterile 50 mL-Falcon tube. One volume of chloroform was then added to four volumes of supernatant, to remove bacterial cells or cell debris that persisted in the supernatant. The resulting solution was then vortexed and centrifuged at  $9000 \times g$  during 10 min, after which the supernatant was carefully withdrawn, poured into a 20-mL syringe and filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  pore diameter PES syringe filter (from Tpp-Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) into a sterile Falcon tube. This phage suspension constituted the phage stock-solution, and was stored at  $4^\circ\text{C}$  until use was in order. A total volume of 40 mL of SM-buffer containing  $10^9$  PFU (plaque-forming units)/mL was lyophilized for the subsequent experimental work.

### 2.2.2. Preparation of multiple emulsions housing bacteriophage particles

Production of multiple emulsions (*water-in-oil-in-water*, W/O/W) housing bacteriophage particles was carried out in duplicate in an UltraTurrax (model T25D from IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) under heating (ca  $39^\circ\text{C}$ ), with the bioactive phage particles being previously dissolved in the (inner) aqueous phase (Win) prior to being dispersed in the melted lipid (O) (Softisan<sup>TM</sup>) followed by high-performance homogenization (10 min at 10,000 rpm). The external aqueous phase (Wext) was then added and a new homogenization cycle performed (10 min at 10,000 rpm). Therefore, final Win/O/Wext dispersions of phage particles were obtained via sequential (optimized) homogenization of a Win/O dispersion involving two cycles at 10,000 rpm for 10 min. The inner aqueous phase was constituted by HCl 10 mM, Tween 80 and purified phage particles (with mass concentrations ranging from 5 to 10 mg/mL); the intermediate oily phase encompassed glycerol, Softisan (or Precirol or Compritol) and soybean phosphatidylcholine; finally, the outer aqueous phase encompassed Lutrol F68 (or Lutrol F127), ultrapure water and NaCl 10 mM. Control multiple emulsions were also produced, without phage particles, and stored for 92 days under the same conditions. The aforementioned solid lipids were tested as possible constituents of the oily phase, since they are considered lipids for modified release formulations. The formulations prepared with each of these lipids exhibited a milky and uniform appearance. The oily phase (O) was prepared by melting together 500 mg Softisan 100<sup>TM</sup> and 50 mg lecithin on a thermostated bath set at ca.  $39^\circ\text{C}$  and maintained at this temperature. In a separate beaker, 5 mL glycerol was heated up to ca.  $39^\circ\text{C}$  in the same thermostated bath. For the internal aqueous phase (Win), 5 mL HCl 10 mM and 50 mg Tween 80<sup>TM</sup> were heated together up to ca.  $39^\circ\text{C}$  in the same thermostated bath, and added with 5 mg lyophilized phage particles. When Softisan 100<sup>TM</sup> and lecithin were melted down, both glycerol and 1 mL of Win were added and thoroughly mixed for 10 min at 10,000 rpm, in the thermostated bath, thus forming a Win/O emulsion. The external aqueous phase (Wext) was prepared by dissolving 400 mg Lutrol F68 in 40 mL ultrapure water. 20 mL Wext was then heated up in a thermostated bath set at ca.  $39^\circ\text{C}$ , added to the Win/O emulsion produced earlier, and thoroughly mixed for 10 min at 10,000 rpm. The remainder 20 mL of poloxamer (Lutrol) solution was added to the emulsion thus produced and homogenized using a magnetic stirrer until room temperature.

### 2.2.3. Evaluation of the combined effects of homogenization time, phage concentration and ionic strength of the outer aqueous phase, for optimization of the multiple emulsion

Stability of the multiple nanoemulsions was evaluated by producing emulsions as result of the combined effects of homogenization time (10 min), phage concentration (5.0 up to

10.0 mg/mL) and ionic strength (NaCl 10 mM) of the aqueous outer phase.

### 2.2.4. Determination of hydrodynamic size and zeta potential

Zeta potential is the electric potential that prevails in the cutting plan of a particle, which is at a small distance from its surface, and which results from the measure of the mobility distribution of a dispersion of charged particles as they are subject to an electric field. The mobility can be defined as the velocity of a particle per unit electric field, and is determined by applying an electric field to the dispersion of particles and measuring their average velocity. The results obtained (in triplicate) allow determination of the hydrodynamic size of the aqueous-core lipid nanoballoons, of the polydispersion index and of their zeta potential.

### 2.2.5. Thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC)

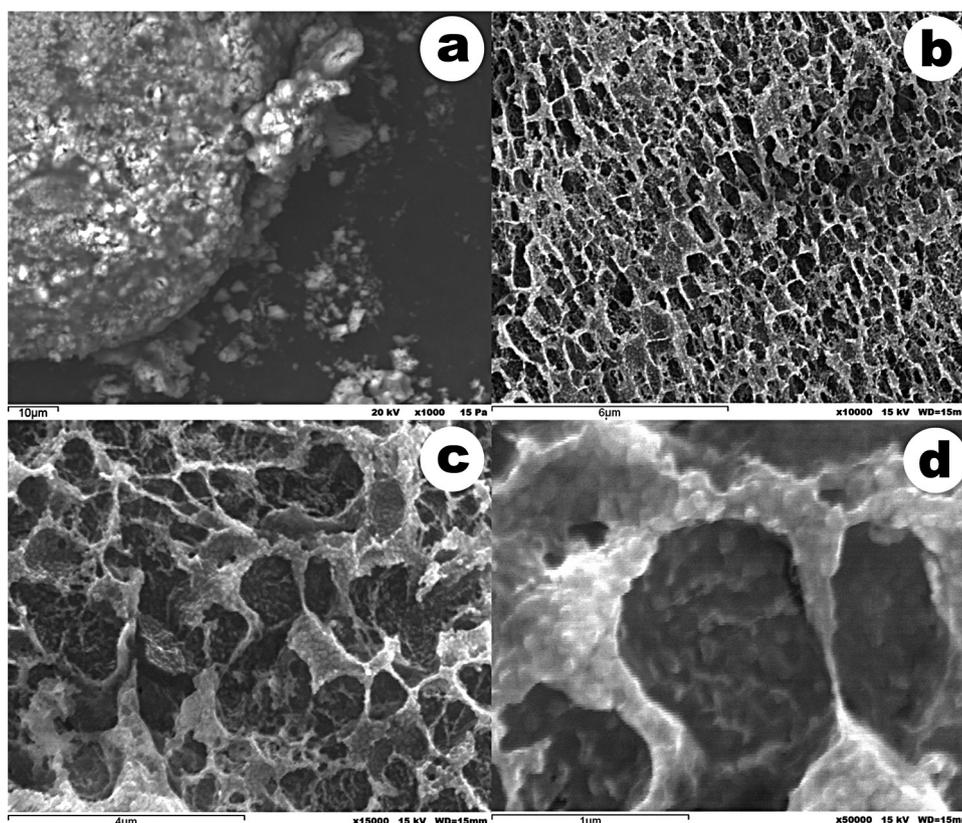
For every calorimetric assay, ca. 10 mg of multiple emulsion were weighed (using a microsyringe) directly into the interior of high-pressure aluminum pans (Shimadzu, P/N 557 201-53090, 64U3670609), and duly sealed by pressure. A reference aluminum pan was also prepared by simply sealing air inside an empty case. The samples were then heated from room temperature to  $100^\circ\text{C}$  at a constant linear heating rate of  $5^\circ\text{C min}^{-1}$ , during which the amount of heat absorbed by the multiple emulsion samples was recorded.

### 2.2.6. Antimicrobial activity of phage particles and multiple emulsions

Optimized multiple emulsions housing phage particles were screened for antimicrobial (lytic) activity, following a simple laboratory procedure: (i) multiple emulsion integrating aqueous-core lipid nanoballoons housing bacteriophage particles (1000  $\mu\text{L}$ ) were added with 20  $\mu\text{L}$  of chloroform in a test tube, to extract the encased phage particles; (ii) the resulting suspension was gently vortexed for a short period of time (5 s), and was subsequently centrifuged at  $9000 \times g$  for 10 min; (iii) following centrifugation, the (aqueous) supernatant was immediately recovered and submitted to the antimicrobial "spot" test as follows (steps iv–vii); (iv) 100  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension (*Salmonella enteric Enteritidis*) grown overnight at  $37^\circ\text{C}$  were added to 3 mL of top-agar; (v) following a gentle homogenization, the top agar added with bacterial suspension was poured into a 90 mm-Petri dish previously prepared with 10 mL bottom-agar and allowed to dry; (vi) a 5- $\mu\text{L}$  drop of the recovered supernatant sample containing phage particles (see step (iii)) was then applied on the top-agar layer and allowed to dry; (vii) incubation of the Petri dish was then allowed at  $37^\circ\text{C}$ , overnight. Blank (control) multiple emulsions were subject to the same extraction treatment, and their aqueous supernatants used as negative control. After the incubation period, production of inhibition halos was assessed.

### 2.2.7. (Cryo-) scanning electron microscopy analyses

Multiple emulsions integrating aqueous-core lipid nanoballoons housing phage particles were analyzed for microstructural and morphological characteristics via Cryo-SEM. Briefly, multiple emulsion samples were prepared for analysis as follows: (i) samples were mounted in an appropriate (aluminum) support inserted into a gold-coated plate; (ii) the gold-coated plate was then duly fixed in a transfer stick; (iii) the support containing the sample was immersed in liquid (slush) nitrogen; (iv) the sample was then transferred under vacuum into the SEM preparation chamber (also under vacuum and maintained cold via addition of liquid nitrogen); (v) once inside the chamber, the deep-frozen multiple emulsion sample was fractured, undergone sublimation (during 90–300 s) by gently increasing the temperature from  $-140$  to ca.  $-90^\circ\text{C}$ , and was sputter-coated with 100–200  $\text{\AA}$  of Au/Pd (during 20 s) in a



**Fig. 1.** Scanning electron microscopy analysis of the phage lyophilizate, using  $\times 1000$  magnification (a) and cryo-scanning electron microphotographs of phage-encasing multiple emulsions, showing the poloxamer network in the outer aqueous phase after sublimation and sputter coating with gold/palladium, for  $\times 10,000$  magnification (b),  $\times 15,000$  magnification (c), and  $\times 50,000$  magnification (d).

strong vacuum (0.5 atm) between 20 and 30 mA at 2.5 kV energy; (vi) finally, the sample was transferred into the SEM chamber for microscopy analysis. The samples were analyzed with a scanning electron microscope from JEOL operating at 5–15 kV, with an incidence angle of  $30^\circ$ , coupled with X-ray microanalysis.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. (Cryo-) scanning electron microscopy

Magnifications of phage lyophilizate of  $1000\times$  and of phage-encasing multiple emulsions of  $10,000\times$ ,  $15,000\times$  and  $50,000\times$  are depicted in Fig. 1a–d, respectively. The cryo scanning electron microphotographs of the exposed (fractured) surface of phage-encasing multiple emulsions (see Fig. 1b–d) show the poloxamer matrix structure developed during the manufacturing process and the highly homogeneous distribution of nanoballoon diameters.

#### 3.2. Optimization of the multiple emulsion

For producing an optimal multiple emulsion formulation, several variables were studied, viz. lipid nature, poloxamer concentration, soybean lecithin concentration, homogenization time, and phage lyophilizate concentration (see Table 1). A larger phage lyophilizate concentration did not lead to any changes whatsoever in the zeta potential values, but enhanced the antibacterial properties of the multiple emulsion. Addition of an electrolyte (sodium chloride) or HCl to the external aqueous phase promoted an increase in the zeta potential values (see Fig. 3) (from negative to closer to zero values), presumably due to an accumulation of adsorbed ions at the surface of the lipid nanoballoons, thereby promoting extensive phase separation. Centrifugation of

the optimized nanoformulations did not lead to any phage particles liberation induced by bursting nanovesicles (as revealed by UV–VIS spectrophotometry), thus evidencing the firm encapsulation and concomitant structural stabilization of said phage particles. Although mechanical stirring energy is important for producing the dispersion, is it not sufficient though; it only overcomes the surface tension barrier during the duration of homogenization. Therefore, the easiest way to stabilize the system is to reduce surface tension, so as to decrease the free energy derived from the expansion of the overall surface area [22]. Thus, we opted to increase the surfactant level in producing the multiple emulsion, since tensioactive agents do play an important role in stabilizing emulsions. However, most surfactants cannot reduce the interfacial tension to levels enough to counteract all the surface free energy caused by the tremendous increase in surface area during homogenization, and thus emulsions are usually considered thermodynamically unstable systems [24,31].

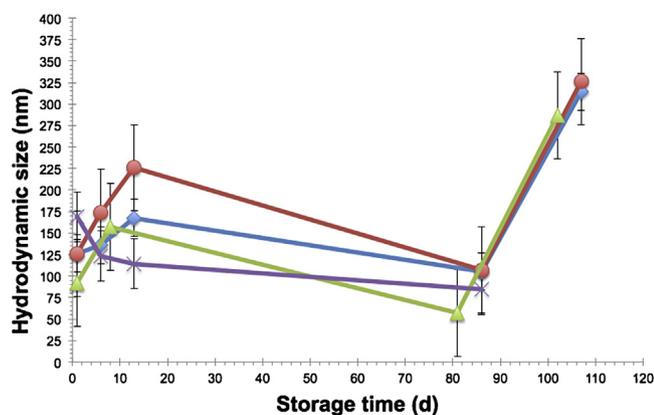
Addition of  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  to the internal phase (to stabilize the three-dimensional architecture of the phage particles) to replace HCl, and substitution of Lutrol F-68 by Lutrol F-127, led to a notorious phase separation immediately after preparation of the multiple emulsion, and thus these two reactants ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and Lutrol F-127) were discarded from further work.

#### 3.3. Hydrodynamic size and zeta potential

The net charge at the surface of particles in suspension affects the ionic distribution in their immediate surroundings, producing an electrical double layer around each particle. When a particle moves, the ions within its boundary move with it, and vice versa. Zeta potential is the potential that exists at this boundary, with

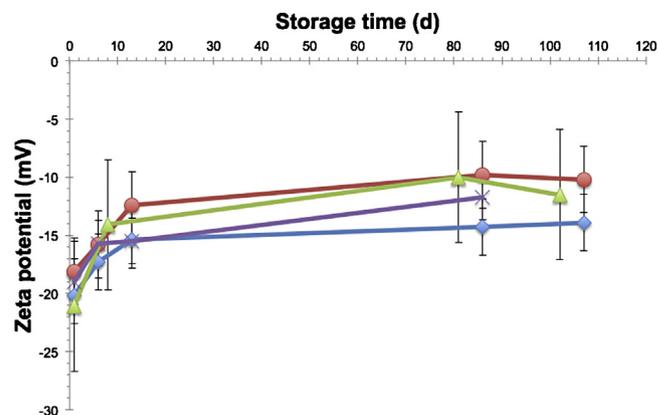
**Table 1**  
Optimization of processing conditions leading to an optimal multiple emulsion housing viable lytic bacteriophages.

Formulation parameters	Composition of the several nanoformulations (w/w)								Best formulation achieved
	Designed starting conditions	With NaCl in the external aqueous phase	With HCl in the external aqueous phase	With 25% more of soybean lecithin	With 25% more of soybean lecithin and Tween 80	With 25% more of Tween 80	With CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O in the internal aqueous phase	With 25% more of Tween 80 and 100% more of phi-2/2 phage lyophilizate	
Homogenization speed (rpm)	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	
Internal aqueous phase									
Phi-2/2 phage lyophilizate (% w/w)	0.002	0.010	0.010	0.002	0.003	0.002	0.010	0.0048	
HCl (0.010 M) (% w/w)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	0.00	2.50	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (0.020 M) (% w/w)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	
Tween 80 (% w/w)	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03	0.02	0.05	
Oil phase									
Softisan 100™ (% w/w)	1.30	1.30	1.30	1.25	1.27	1.27	1.25	1.33	
Soybean lecithin (% w/w)	0.12	0.12	0.12	0.18	0.17	0.13	0.12	0.13	
Glycerol (% w/w)	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	
External aqueous phase									
Poloxamer (Lutrol F68) (% w/w)	0.99	1.00	1.00	0.99	1.27	1.00	1.00	1.00	
Ultrapure H <sub>2</sub> O (% w/w)	82.56	80.04	80.05	82.55	82.24	82.56	82.60	82.48	
NaCl (0.010 M) (% w/w)	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
HCl (0.010 M) (% w/w)	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	



**Fig. 2.** Time evolution of hydrodynamic size of lipid nanoballoons produced with different compositions, throughout storage time, for an optimized homogenization timeframe (10 min). All determinations were carried out in triplicate ( $n=3$ ), and data points represent the average values with inserted error bars representing the standard deviation (mean  $\pm \sigma$ ); initial conditions ( $\sigma=21.658$ ); using 25% (w/w) more lecithin ( $\sigma=50.013$ ); using 25% (w/w) more lecithin and 25% (w/w) more Tween 80 ( $\sigma=50.735$ ); optimized multiple emulsion ( $\sigma=29.195$ ). For conditions, see Table 1.

its intensity being an indication of the potential stability in the colloidal system [32]. The zeta potential depends on the concentration of ions in the solvent, and thus the main reason why to measure the zeta potential lies in predicting colloidal stability, which in turn depends on the interactions between particles. Hence, zeta potential is an attempt to quantify such interactions, by predicting stability. The zeta potential is a measure of the repulsive forces between particles, and since the majority of colloidal aqueous systems is stabilized via electrostatic repulsion, the larger the repulsive forces between particles the smaller the probability for them to become closer and form aggregates, thus leading to a more stable colloidal system. The mean particle size and size distribution (polydispersity index) were measured in triplicate, in duplicate samples, via dynamic laser light scattering (suitable for particles ranging from 5 nm to ca. 3  $\mu\text{m}$ ), and the results presented as the mean values  $\pm \sigma$  (see Fig. 2). Optimum homogenization time was found to be 10 min, at 10,000 rpm, leading to production of particle sizes ranging from 85 to 200 nm (see Fig. 2). Storage of the optimized multiple emulsion (see Table 1) throughout nearly three months at room temperature led to an increase in the values of zeta potential (from  $-18$  to  $-13$  mV), presumably due to ion concentration at lipid nanoballoons interface (see Fig. 3). Control nanoparticles were also produced, without phage particles, and stored for 90 days under the same conditions; for these, a slight increase in particle size was also noticed, together with a slight increase in zeta potential values. Regarding particle size, there was a sudden increase after nearly three months, which could be attributed to particle aggregation and/or coalescence. Precirol<sup>TM</sup> and Compritol<sup>TM</sup> were also tested as lipids for the oily phase, but owing to their high(er) melting points, were discarded in order to prevent disruption of phage viability. Tween 80 (non-ionic surfactant and emulsifier) was selected as a suitable excipient, since at duplicate amounts the zeta potential values decreased to lower (negative) values at the same time that hydrodynamic size did not suffer any significant changes over time (see Figs. 2 and 3). Increasing electrolyte concentration led to an increase in the values of zeta potential toward zero, presumably due to accumulation of adsorbed ions at the particle surfaces, and thus they were discarded in the outer aqueous phase. In water-in-oil emulsions (such as our nanovesicles), there is a positive correlation between emulsion stability and fatty acid chain length and a negative correlation with the dielectric constant of the emulsifier (Tween 80). Increasing molecular

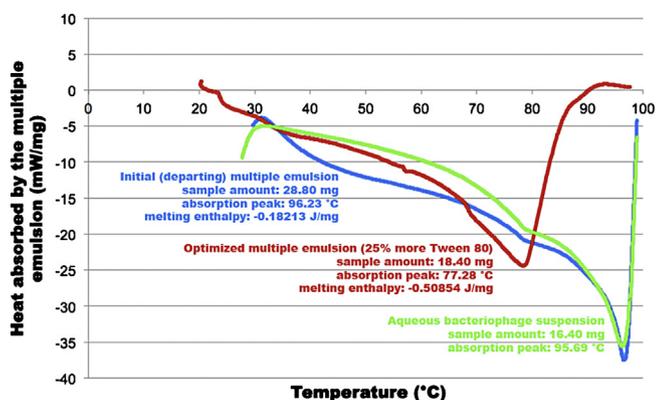


**Fig. 3.** Time evolution of zeta potential of lipid nanoballoons produced with different compositions, throughout storage time, for an optimized homogenization timeframe (10 min). All determinations were carried out in triplicate ( $n=3$ ), and data points represent the average values with inserted error bars representing the standard deviation (mean  $\pm \sigma$ ); initial conditions ( $\sigma=2.417$ ); using 25% (w/w) more lecithin ( $\sigma=2.868$ ); using 25% (w/w) more lecithin and 25% (w/w) more Tween 80 ( $\sigma=5.613$ ); optimized multiple emulsion ( $\sigma=1.965$ ). For conditions, see Table 1.

weight (such as in Softisan 100<sup>TM</sup>, with C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub> fatty acid moieties) and decreasing dielectric constant (such as in Tween 80) indicates greater hydrophobicity, leading to a greater impregnation of the interface and to a more stable multiple emulsion, which is in clear agreement with the long-term stability observed for our multiple emulsion systems. The optimized nanosystem encompassed nanovesicles with an average size of ca. 85–200 nm and an average zeta potential of ca.  $-12$  mV (see Figs. 2 and 3), which were maintained stable over a storage timeframe of nearly 3 months.

#### 3.4. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the different multiple emulsions produced, assessed *in vitro* against a microbial strain of *Salmonella enteric Enteritidis* showed different efficiency depending on the amount of phage lyophilizate offered during the encapsulation procedure. The phage lyophilizate, reconstituted in SM-buffer, demonstrated lytic activity, as was expected. However, the first multiple emulsions housing phage particles failed to exhibit antibacterial activity, probably due to one (or more) of the following factors: (i) the low pH of the internal aqueous phase could be a limiting factor for the antibacterial activity, but the phage isolate utilized only demonstrate some sensibility at pH 2.0 and the multiple emulsions produced in the research effort entertained herein presented an internal pH of 2.31 which had no detrimental impact upon phage viability; (ii) the homogenization speed utilized to produce the multiple emulsions was not also a limiting factor for said antibacterial activity, since several researchers reported that there were no loss of phage viability with homogenization speeds of 14,000 rpm [25]. In our research effort, the homogenization speed was kept at a maximum of 10,000 rpm, well below the aforementioned value; (iii) the temperature at which the phage particles were subject during preparation of the multiple emulsions was not also a limiting factor for their antibacterial activity since the maximum temperature of the procedure described herein was always below 39 °C (melting temperature of SOFTISAN 100<sup>TM</sup> is ca. 35 °C), and the phage particles utilized in the present research effort were isolated from the gastrointestinal tract of chicken, where they thrive at temperatures normally approaching ca. 41 °C; (iv) the low phage concentration utilized to produce the multiple emulsions integrating lipid nanoballoons could thus be the limiting factor and, indeed, the antibacterial activity analyses performed to the first multiple emulsions produced with only 5 mg of phage



**Fig. 4.** Differential scanning calorimetry thermograms of initial (departing conditions, blue line) and optimized (red line) multiple emulsions integrating lipid nanoballoons housing phage particles in their aqueous core, and of an aqueous (plain) suspension of phage particles (green line). (For interpretation of the references to color in this legend, the reader is referred to the web version of the article.)

lyophilizate revealed a weak antibacterial activity. But, after doubling the amount of phage lyophilizate to ca. 10 mg, in preparing the multiple emulsions integrating lipid nanoballoons, a pronounced antibacterial activity could be observed.

### 3.5. Microcalorimetric analysis

Differential scanning calorimetric analyses of the multiple emulsions provided an insight into the state and degree of crystallinity, and the melting and crystallization behavior of crystalline materials such as the lipid nanoballoons produced. The addition of Tween 80 in higher amounts (see Table 1) promoted a significant decrease in the melting temperature peak (absorption peak at 96.23 °C and heat absorbed (melting enthalpy) of 0.18213 J/mg for the initial multiple emulsion formulation, to absorption peak at ca. 77.28 °C and heat absorbed (melting enthalpy) of 0.50854 J/mg for the optimized multiple emulsion (see Fig. 4)) with 25% more Tween 80, denoting a widening of the melting temperature range in the case of the optimized multiple emulsion, with an increase in the energy absorption peak area (melting enthalpy) of 64.2%.

The amount of heat absorbed by the lipid nanoballoons was the same when comparing empty balloons and balloons incorporating phage particles, for a (optimized) homogenization timeframe of 10 min. Inclusion of phage particles in the lipid nanoballoons did not lead to significant changes in the peak of heat absorption (96.23 °C), when compared with the plain aqueous suspension of phage particles (95.69 °C). When analyzing the optimized multiple emulsion, produced with 25% more Tween 80, one obtained a melting enthalpy of 0.50854 J/mg<sub>nanoemulsion</sub>, at a temperature peak of 77.28 °C, a value clearly higher than that of the departing multiple emulsion encasing phi-2/2 phage particles after 10 min of homogenization, which probably accounts for the stabilizing effect of the nanoencapsulation procedure. Macroscopic observations of optimized nanosystems with increased amount of the semicrystalline polymer (Tween 80, i.e. poly(oxyethylene) sorbitan monooleate) showed no visible phase separation, and absence of adherence to the container walls even after a prolonged storage at room temperature. Compatibility between increased amounts of Tween 80 and other components of the internal aqueous phase can be attributed to hydrogen bonding and to the lower crystalline lattice energy of this polymer, which had a notorious impact in the melting profile of the optimized multiple emulsion (see Fig. 4).

## 4. Conclusions

In this research effort, development and optimization of lipid nanoballoons housing bacteriophage particles integrating a multiple emulsion formulation was pursued. A lipid with mild melting temperature was found most appropriate for the discontinuous oily phase. A homogenization timeframe of 10 min, the use of an electrolyte with a low ionic strength, and low bacteriophage mass concentrations were found to be critical variables for producing stable (aqueous-core) lipid nanoballoon dispersions with average diameters ranging from 85 to 200 nm and average zeta potential values of ca. -12 mV. No phase separation whatsoever could be found for the optimized multiple emulsion system, kept stable over a storage timeframe of ca. 90 days. In water-in-oil-in-water emulsions (such as the ones optimized in the research effort entertained herein), there is a positive correlation between emulsion stability and fatty acid chain length and a negative correlation with the dielectric constant of the emulsifier. Increasing molecular weight (such as in Softisan 100<sup>TM</sup>) and decreasing dielectric constant (such as in Tween 80<sup>TM</sup>) indicates greater hydrophobicity, leading to a greater impregnation of the interface and to a more stable multiple emulsion, which is in clear agreement with the long-term stability observed for our multiple emulsion systems. Additionally, imprisonment of a protein entity (such as the bacteriophage particles entertained in the present research effort) promotes a change in the thermodynamic conditions of the nanoenvironment surrounding each biomolecule due to the fact that the movements of (aqueous) solvent molecules in their microneighborhood become seriously reduced by the effect of being contained within the matrix's aqueous core, thereby leading to enhanced thermodynamic stability. The net result is an enhancement of the protein entity's rotational, translational and vibrational viscosity, promoting a more rigid three-dimensional architecture of the biomolecule with concomitant decrease of entropy and thus promoting its structural and functional stabilization [3–6]. The use of these multiple emulsion systems, provided the correct phage particles are used, e.g. in formulating solutions for aerosolization in the treatment of bacterial lung infections, would possess inherent advantages, when compared with the current chemical antimicrobial formulations, in that specific and strictly lytic bacteriophages are natural self-replicating predators of bacteria and are virtually harmless to human cells and tissues, without toxicological risks.

## Acknowledgement

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (FAPESP Ref. No. 2013/03181-6, Project PneumoPhageKill), is hereby gratefully acknowledged.

## References

- [1] E. Acosta, Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14 (2009) 3–15.
- [2] A.J. Almeida, E. Souto, Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 478–490.
- [3] V.M. Balcão, M.M.D.C. Vila, Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2014) (in press).
- [4] V.M. Balcão, A.R. Moreira, C.G. Moutinho, M.V. Chaud, M. Tubino, M.M.D.C. Vila, Structural and functional stabilization of phage particles in carbohydrate matrices for bacterial biosensing, *Enzyme Microb. Technol.* 53 (1) (2013) 55–69.
- [5] V.M. Balcão, C.I. Costa, C.M. Matos, C.G. Moutinho, M. Amorim, M.E. Pintado, A.P. Gomes, M.M. Vila, J.A. Teixeira, Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications, *Food Hydrocoll.* 32 (2) (2013) 425–431.
- [6] V.M. Balcão, S.V.P. Barreira, T.M. Nunes, M.V. Chaud, M. Tubino, M.M.D.C. Vila, Carbohydrate hydrogels with stabilized phage particles for bacterial biosensing: bacterium diffusion studies, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (3) (2014) 1194–1214.
- [7] J. Bibette, F.L. Calderon, P. Poulin, Emulsions: basic principles, *Rep. Prog. Phys.* 62 (1999) 969–1033.

- [8] S. Chakraborty, D. Shukla, B. Mishra, S. Singh, Lipid – an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 1–15.
- [9] B.K. Chan, S.T. Abedon, C. Loc-Carrillo, Phage cocktails and the future of phage therapy, *Future Microbiol.* 8 (6) (2013) 769–783.
- [10] S.S. Davis, I.M. Walker, Multiple emulsions as targetable delivery systems, *Methods Enzymol.* 149 (1987) 51–64.
- [11] D. Dupeyron, J. Rieumont, M. González, V.M. Castaño, Protein delivery by enteric copolymer nanoparticles, *J. Dispers. Sci. Technol.* 30 (2009) 1188–1194.
- [12] B.I. Erdinc, Micro/Nanoencapsulation of Proteins Within Alginate/Chitosan Matrix by Spray Drying (M.Sc. Thesis), Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, 2007, pp. 90.
- [13] M.L. Ferrer, L. Yuste, F. Rojo, F. del Monte, Biocompatible sol–gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrixes, *Chem. Mater.* 15 (2003) 3614–3618.
- [14] M.F. Ficheux, L. Bonakdar, F. Leal-Calderon, J. Bibette, Some stability criteria for double emulsions, *Langmuir* 14 (1998) 2702–2706.
- [15] M. García-Fuentes, D. Torres, M.J. Alonso, Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 27 (2002) 159–168.
- [16] J.A. Hanson, C.B. Chang, S.M. Graves, Z. Li, T.G. Mason, T.J. Deming, Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides, *Nature* 455 (2008) 85–88.
- [17] I.U. Haq, W.N. Chaudhry, M.N. Akhtar, S. Andleeb, I. Qadri, Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review, *Virolog. J.* 9 (2012) 2–8.
- [18] K.Y. Lee, S.H. Yuk, Polymeric protein delivery systems, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 669–697.
- [19] P.D. Marcato, N. Durán, New aspects of nanopharmaceutical delivery systems, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8 (2008) 1–14.
- [20] M.R. Mozafari, K. Khosravi-Darani, G.G. Borazan, J. Cui, A. Pardakhty, S. Yurdugul, Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology, *Int. J. Food Prop.* 11 (2008) 833–844.
- [21] H. Okochi, M. Nakano, Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45 (2000) 5–26.
- [22] A.G. Oliveira, M.V. Scarpa, M.A. Correa, L.F.R. Cera, T.P. Formariz, Microemulsions: structure and application as drug delivery systems, *Quim. Nova* 27 (1) (2004) 131–138.
- [23] K. Pays, J. Giermanska-Kahn, B. Pouligny, J. Bibette, F. Leal-Calderon, Double emulsions: how does release occur? *J. Control. Release* 79 (2002) 193–205.
- [24] A.R. Pianovski, A.F.G. Vilela, C.G. Lima, K.K. Silva, V.F.M. Carvalho, C.R. De Musis, S.R.P. Machado, M. Ferrari, Development and evaluation of O/W/O multiple emulsions stability containing pequi oil (*Caryocar brasiliense*), *Rev. Bras. Farm.* 89 (2) (2008) 155–159.
- [25] U. Puapermpoonsiri, J. Spencer, C.F. van der Walle, A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (1) (2009) 26–33.
- [26] V. Ragoonanan, A. Aksan, Protein stabilization, *Transfus. Med. Hemother.* 34 (2007) 246–252.
- [27] M. Rawat, D. Singh, S. Saraf, S. Saraf, Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides, *Yakugaku Zasshi (Pharm. Soc. Jpn.)* 128 (2008) 269–280.
- [28] C.P. Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2 (2006) 53–65.
- [29] C.P. Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2 (2006) 8–21.
- [30] B. Sanjula, F.M. Shah, A. Javed, A. Alka, Effect of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement, *J. Drug Target.* 17 (2009) 249–256.
- [31] T. Schmidts, D. Dobler, C. Nissing, F. Runkel, Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (1) (2009) 184–192.
- [32] N. Schultz, G. Metreveli, M. Franzreb, F.H. Frimmel, C. Syldatk, Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 66 (1) (2008) 39–44.
- [33] P.R. Srinivas, M. Philbert, T.Q. Vu, Q. Huang, J.L. Kokini, E. Saos, H. Chen, C.M. Peterson, K.E. Friedl, C. McDade-Ngutter, V. Hubbard, P. Starke-Reed, N. Miller, J.M. Betz, J. Dwyer, J. Milner, S.A. Ross, Nanotechnology research: applications in nutritional sciences, *J. Nutr.* 140 (2010) 119–124.
- [34] A. Sulakvelidze, E. Kutter, Bacteriophage therapy in humans, in: E. Kutter, A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages: Biology and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2005, pp. 381–436.
- [35] A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J.G. Morris Jr., Bacteriophage therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (3) (2001) 649–659.
- [36] Y.F. Wang, Z. Tao, H. Gang, Structural evolution of polymer-stabilized double emulsions, *Langmuir* 22 (2006) 67–73.
- [37] S. Yang, W. Yuan, T. Jin, Formulating protein therapeutics into particulate forms, *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (2009) 1123–1133.