

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROGÉRIO FREITAS DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MINIEMULSÕES COM ÁCIDO
OLEICO E LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS PARA
TRATAMENTO DE DERMATOFITOSSES**

Tese de Doutorado

Porto Alegre, outubro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROGÉRIO FREITAS DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MINIEMULSÕES COM ÁCIDO
OLEICO E LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS PARA
TRATAMENTO DE DERMATOFITOSSES**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof.^a Dr.^a. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues
Orientadora

Porto Alegre, outubro de 2023.

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Rogério Freitas dos
Desenvolvimento de miniemulsões com ácido oleico e
líquidos iônicos próticos para tratamento de
Dermatofitoses / Rogério Freitas dos Santos. -- 2023.
123 f.
Orientadora: Rodrigues, Roberta da Silva Bussamara.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Miniemulsões. 2. Ácido oleico. 3. Líquidos
Iônicos Próticos. 4. Microsporum Canis. 5.
Dermatofitoses. I. Rodrigues, Roberta da Silva
Bussamara, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto de 2017 e outubro de 2023, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Roberta da Silva Bussamara Rodrigues.

A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Kern

Prof.^a Dr.^a Virgínia Serra de Souza

Prof. Dr. Jackson Damiani Scholten

Prof.^a Dr.^a Leandra Franciscato
Campo

Prof.^a Dr.^a Roberta da Silva Bussamara
Rodrigues

Rogério Freitas dos Santos

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Marilda Fernanda Pereira Ritzel e minha mãe Inês Freitas dos Santos por serem a minha base e me tornarem a pessoa que sou hoje, pelo apoio nos momentos difíceis, pela compreensão e por todo carinho que sempre recebi.

À Prof.^a Dr.^a. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, toda a orientação e pela confiança depositada, educação, paciência e compreensão, principalmente, quanto aos meus horários de trabalho na Braskem e que tanto me causaram atrasos nos meus compromissos consigo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial, professores e funcionários do Instituto de Química pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Gostaria de agradecer amplamente aos membros do PPGQ, desde os secretários, técnicos e coordenadores pelo amplo apoio administrativo e muito boa organização do Curso de Química da Pós-Graduação.

Ao colega pesquisador Leonardo Medeiros pelo amplo suporte à preparação para a realização das análises e apoio nos caminhos necessários para acesso aos laboratórios e assuntos administrativos.

Agradeço a equipe do Laboratório de Tecnologia Mineral e Ambiental pela permissão de uso do equipamento Nanosizer®, principalmente ao Professor André Camargo de Azevedo.

Agradeço a equipe do LAMAT - CECOM pela realização das análises termo analíticas. Em especial atenção ao Técnico Júlio César.

Agradeço a Doutora Virginia Souza pelo apoio com a realização da Análise RMN, mas principalmente, pela sua educação, paciência e compreensão que sempre teve comigo desde a primeira semana do Doutorado.

Agradeço a Professora Doutora Leandra Franciscato Campo por todo o apoio com as análises de Fluorescência, e a ela e ao Técnico do CMM UFRGS Henrique pelo apoio com os ajustes para a visualização das amostras no Microscópio Confocal.

A todos que fazem parte da minha vida petroquímica e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

TRABALHOS GERADOS A PARTIR DESTE DOUTORADO

Artigo publicado

Santos, R. F.; Costa, B.; Campo, L. F.; Souza, V. S.; Pereira, S. C.; Coelho, F. L.; Fuentefria, A. M.; Rodrigues, R. S. B. Mini-emulsions based on protic ionic liquids and oleic acid for treatment of dermatophytosis caused by *Microsporum canis*. **New Journal of Chemistry**, 2023, 47, 10529–10540.

Artigo publicado

Medeiros, L.; **Santos, R. F.**; Nervis, B. R.; Jacobi, M.; Hashizume, L. N.; Gazzi, R. P.; Visioli, F.; Nunes, J. S.; Lavayen, V.; Franco, V. C.; Daitx, T. S.; Pereira, S. C.; Ferreira, G. A.; Pohlmann, A.; Guterres, S.; Frank, L. A.; Rodrigues, R. S. B. Synthesis of films based on chitosan and protic ionic liquids to be used as wound dressing on the oral mucosa. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2023, 253, 127134.

Trabalhos publicados em eventos científicos

Santos, R.F.; Rodrigues, R.S.B. **Development of vesicles with oleic acid and protic ionic liquids to be use as antifungal vehicle**. Symposium Nanomaterials in Medicine, Nanotoxicology and Nanoregulation at the XVIII SBPMat. Brazil. September, 2019, Balneário Camboriú – Brazil.

RESUMO

A diminuição da eficácia dos tratamentos atuais para dermatoses capilares causadas pela resistência aos antifúngicos afeta os pacientes, causando muitos casos de recorrência. A busca por materiais de baixo custo, com potencial efeito antifúngico de fácil preparo, hidrossolúveis e quimicamente verdes é importante. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver miniemulsões à base de líquidos iônicos próticos (LIPs) e ácido oleico que apresentassem atividade antibiofilme relacionadas à dermatofitose em pelos de animais. As miniemulsões contendo os LIPs: lactato de 2-hidróxi-dietilamônio (2-HDEALa), maleato de 2-hidróxi-dietilamônio (2-HDEAMa) e salicilato de 2-hidróxi-dietilamônio (2-HDEASa) foram avaliadas usando as técnicas de espalhamento dinâmico de luz e espalhamento eletroforético de luz. As matérias-primas e as miniemulsões também foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho, de ressonância magnética nuclear (RMN) e de fluorescência, além de microscopia óptica e confocal. Além disso, realizou-se a incorporação do antifúngico clioquinol nas miniemulsões de menores tamanhos e maiores estabilidades. E, avaliou-se o potencial das miniemulsões sintetizadas na erradicação de biofilme fúngico. Os melhores resultados referentes a estabilidade, tamanho de partículas e dispersão foram obtidos usando um método de síntese simples e de baixo custo com as concentrações das miniemulsões com 10 mM de ácido oleico e 20 mM de 2-HDEALa, 50 mM de 2-HDEAMa e 50 mM de 2-HDEASa. As microfotografias confocais demonstraram que as miniemulsões apresentam uma forma esférica e as análises de fluorescência e RMN mostraram que os LIPs 2-HDEALa e 2-HDEAMa cobriram eficientemente o ácido oleico nas miniemulsões. O antifúngico clioquinol foi eficientemente incorporado na miniemulsão. As miniemulsões somente com LIP e ácido oleico sem o clioquinol apresentaram uma erradicação de 100% do biofilme de *Microsporum canis*. Em conclusão, moléculas quimicamente verdes, como os LIPs 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa, foram capazes de formar miniemulsões com ácido oleico de forma fácil e econômica. Portanto, os resultados sugerem que essas miniemulsões podem ser usadas como loção no tratamento de dermatoses de pelos de animais.

Palavras-chave: miniemulsões, ácido oleico, Líquidos Iônicos Próticos, *Microsporum canis*, Dermatofitoses.

ABSTRACT

The decreased effectiveness of current treatments for hair dermatoses caused by resistance to antifungals affects patients, causing many cases of recurrence. The search for low-cost materials, with potential antifungal effects that are easy to prepare, water-soluble and chemically green is important. The objective of this research was to develop miniemulsions based on protic ionic liquids (PILs) and oleic acid that showed antibiofilm activity related to dermatophytosis in animal hair. The miniemulsions containing the PILs: 2-hydroxy-diethylammonium lactate (2-HDEALa), 2-hydroxy-diethylammonium maleate (2-HDEAMa) and 2-hydroxy-diethylammonium salicylate (2-HDEASa) were evaluated using the techniques of dynamic light scattering and electrophoretic light scattering. The raw materials and miniemulsions were also characterized by infrared, nuclear magnetic resonance (NMR) and fluorescence spectroscopy, in addition to optical and confocal microscopy. Furthermore, the antifungal clioquinol was incorporated into miniemulsions of smaller sizes and greater stability. And the potential of synthesized miniemulsions in eradicating fungal biofilm was evaluated. The best results regarding stability, particle size and dispersion were obtained using a simple and low-cost synthesis method with concentrations of miniemulsions with 10 mM oleic acid and 20 mM 2-HDEALa, 50 mM 2-HDEAMa and 50 mM 2-HDEASa. Confocal microphotographs demonstrated that the miniemulsions have a spherical shape and fluorescence and NMR analyzes showed that the PILs 2-HDEALa and 2-HDEAMa efficiently covered the oleic acid in the miniemulsions. The antifungal clioquinol was efficiently incorporated into the miniemulsions. Miniemulsions with only PIL and oleic acid without clioquinol showed 100% eradication of *Microsporum canis* biofilm. In conclusion, chemically green molecules, such as the PILs 2-HDEALa, 2-HDEAMa and 2-HDEASa, were able to form miniemulsions with oleic acid easily and economically. Therefore, the results suggest that these miniemulsions can be used as lotions in the treatment of animal hair dermatoses.

Keywords: mini-emulsions, oleic acid, *Microsporum canis*, Protic Ionic Liquids, Dermatophytosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da molécula do clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) 31
- Figura 2.** LIPs da esquerda para a direita: 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa.. 33
- Figura 3.** Esquema da preparação das miniemulsões com as duas fases de agitação, a diluição do clioquinol e a de formação da miniemulsão com a adição da solução de LIP. 41
- Figura 4.** Esquema das etapas do teste de ação antifúngica sobre modelo de onicomiose em cascos suínos.¹³³ 43
- Figura 5.** (A) Formação de biofilme fúngico no pelo em contato com o inóculo fúngico de MCA13 após 5 dias de infecção, (B) pelo incubado por 5 dias sem inóculo fúngico. 45
- Figura 6.** Testes de inibição e erradicação de biofilme de *microsporium canis* em pelos. 46
- Figura 7.** Distribuição de tamanho de miniemulsões com LIPs: a) 2-HDEALa, b) 2-HDEAMa e c) 2-HDEASa..... 53
- Figura 8.** Resultados RMN de ¹H, ¹³C, COSY e HSQC para a miniemulsão com o LIP 2-HDEASa. 58
- Figura 9.** Estrutura química do corante HBO e do cátion [2-HDEA]⁺ e dos ânions [La]⁻, [Ma]⁻ e [Sa]⁻ dos LIPs utilizados no presente estudo..... 59
- Figura 10.** Espectros de emissão de fluorescência do corante HBO na presença dos LIPs puros 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa em etanol (10⁻⁴ M) e miniemulsões com os LIPs 2-HDEALa 20 mM e 10 mM de ácido oleico (ME20La10OA), 2-HDEAMa (ME50Ma10OA), 2-HDEASa (ME50Sa10OA). Os espectros de emissão de fluorescência do corante HBO em clorofórmio, etanol e miniemulsão apenas com água e ácido oleico (NE10OA) foram feitos para comparação. 61
- Figura 11.** Representação esquemática demonstrando a formação de miniemulsões fluorescentes utilizando corante HBO. 62
- Figura 12.** Fotografias de microscopia óptica das miniemulsões com ácido oleico e: (a) 2-HDEALa; (b) 2-HDEAMa; (c) 2-HDEASa; (d) sem LIP..... 63
- Figura 13.** Microfotografias Confocal de amostras de miniemulsões: (a) 2-HDEALa, (b) 2-HDEAMa, (c) 2-HDEASa. 64

Figura 14. Comparação dos espectros do FTIR de (a) substâncias controle; misturas com os LIPs: (b) 2-HDEALa; (c) 2-HDEAMa; (d) 2-HDEASa.	65
Figura 15. Comparação dos espectros do FTIR do ácido oleico utilizado neste trabalho com o apresentado na biblioteca Wiley.....	66
Figura 16. Comparação dos espectros do FTIR do clioquinol utilizado neste trabalho com o apresentado na biblioteca Wiley.....	66
Figura 17. Comparação dos espectros do FTIR do LIP 2-HDEALa em solução aquosa 20 mM com amostra de água pura da biblioteca Wiley.....	67
Figura 18. Comparação dos espectros do FTIR do LIP 2-HDEAMa em solução aquosa 50 mM com amostra de água pura da biblioteca Wiley.....	67
Figura 19. Comparação dos espectros do FTIR do LIP 2-HDEASa em solução aquosa 50 mM com amostra de água pura da biblioteca Wiley.....	68
Figura 20. Comparação dos espectros do FTIR dos 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa em solução aquosa comparados com o espectro IR-ATR da água pura da biblioteca Wiley.....	68
Figura 21. Comparação dos espectros do FTIR do 2-HDEALa em solução aquosa comparados com os espectros do clioquinol e do ácido oleico. Linha azul: (La + ác. ole. + clioq.) miniemulsão do LIP 2-HDEALa 20 mM contendo clioquinol. Linha marrom: (La 20 mM + ác. ole.) miniemulsão do LIP 2-HDEALa.....	69
Figura 22. Termograma DSC de fusão da amostra do LIP 2-HDEALa puro.	70
Figura 23. Termograma DSC de fusão da amostra do LIP 2-HDEAMa puro.....	71
Figura 24. Termograma DSC de fusão da amostra do LIP 2-HDEASa puro.	71
Figura 25. Comparação dos Termogramas DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEALa (em solução de 20 mM, em mistura da solução com o ácido oleico, com a adição do clioquinol a mistura anterior, e uma amostra do ácido oleico puro).....	72
Figura 26. Comparação dos Termogramas DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEAMa (em solução de 50 mM, em mistura da solução com o ácido oleico, com a adição do clioquinol a mistura anterior, e uma amostra do ácido oleico puro).....	73
Figura 27. Comparação dos Termogramas DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEASa (em solução de 50 mM, em mistura da solução com o ácido oleico, com a adição do clioquinol a mistura anterior, e uma amostra do ácido oleico puro).....	73

Figura 28. Comparação dos Termogramas DSC de cristalização do grupo de amostras do LIP 2-HDEALa 20 mM.	74
Figura 29. Comparação dos Termogramas DSC de cristalização do grupo de amostras do LIP 2-HDEAMa 50 mM.	75
Figura 30. Comparação dos Termogramas DSC de cristalização do grupo de amostras do LIP 2-HDEASa 50 mM.	76
Figura 31. Termograma TGA-DTG do LIP 2-HDEALa (puro).	78
Figura 32. Termograma TGA-DTG do LIP 2-HDEAMa (puro).	79
Figura 33. Termograma TGA-DTG do LIP 2-HDEASa (puro).	79
Figura 34. Termograma TGA-DTG do ácido oleico (puro).	80
Figura 35. Termograma TGA-DTG do clioquinol (puro).	80
Figura 36. Termograma TGA-DTG: miniemulsão contendo ácido oleico, clioquinol e LIP 2-HDEALa 20 mM.	81
Figura 37. TGA-DTG: miniemulsão ácido oleico, clioquinol e LIP 2-HDEAMa 50 mM.	81
Figura 38. Termograma TGA-DTG: miniemulsão contendo ácido oleico, clioquinol e LIP 2-HDEASa 50 mM.	82
Figura 39. Placas contendo o meio BDA com o fungo <i>Trichophyton rubrum</i> e os discos de cascos suínos. Tratamento da unha, após 3 dias, com as miniemulsões sintetizadas com 50 mM de 2-HDEAMa, 10 mM de ácido oleico e 750 µg/mL de clioquinol (A), com 50 mM de 2-HDEASa, 10 mM de ácido oleico e 750 µg/mL de clioquinol (B), controle positivo (c) controle negativo (d).	84
Figura 40. Observações visuais para o resultado da síntese de emulsão com os LIPs (2-HDEALa: (La); 2-HDEAMa: (Ma); 2-HDEASa: (Sa) - (24 horas após o final da síntese e o término da adição de todos os agentes).	87
Figura 41. Síntese verde de miniemulsão desenvolvida com solução aquosa de LIP e ácido oleico em uma etapa e reduzido custo com atividade de 100 % na remoção de biofilme <i>Microsporum canis</i>	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas dos cátions e ânions de líquidos iônicos próticos. ¹⁰¹	34
Tabela 2. Amostras para os Ensaio de Remoção e Inibição do biofilme fúngico em pelos.....	47
Tabela 3. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta de miniemulsões preparadas com 20 mM de LIPs e diferentes concentrações de ácido oleico.	49
Tabela 4. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta de miniemulsões preparadas com 10 mM de ácido oleico e diferentes concentrações de 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa.	51
Tabela 5. pH, diâmetro médio z (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das miniemulsões e um controle apenas com ácido oleico em água (ME10AO).....	54
Tabela 6. Diâmetro médio z, PDI e potencial zeta (PZ) das miniemulsões e de amostras controle antes e após a incorporação do antifúngico clioquinol.....	55
Tabela 7. Calores de Fusão das amostras de 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa com suas soluções aquosas, miniemulsões sem e com clioquinol.....	77
Tabela 8. Calor de Cristalização das amostras de 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa com suas soluções aquosas, miniemulsões sem e com clioquinol.	77
Tabela 9. TGA – DTGs: Termogravimetria Derivada (%/°C) dos LIPs e suas miniemulsões	82
Tabela 10. pH, diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das miniemulsões na antes e após adição dos denominados agentes de desestabilização.	86
Tabela 11. Inibição da Formação do biofilme (pelos pré-tratados com as formulações).	90
Tabela 12. Remoção do biofilme formado (pelos tratados após a formação do biofilme).	90
Tabela 13. Erradicação do biofilme de <i>Microsporium canis</i> em fios de pelos de animais. Os pelos foram lavados com água e tratados com as formulações por 15 min. .	91
Tabela 14. Atividade antibiofilme de nanoemulsões comparadas as miniemulsões produzidas neste trabalho.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- [DMBA][HSO₄]: hidrogenossulfato de dimetilbutilamônio
- [Hmim]Cl: cloreto de metilimidazólio
- [TEA][HSO₄]: hidrogenossulfato de trietilamônio
- 2-HDEALa: lactato de 2-hidroxi dietilamônio
- 2-HDEAMa: maleato de 2-hidroxi dietilamônio
- 2-HDEASa: salicilato de 2-hidroxi dietilamônio
- AS: ácido salicílico
- ATP: trifosfato de adenosina
- ATR: reflexão total atenuada
- BDA: ágar de dextrose de batata
- CDCl₃: clorofórmio deuterado
- CIM: concentração inibitória mínima
- CLSM: microscopia confocal de varredura a laser
- CVD: deposição química de vapor
- D₂O: água deuterada
- DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz
- DMSO-d: dimetil sulfóxido deuterado
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DPN: litografia de caneta profunda
- DSC: calorimetria de varredura diferencial
- ESIPT: transferência intramolecular de prótons no estado excitado
- FTIR: infravermelho por transformada de Fourier
- HBO: 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol
- HDMAEMA: monômero de homopolimerização metacrilato de dimetilaminoetila
- LIP: líquido iônico prótico
- MCA: *microsporum canis*
- PBS: solução salina tamponada de fosfato
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- PDI: índice de polidispersão
- RMN: Ressonância Magnética Nuclear
- SDA: ágar sabouraud de dextrose

TGA: análise termogravimétrica

TRU: *trichophyton rubrum*

UFC: unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. Biofilmes fúngicos	18
3.1.1 <i>Dermatofitoses</i>	19
3.1.1.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	20
3.1.1.2 <i>Microsporum canis</i>	20
3.2. Nanotecnologia e nanomateriais	21
3.2.1. <i>Miniemulsões</i>	24
3.2.2 <i>Aplicação de mini e nanoemulsões em doenças de pele</i>	25
3.2.3. <i>Emprego do ácido oleico na síntese de mini e nanoemulsões</i>	26
3.2.4. <i>Emulsificantes</i>	26
3.2.5. <i>Líquidos iônicos próticos</i>	27
3.2.5.1. Líquidos iônicos próticos contendo o cátion 2-hidroxiethylamônio e os ânions lactato, salicilato e maleato.....	28
3.2.5.2 Características que tornam os ânions lactato interessantes ao uso como emulsificante antifúngico.....	29
3.2.5.3 Características que tornam os ânions maleato interessantes ao uso como emulsificante antifúngico.....	29
3.2.5.4. Características que tornam os ânions salicilato interessantes ao uso como emulsificante antifúngico.....	30
3.2.5.5. Clioquinol como antifúngico incorporado.....	30
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.1. Materiais e métodos.....	33
4.2. Síntese das Miniemulsões.....	34
4.2.1. <i>Análise do efeito da concentração de ácido oleico na formação, tamanho e estabilidade da emulsão.</i>	35
4.2.2. <i>Análise do efeito da concentração de líquidos iônicos próticos na formação, tamanho e estabilidade da emulsão.</i>	35

4.3. Caracterização das miniemulsões	36
<i>4.3.1. Avaliação do diâmetro hidrodinâmico e estabilidade das miniemulsões</i>	<i>36</i>
4.3.1.1. Análise do diâmetro de partícula	36
4.3.1.2. Potencial Zeta	37
<i>4.3.2. Caracterizações adicionais das miniemulsões</i>	<i>37</i>
4.3.2.1. Determinação do pH das miniemulsões	38
4.3.2.2. Espectroscopia de Fluorescência	38
4.3.2.3. Microscopia Óptica e Confocal	38
4.3.2.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR.....	39
4.3.2.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN.....	39
4.3.2.6. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	40
4.3.2.7. Análise Termogravimétrica – TGA	40
4.4. Incorporação do clioquinol nas miniemulsões mais promissoras como veículo para fármaco.	40
4.5. Análise da ação antifúngica das miniemulsões sintetizadas contendo o clioquinol.	42
4.6. Efeito de formulações com diferentes pH na liberação do fármaco do interior das miniemulsões	44
4.7. Análise da ação antifúngica das miniemulsões na erradicação do biofilme <i>microsporum canis</i> em pelo de animal.....	44
<i>4.7.1. Erradicação do biofilme <i>Microsporum canis</i> de amostras de pelo de animal.....</i>	<i>44</i>
4.7.1.1. Isolado fúngico.	45
4.7.1.2. Infecção <i>ex vivo</i> da haste capilar.....	45
4.7.1.3. Uso do Fosfato Monossódico aplicado em conjunto com as miniemulsões	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Síntese das miniemulsões	48
<i>5.1.1. Análise do efeito da concentração de ácido oleico no tamanho e estabilidade da miniemulsão.....</i>	<i>48</i>
<i>5.1.2. Análise do efeito da concentração dos líquidos iônicos próticos no tamanho e estabilidade da emulsão</i>	<i>50</i>
5.2. Incorporação do antifúngico nas miniemulsões mais promissoras como veículo para fármaco.	54
5.3. Caracterização das miniemulsões	56

5.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN	56
5.3.2. Espectroscopia de Fluorescência	59
5.3.3. Microscopia Óptica e Confocal.....	62
5.3.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR.....	64
5.3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC.....	69
5.3.6. Análise Termogravimétrica – TGA	78
5.4. Análise da ação antifúngica das miniemulsões sintetizadas contendo o clioquinol	83
5.5 Efeito de formulações com diferentes pH na liberação do fármaco do interior das miniemulsões	85
5.6. Análise da ação antifúngica das miniemulsões na erradicação do biofilme <i>microsporum canis</i> em pelos de animal	89
6. CONCLUSÕES	96
7. PERSPECTIVAS DE TRABALHO	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	110

1.INTRODUÇÃO

Nanopartículas, especialmente nano e miniemulsões, têm sido amplamente estudadas como sistemas promissores para aplicações médicas no tratamento de doenças fúngicas. Estas miniemulsões consistem em estruturas anfífilas com um núcleo oleoso, permitindo a entrega eficiente de medicamentos aos tecidos afetados. O uso tópico de nano e miniemulsões com composição estritamente orgânica tem potencial para melhorar a eficácia terapêutica dos medicamentos e reduzir os efeitos colaterais.

As infecções fúngicas representam um desafio no campo médico, demandando o desenvolvimento contínuo de novos antifúngicos. Nesse contexto, este estudo foca na utilização de líquidos iônicos próticos (LIPs) como emulsificantes para síntese de miniemulsões utilizando ácido oleico. Os LIPs são sais orgânicos líquidos à temperatura ambiente, possuindo diversas vantagens, como baixa pressão de vapor, ajuste de acidez e capacidade de dissolver diversas substâncias. Especificamente, este trabalho investiga o uso dos LIPs lactato de 2-hidróxi-dietanolamina (2-HDEALa), maleato de 2-hidróxi-dietanolamina (2-HDEAMa) e salicilato de 2-hidróxi-dietanolamina (2-HDEASa) como emulsificantes para síntese de miniemulsões utilizando ácido oleico, com o objetivo de avaliar o potencial desse sistema emulsionado (óleo-LIP-água) na erradicação de biofilmes fúngicos específicos.

Para tal, foram analisadas diversas propriedades químicas dessas miniemulsões, incluindo o diâmetro das partículas, estabilidade do estado emulsionado e interações intermoleculares. Além disso, realizou-se a incorporação do antifúngico clioquinol nas miniemulsões de menores tamanhos e maiores estabilidades. E, por fim, avaliou-se a adequação dessas miniemulsões para possíveis aplicações farmacológicas por meio do ensaio de atividade antifúngica.

O presente trabalho se baseia em uma revisão bibliográfica abrangente sobre o tema das miniemulsões e suas aplicações na área médica. A revisão evidencia que mini e nanoemulsões têm ganhado destaque devido à sua simplicidade e eficácia, sendo utilizadas em diversas aplicações biológicas e na área da saúde, incluindo como carregadores de substâncias bioativas e produtos farmacêuticos. Além disso, a pele tem se mostrado uma via de administração atrativa para fármacos e cosméticos, permitindo o tratamento direto de doenças cutâneas no local afetado, sem riscos significativos de absorção sistêmica e efeitos colaterais. Nesse contexto, miniemulsões têm se mostrado

promissoras para a administração tópica de diversas substâncias, anestésicos locais e medicamentos para o tratamento de doenças de pele como psoríase e alopecia.

Em relação ao uso do ácido oleico na síntese de miniemulsões, destaca-se sua relevância como triglicerídeo monoinsaturado de cadeia longa, proveniente de fontes naturais e aprovado pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América como intensificador de penetração. Entretanto, miniemulsões contendo apenas ácido oleico e água apresentam instabilidade a variações de pH, força iônica e temperatura, podendo resultar em baixa uniformidade e estabilidade. Portanto, a adição de emulsificantes e estabilizantes se faz necessária para contornar essas desvantagens.

Os emulsificantes são substâncias que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, formando um filme flexível que impede a coalescência das gotículas da emulsão. Nesse sentido, os LIPs surgem como alternativas promissoras, com suas características únicas, como baixa pressão de vapor, controle de acidez e solubilização de diversas substâncias. Eles têm se mostrado vantajosos na produção de miniemulsões, bem como em aplicações nas áreas de medicina, tratamento biológico, captura de CO₂ e produção de energia, entre outras.

Em particular, os LIPs contendo o cátion 2-hidróxi-dietanolamina e os ânions lactato, salicilato e maleato têm sido objeto de estudo devido às suas propriedades antimicrobianas. A ação tensoativa destes é atribuída às suas porções polares que interagem com as moléculas de água, reduzindo a tensão superficial entre óleo e água e atuando como um surfactante ou emulsificante.

Dessa forma, a presente tese busca aprofundar o conhecimento sobre o desenvolvimento de miniemulsões utilizando ácido oleico e LIPs como emulsificantes, visando a erradicação eficiente de biofilmes fúngicos e, conseqüentemente, contribuir para o avanço no tratamento de doenças fúngicas na área médica. Com as propriedades químicas dessas miniemulsões bem caracterizadas, incluindo sua estabilidade e atividade antifúngica, espera-se ampliar as possibilidades de aplicação farmacológica e melhorar a eficácia terapêutica com redução dos efeitos colaterais indesejáveis.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo investigar a síntese de miniemulsões usando ácido oleico em meio aquoso contendo os líquidos iônicos próticos (LIPs): lactato de 2-hidróxi-dietanolamina (2-HDEALa), maleato de 2-hidróxi-dietanolamina (2-HDEAMa) e salicilato de 2-hidróxi-dietanolamina (2-HDEASa) para tratamento de dermatofitoses em unha e pelo de animal. Este objetivo maior está vinculado aos objetivos específicos citados a seguir.

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar o processo de síntese das miniemulsões através da variação da concentração de ácido oleico e de diferentes tipos de líquidos iônicos próticos;
- Caracterizar as miniemulsões formadas;
- Incorporar o antifúngico clioquinol nas miniemulsões que se mostraram mais promissoras como veículo para fármaco;
- Avaliar a liberação do fármaco a partir de formulações com diferentes pHs, visando o tratamento de micose de unha e pelo;
- Analisar a ação antifúngica das miniemulsões sintetizadas contendo o clioquinol em unha e pelo de animal.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biofilmes fúngicos

Fungos filamentosos são adaptados para crescer em superfícies e podem formar biofilmes. Biofilmes fúngicos são comunidades de células microbianas envoltas em uma matriz polimérica automontada. Eles colonizam superfícies abióticas e causam infecções relacionadas a dispositivos médicos.¹

Os biofilmes podem ser resistentes a fármacos antifúngicos convencionais, contribuindo para altas taxas de morbidade e mortalidade.²

Estudos propõem um modelo de seis estágios para a formação de biofilme por fungos filamentosos:³

- 1) adsorção/adesão de esporos ou de fragmentos de hifas;
- 2) adesão ativa à superfície, ocorrendo a secreção de substâncias pelos esporos germinados e hifas;
- 3) produção de matriz polimérica extracelular e formação da micro colônia a partir da multiplicação ramificada das hifas. As hifas se espalham pelo substrato formando uma camada única (biofilmes bacterianos formam várias camadas), podendo invadir o substrato;
- 4) maturação inicial do biofilme. Envolve a formação de uma rede mais compacta de hifas ou micélios e adesão entre hifas. Ocorre também a formação de feixes de hifas grudados uns aos outros pela matriz polimérica extracelular e a formação de canais de água através da repulsão hidrofóbica entre as hifas;
- 5) maturação ou desenvolvimento reprodutivo. Ocorre a formação de corpos de frutificação, células esporogênicas, escleródios e outras estruturas de sobrevivência. Intensifica-se o crescimento aéreo da colônia, fundamental para a frutificação e dispersão do fungo;
- 6) dispersão. São liberados esporos ou fragmentos do biofilme, atuando como novos propágulos e fecha-se o ciclo.³

O desenvolvimento de biofilmes por fungos clinicamente relevantes, como *Candida* spp., está associado a infecções resistentes.² Essas infecções são difíceis de tratar devido à resistência aos medicamentos antifúngicos, ao diagnóstico desafiador e ao tratamento inadequado (uso inadequado ou regime de dosagem).^{2,4}

Estima-se que as doenças fúngicas afetam aproximadamente 1 à 2 bilhões de indivíduos em todo o mundo com pelo menos 1 à 5 milhões de mortes a cada ano.²

Um exemplo de doenças causadas por fungos são as dermatofitoses.

3.1.1 Dermatofitoses

Fungos dermatófitos são patógenos primários,⁴ filamentosos, hialinos e septados com capacidade de invasão das camadas externas da pele.⁵ A umidade da pele proporciona um ambiente propício para o crescimento desses fungos, e cerca de 20% da população mundial está em risco de desenvolver infecções fúngicas superficiais.⁶

O alvo dos dermatófitos para infecção e proliferação no estrato córneo da epiderme são os tecidos queratinizados⁵ como pele, cabelos, pelos e unhas, em humanos e animais. Estes tecidos contêm uma proteína chamada citoqueratina na qual os dermatófitos se alimentam para sobreviver.⁷ Essas infecções fúngicas superficiais são mais comuns em climas tropicais e temperados, especialmente em áreas quentes e úmidas.⁵

Em animais, as dermatofitoses podem ocorrer em cães jovens que vivem em grupos ou em cães idosos com imunodepressão. Os pelos passam por um processo de queda (alopecia) e os remanescentes ficam curtos e quebradiços, seguido com descamação e pruridos, entre outros acometimentos.⁵

Para o diagnóstico definitivo desta doença, são realizados exames físicos, testes com lâmpada de Wood, microscopia direta e cultura fúngica.⁵ Os métodos convencionais de identificação dos dermatófitos são trabalhosos e demorados,⁸ mas técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo estudadas para uma identificação mais precisa dos agentes patógenos causadores das dermatofitoses.⁵

O tratamento das dermatofitoses geralmente envolve o uso de antifúngicos, mas algumas infecções estão se tornando mais resistentes aos medicamentos convencionais.⁹ As infecções fúngicas da pele são uma causa comum de visitas dermatológicas. O tratamento das infecções fúngicas superficiais em pacientes imunocomprometidos pode ser desafiador, e muitas vezes são necessários medicamentos antifúngicos tópicos para melhorar a absorção pelo organismo.⁶

Alguns exemplos de dermatófitos são o *Microsporum canis*, que causa infecções no couro cabeludo e no corpo, e o *Trichophyton mentagrophytes*,⁵ que pode infectar as unhas. Essas infecções fúngicas são contagiosas e podem afetar tanto humanos quanto animais.⁹

3.1.1.1 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum é o dermatófito mais prevalente em todo o mundo, sendo responsável por 70% das dermatofitoses. É um fungo antropofílico, ou seja, a transmissão é de humano para humano e é considerado o agente mais isolado em onicomicoses.¹⁰

Estudos recentes indicam o uso do fármaco clioquinol combinado com outros como ciclopirox e terbinafina no combate ao *Trichophyton rubrum*.⁹

Microemulsões têm sido desenvolvidas como veículo para administração de fármacos antifúngicos contra *Trichophyton rubrum* e tem demonstrado maior eficiência quando comparado ao creme convencional para o tratamento da onicomicose, nome dado a micose das unhas.¹¹

3.1.1.2 *Microsporum canis*

O *Microsporum canis* é um tipo de fungo que causa infecções fúngicas na pele, conhecidas como *tinea corporis* e *tinea capitis*.¹² *M. canis* é classificado em 20 genótipos por uma combinação de marcadores microssatélites.¹³ Ele é considerado o principal agente causador dessas infecções em humanos e é comum em cães e gatos. As modificações cutâneas nas dermatofitoses de origem animal em humanos são variáveis e a maioria ocorre em áreas do corpo que entram diretamente em contato com o animal, como braços, couro cabeludo e tronco, ou com objetos contaminados pelo fungo.^{5,14}

O *M. canis* pode ocorrer em cães jovens que vivem em coletividade ou em cães com idade avançada que apresentam imunossupressão, os quais podem apresentar alopecia progressiva, localizada ou generalizada. Podem aparecer em qualquer parte do corpo, principalmente na cabeça e patas.⁵

A infecção por *M. canis* em humanos pode ocorrer pelo contato direto com animais infectados ou pelo contato com poeira, escovas ou roupas contaminadas.⁷ Os sintomas nas pessoas incluem alopecia (queda de cabelo) com vermelhidão e descamação na pele.¹⁵ No entanto, a doença pode ser facilmente confundida com outras condições dermatológicas, dificultando o diagnóstico preciso.¹⁵

Este fungo é preocupante por ser capaz de invadir tecidos queratinizados como pele, unhas e pelos em animais mamíferos, inclusive humanos.¹⁶ Embora essas dermatoses não sejam graves em termos de mortalidade e morbidade, a infecção superficial causa grande desconforto aos pacientes.^{17,18} Um aumento significativo na proliferação desses fungos leva ao aparecimento de infecções, muitas vezes com lesões

que incluem combinações de alopecia com graus variados de descamação, eritema e pápulas.¹⁹

Um dos diagnósticos desta doença é baseado em cultura fúngica. O tratamento e o controle são particularmente importantes e podem ser tanto tópicos quanto sistêmicos.^{8,20}

O tratamento convencional com antifúngicos tem mostrado resultados limitados contra o *M. canis*. Estudos têm demonstrado baixa suscetibilidade do fungo a diversos medicamentos antifúngicos, incluindo fluconazol, itraconazol, cetoconazol, terbinafina, griseofulvina e ciclopirox.^{12,21,22} Os fatores que atenuam a resistência aos medicamentos incluem a falta de adesão do paciente, penetração tecidual deficiente e biodisponibilidade variável do medicamento.²² As limitadas opções terapêuticas disponíveis no mercado encontram um problema fundamental, que é a resistência aos antifúngicos. As falhas terapêuticas afetam os pacientes, causando muitos casos de recorrência.^{2,23,24}

Assim, a necessidade de buscar novas alternativas de tratamento para combater as infecções fúngicas é essencial, e a pesquisa de moléculas de baixo custo com potencial efeito antifúngico, fáceis de preparar, solúveis em água, polidisperso e quimicamente verde é importante.²⁵

Nesse contexto, a nanotecnologia surge como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades antibiofilme e baixa toxicidade que permita maior biodisponibilidade, maior permeação cutânea, redução de efeitos colaterais, redução da frequência de dosagem e liberação sustentada do medicamento.^{26,27}

A nanotecnologia oferece perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes. No entanto, são necessários mais estudos sobre novos materiais para utilização em produtos cosméticos e terapêuticos.

3.2. Nanotecnologia e nanomateriais

O termo "nano" é explicado como um fator de um bilionésimo no sistema métrico, referindo-se a um comprimento do nível atômico de cerca de 0,1 nm até 100 nm.^{28,29}

A nanotecnologia envolve a manipulação de átomos, moléculas ou compostos individuais para produzir materiais e dispositivos com propriedades especiais.³⁰

Na história, tem-se o ano de 1958 como aquele em que o físico Richard Feynman já discutia o assunto nanotecnologia, mencionado a manipulação e controle de coisas em pequena escala. A denominação nanotecnologia viria anos depois.

Em 1974, Norio Taniguchi, usou o termo nanotecnologia para descrever processos utilizando semicondutores, como deposição de filmes finos e fresagem por feixe de íons, exibindo controle característico da ordem de um nanômetro.^{29,31-33}

A fabricação em nanoescala já está na sua quarta geração. A primeira contava com blocos de construção em nanoescala e a quarta já evoluiu para sistemas heterogêneos complexos, onde cada molécula no nano sistema tem uma estrutura específica e desempenha um papel diferente. As moléculas são usadas como dispositivos, e de suas estruturas e arquiteturas projetadas surgem funções fundamentalmente novas.²⁹

Mundialmente, governos estão investindo significativamente em pesquisa e desenvolvimento de nanotecnologia. Estima-se que o investimento público global em projetos de nanotecnologia tenha ultrapassado US\$ 6 bilhões em 2008. Em 2021, foram registradas mais de 23.750 patentes na área de nanotecnologia nos Estados Unidos, representando um crescimento de aproximadamente 6% em relação ao ano anterior.³⁴

Quanto às publicações científicas, a quantidade de artigos científicos sobre nanociência e nanotecnologia continua crescendo rapidamente. A China é o país que apresenta o crescimento mais rápido e também produz o maior número de publicações nesses campos³⁵. Em 2022, o número de artigos relacionados à nanotecnologia indexados na WoS pela China foi igual à soma das publicações dos nove países seguintes. A Índia ocupa o segundo lugar nesse ranking, seguida pelos Estados Unidos, Irã e Coreia do Sul.³⁵

Produtos com apelo nano vêm atraindo o mercado consumidor global. O valor final da venda de um produto com nanotecnologia é muito inflado. Ele é a soma de um real custo de fabricação, somado por valores definidos por questões mais especulativas, como pelo tempo de dedicação da equipe de pesquisa científica no desenvolvimento do produto e acrescentado de muito valor de publicidade, principalmente quando o produto ainda não tem concorrente no mercado.

De acordo com o relatório de abril de 2022 sobre o Mercado da Nanotecnologia da Precedence Research, uma das principais fornecedoras de informações estratégicas de mercado, o tamanho do mercado global de nanotecnologia foi alcançado em US\$ 85 bilhões em 2021 e deve arrecadar US\$ 289 bilhões até 2030.³⁶

A nanociência é descrita como o estudo de fenômenos e manipulação de materiais na nanoescala, enquanto a nanotecnologia envolve o projeto, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas controlados na nanoescala.

Conforme as pesquisas e a tecnologia foram progredindo, tornou-se capaz de se mensurar as forças que atuam entre as moléculas. Comparando com os macros materiais,

as propriedades volumosas desaparecem quando algo passa a estar como um nanomaterial, a quantificação de energia para os elétrons em sólidos, especialmente abaixo de 100 nanômetros, é mudada drasticamente afetando o comportamento óptico, elétrico e magnético. Por exemplo, substâncias opacas tornam-se transparentes (cobre)³⁷; materiais inertes tornam-se catalisadores (platina)³⁸; sólidos transformam-se em líquidos à temperatura ambiente (ouro)³⁹; isoladores tornam-se condutores (silício).⁴⁰

Como exemplo de aplicações para a nanotecnologia são mencionados campos amplos como biologia, física, química, entre outros. A indústria eletrônica investe muito na fabricação controlada de nanoestruturas, como na produção de hardwares.⁴¹ E, a indústria farmacêutica é uma das que tem trabalhos mais abrangentes, como na associação de processos físicos, químicos e biológicos para a fabricação de fármacos.^{42,43}

Na manipulação e fabricação de nanoestruturas (nanopartículas (NPs), nanotubos, fullerenos, materiais nanoestruturados, nanocompósitos etc.)²⁹ muitas vezes são necessárias ferramentas específicas para nanomanufatura (nano sínteses, nano misturas, nano deposições, nanolitografias, etc.).⁴⁴

A síntese de nanomateriais passa principalmente por duas diferentes estratégias: a síntese top-down,²⁹ onde o material é removido até obter a forma desejada, como, por exemplo, a nano litografia de caneta profunda (DPN).⁴⁵

Já a síntese bottom-up, envolve a automontagem de átomos e moléculas para construir estruturas. Como exemplo, a deposição química de vapor (CVD).²⁷

A nanotecnologia na área de pesquisas na área da saúde, vem sendo bastante aplicada no desenvolvimento de materiais para mapeamento do corpo, implantes médicos, anticorpos, teragnósticos direcionados e avanços farmacêuticos.^{46,47}

A nanobiotecnologia é um campo que aplica princípios e técnicas em nanoescala ao entendimento e transformação de biosistemas (vivos ou não vivos) e que utiliza princípios e materiais biológicos para criar dispositivos e sistemas integrados a partir da nanoescala. Espera-se que a integração da nanotecnologia com a biotecnologia, bem como com a tecnologia da informação e a ciência cognitiva, ganhe aceleração na próxima década.

As nanopartículas de sílica, por exemplo, têm sido estudadas como possíveis ingredientes em cosméticos e no tratamento de doenças de pele, incluindo infecções fúngicas. Elas podem atuar como transportadores de fármacos, melhorando a eficácia e segurança do tratamento, regulando a liberação sustentada de ingredientes cosméticos na pele, bem como aumentando a penetração cutânea de ingredientes encapsulados. Além

disso, eles atuam como transportadores de fármacos com menor solubilidade em água para melhorar a segurança, estabilidade e desempenho do medicamento.²⁶

A nanomedicina e seus nanofármacos tem o potencial de contribuir significativamente para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de doenças complexas, por meio da detecção precoce, prevenção e desenvolvimento de terapias mais eficazes.³⁰

Nanomateriais encontram aplicações em uma variedade de produtos cosméticos, como exemplos: cremes⁴⁸, loções⁴⁸, batons⁴⁹, esmaltes⁴⁹, cremes antienvelhecimento³¹, sabonetes⁵⁰, pasta de dente⁵¹, xampu³¹, condicionador de cabelo³¹, desodorante,^{48,52} perfume⁵², loção hidratante para o corpo⁵³, protetor solar.^{26,49}

3.2.1. *Miniemulsões*

Miniemulsões são sistemas dispersos de duas fases líquidas, fase dispersa e fase dispersante ligadas por um surfactante.

Neste sistema, formam-se emulsões que podem ser de óleo em água, ou água em óleo com um tamanho de 50 nm a 1 µm de diâmetro estabilizada por um surfactante ou outro reagente estabilizador.⁵⁴

Podem ser transparentes, translúcidas ou leitosas dependendo do tamanho da gotícula,^{55,56} da natureza da fase dispersa e possuem maior estabilidade em relação às emulsões em termos de agregação e floculação.^{57,58}

Esses sistemas são caracterizados por sua estabilidade cinética, que é proporcionada pela presença de agentes tensoativos na interface óleo-água.⁵⁹

Mini e nanoemulsões têm ganhado destaque por sua simplicidade e eficácia e têm sido utilizadas em aplicações biológicas e na área da saúde como carregadores de substâncias bioativas, compostos lipofílicos e produtos farmacêuticos, entre outros.⁶⁰⁻⁶⁴

Várias formulações como vesículas,^{27,65} lipossomas,⁶⁶ nanopartículas,⁶⁷ micelas⁶ e emulsões²⁵ têm sido exploradas, por exemplo, para o tratamento de micoses de pele.²⁴ Em especial, as mini e nanoemulsões oferecem vantagens na liberação de fármacos tópicos devido à capacidade de penetrar nas camadas mais profundas da pele.

Quando utilizadas para formulações de cosméticos, as nanoemulsões são utilizadas em produtos da manutenção da beleza e no uso de higiene pessoal por proporcionar maior estabilidade aos coloides e uma melhor experiência de uso para os consumidores.⁶⁸

3.2.2 Aplicação de mini e nanoemulsões em doenças de pele

A pele desempenha um papel crucial na proteção do corpo humano, agindo como uma barreira eficiente contra substâncias externas e perigos ambientais, além de manter a hidratação e regular a temperatura.⁶⁹ Essa função de barreira é atribuída principalmente ao estrato córneo, a camada mais externa da epiderme, que consiste em corneócitos envoltos por uma matriz lipídica. Essa matriz lipídica impede a penetração de moléculas nas camadas mais profundas da pele.⁶⁹

Apesar dessa barreira, a pele é uma via de administração atraente para fármacos e cosméticos. A administração tópica de medicamentos permite tratar doenças de pele diretamente no local afetado, sem riscos significativos de absorção sistêmica e efeitos colaterais. Além disso, a aplicação de cosméticos tópicos pode fornecer benefícios como hidratação, nutrição e proteção da pele. Para substâncias oleosas, a formulação emulsionada é necessária para otimizar a eficácia do tratamento.⁶⁹

Duas nanoemulsões para administração dérmica de triterpenos pentacíclicos, com atividade anti-inflamatória mostraram maior capacidade anti-inflamatória do que aquela com a mistura sintética. Este resultado é atribuído à permeação mais lenta dos triterpenos através da pele.⁷⁰

Nanoemulsões para aumentar a absorção percutânea de lidocaína e prilocaína, agentes anestésicos locais, tiveram taxas de permeação mais altas e um efeito anestésico mais forte em comparação com uma formulação comercializada.⁷¹

Um gel de nanoemulsão com propionato de clobetasol e calcipotriol para o tratamento tópico da psoríase demonstrou uma atividade antipsoriática significativamente maior do que as drogas livres e uma formulação comercializada.⁷²

Nanopartículas para a administração tópica de finasterida no tratamento da alopecia mostraram benefícios no crescimento do cabelo quando aplicada topicamente, evitando os efeitos colaterais graves da administração oral.⁷³

Além disso, foram relatados avanços adicionais no uso de nanoemulsões nos cuidados com a pele, como a combinação de *centella asiatica L.* e *zingiber officinale* para o tratamento anticelulite,⁷⁴ o uso de nanoemulsões contendo cafeína para o tratamento de celulite⁷⁵ e óleo essencial de *origanum vulgare L.* como medicamento antiacne.⁷⁶ Também foram desenvolvidas nanoemulsões para proteção solar,⁷⁷ tratamento de hiperpigmentação,⁷⁸ aplicações antioxidantes.⁷⁹

Nanoemulsões também vem sendo utilizadas como agentes antimicrobianos.^{31,80-}
⁹⁰ A atividade antimicrobiana das nanoemulsões está relacionada com a sua capacidade

de: interagir com a membrana celular das bactérias, levando ao rompimento da membrana celular de fungos; inativar o processo de replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA); gerar espécies reativas de oxigênio que resulta na inibição de funções enzimáticas, e do bloquear a ligação viral à superfície da célula.^{48,91,92}

Por apresentarem um conjunto diversificado de mecanismos de ação, a obtenção de resistência à nanomateriais pelos microrganismos torna-se muito difícil.^{32,45,88}

3.2.3. *Emprego do ácido oleico na síntese de mini e nanoemulsões*

A seleção das substâncias oleosas para o uso em formulações de mini e nanoemulsões está ligada diretamente às características requeridas para uma determinada aplicação.

Entre os vários óleos que podem ser utilizados na preparação de mini e nanoemulsões, destaca-se o ácido oleico.^{27,93} O ácido oleico é um triglicerídeo monoinsaturado de cadeia longa de ocorrência natural obtido de fontes naturais. Essa substância é aprovada como intensificador de penetração pela *Food and Drug Administration*⁶⁰ dos Estados Unidos da América, o que a torna excelente para uso em aplicações na área da saúde, como o tratamento de dermatoses de pelos de animais.

No entanto, miniemulsões compostas apenas por ácido oleico e água são instáveis a variações de pH, força iônica e temperatura, podendo apresentar baixas uniformidade e estabilidade.^{60,94} Essas desvantagens podem ser minimizadas ou mesmo eliminadas pela adição de emulsificantes e estabilizantes.

3.2.4. *Emulsificantes*

Emulgentes (ou emulsificantes) são substâncias que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, podendo formar um filme flexível que devido à repulsão eletrostática ou estérica entre as interfaces coloidais, impede a coalescência das gotas da miniemulsão.⁸⁶

Diferentes compostos emulsificantes podem ser utilizados na preparação de miniemulsões.^{60,81,95} Entretanto, para um bom emulsificante é muito importante que certos requisitos sejam mantidos: o emulsificante deve possuir afinidade com as interfaces dos sistemas imiscíveis. O mesmo deve possuir uma estrutura anfifílica - polar (solúvel em água) e apolar (insolúvel em água), com um balanço adequado entre as partes hidrófila e hidrófoba e essas estruturas devem ter afinidade aos líquidos imiscíveis do

sistema. Emulsificantes também devem garantir a estabilidade física, química e microbiológica das miniemulsões.

3.2.5. Líquidos iônicos próticos

Os líquidos iônicos (LIs) surgem como um promissor substituto 'verde' para compostos orgânicos voláteis na síntese de miniemulsões. Estudos relatam que as miniemulsões formadas com LIs podem apresentar comportamento melhorado em relação aos emulsificantes comuns.^{96,97}

Os LIs são compostos por ânions e cátions de natureza hidrofóbica ou hidrofílica e possuem características muito interessantes, como baixa pressão de vapor; simplicidade no controle de acidez e basicidade; e a capacidade de dissolver e solvatar uma ampla variedade de espécies.⁹⁸

Esses compostos podem ser amplamente modificados⁹⁹ e suas propriedades ajustadas quimicamente para melhorar sua eficácia em aplicações específicas em áreas como medicina,¹⁰⁰ tratamento biológico,¹⁰¹ captura de CO₂,¹⁰² processos eletroquímicos,^{103,104} produção de energia, refino de petróleo (lubrificantes ou combustíveis)¹⁰⁵ e vários processos de separação, entre outros.¹⁰⁶

Os LIs podem ser classificados em dois tipos, apróticos e próticos. A produção de líquidos iônicos próticos (LIPs) é um processo simples e de baixo custo que ocorre pela transferência de prótons de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted.^{98,107} Eles se destacam pela presença de receptores de prótons e sítios doadores que podem ser utilizados para construir uma rede de ligações de hidrogênio.¹⁰⁷ A atividade biológica de uma variedade de LIPs tem se mostrado potencialmente útil na síntese de compostos antimicrobianos.¹⁰⁸ Uma vez que o uso correto de LIs em suas diversas aplicações depende fortemente de suas propriedades, o conhecimento dessas propriedades é um fator crucial e justifica a necessidade de estudos mais detalhados para cada tipo específico de LI.

Uma série de líquidos iônicos próticos (LIPs) contendo dibutilditiofosfato foram sintetizados e usados como emulsão base de aditivo lubrificante. Em comparação com o aditivo tradicional de polissulfeto, os LIPs em emulsão exibiram propriedades lubrificantes superiores sob condições adversas, reduzindo o atrito e assim o desgaste das peças lubrificadas.¹⁰⁹

Emulsões contendo LIPs de cadeia alquílica carboxilatos de amônio são os substitutos ideais para uso como tensoativos de lubrificantes aquosos no lugar dos óleos

minerais. Estes são mais ecológicos e biodegradáveis. Por este motivo, também são mais indicados do que se trabalhar com emulsões de líquidos iônicos convencionais compostos por cátions heterocíclicos e ânions halogenados que tem preocupantes graus de toxicidades e são corrosivos pois contêm cátions alquil fosfônio combinados com ânions livres de halogênio.¹¹⁰

Na polimerização em emulsão convencional, monômeros hidrofóbicos derivados de ácidos graxos, como oleil ou lauril metacrilato, exibem cinética de migração lenta através da fase aquosa, levando a uma polimerização pobre. Como alternativa, os pesquisadores têm explorado o uso de miniemulsão com o LIP monômero de homopolimerização oleato: metacrilato de dimetilaminoetila (HDMAEMA)-oleato, que tem mostrado resultados promissores principalmente devido à sua hidrofiliabilidade melhorada em comparação com a formulação tradicional.¹¹¹

O uso de LIPs, como cloreto de metilimidazólio ([Hmim]Cl), hidrogenossulfato de trietilamônio ([TEA][HSO₄]) e hidrogenossulfato de dimetilbutilamônio ([DMBA][HSO₄]), facilitou uma técnica de extração química mais sustentável para a remoção de metais pesados. Este método oferece uma abordagem mais ecológica com tempos de extração mais rápidos.¹¹²

3.2.5.1. Líquidos iônicos próticos contendo o cátion 2-hidroxietilamônio e os ânions lactato, salicilato e maleato

A eficácia antimicrobiana dos Líquidos Iônicos Próticos (LIPs) é atribuída ao segmento catiônico da molécula.

A adição de um íon amônio a uma cadeia de hidrocarboneto resulta na formação, por exemplo, de um etilamônio. Em pesquisas com o LIP lactato de 2-hidroxietilamônio os resultados exibiram fortes propriedades antimicrobianas, particularmente contra *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana atingiu amplo espectro contra vários patógenos humanos e mostrou eficácia comparável à gentamicina.¹¹³

O mecanismo de ação dos compostos quaternários de amônio contra microrganismos envolve múltiplos processos. Inicialmente, eles podem se ligar à superfície de células microbianas (como bactérias, fungos e vírus) por meio de interações eletrostáticas entre os íons de amônio quaternário carregados positivamente e os grupos carregados negativamente presentes na membrana celular do microrganismo. Após essa ligação, esses compostos podem romper a estrutura lipídica da membrana celular, levando à sua desestabilização e comprometendo a função de barreira da célula.

Conseqüentemente, o conteúdo celular pode vaziar, levando à desidratação celular e, por fim, resultando na morte do microrganismo.

3.2.5.2 Características que tornam os ânions lactato interessantes ao uso como emulsificante antifúngico

Acredita-se que os íons lactato, maleato e salicilato podem perturbar as estruturas celulares e os processos metabólicos dos fungos, romper as membranas das células fúngicas e interferir nos processos celulares essenciais, levando à inibição do crescimento fúngico, e assim, as suas proliferações, como nas que surgem na pele e nas unhas.

Estudos têm mostrado que o ácido láctico e seus derivados têm efeitos inibitórios contra vários fungos patogênicos, incluindo espécies de *Candida*, que são conhecidas por causar infecções em humanos.¹¹⁴

O ácido láctico e sua forma ionizada, o íon lactato, são comumente usados como agentes antifúngicos em várias aplicações em forma de cremes antifúngicos, pomadas e soluções tópicas.

O ácido láctico é produzido pelo metabolismo de bactérias lácticas, que são utilizadas em processos de fermentação de alimentos, como iogurte e produção de chucrute. O ambiente ácido criado pelo ácido láctico inibe o crescimento de certos fungos, contribuindo para a preservação e estabilidade dos alimentos fermentados.¹¹⁵

Em relação à parte aniônica dos LIPs, o lactato é um exemplo de interesse como emulsificante. O segmento aniônico da molécula de lactato de 2-hidroxi-dietanolamônio compreende uma região hidrofílica com ligações carboxílicas (-COO-) e um grupo hidroxila adjacente (-OH). Essas porções polares têm a capacidade de interagir com as moléculas de água por meio de ligações de hidrogênio.

A ação tensoativa do lactato de 2-hidroxi-dietanolamônio reduz a tensão superficial entre o óleo e a água. Em resumo, a molécula de lactato de 2-hidroxi-dietanolamônio liga-se a uma mistura de óleo e água utilizando suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, atuando como um surfactante ou emulsificante.

3.2.5.3 Características que tornam os ânions maleato interessantes ao uso como emulsificante antifúngico

Estudos demonstraram que o ácido maleico (ácido dicarboxílico) e seus derivados, incluindo sais de maleato, podem inibir o crescimento de várias espécies de fungos. Por exemplo, a pesquisa demonstrou a atividade antifúngica dos sais de maleato contra

Candida albicans, um patógeno fúngico comum que pode causar infecções em humanos.¹¹⁶

O mecanismo exato de ação pelo qual os íons maleato exercem sua atividade antifúngica pode variar dependendo da espécie fúngica específica e da formulação do composto maleato.

3.2.5.4. Características que tornam os ânions salicilato interessantes ao uso como emulsificante antifúngico

Estudo empregando solução de ácido salicílico (AS) em baixa concentração (2,5 mM) com pH mantido controlado em ≤ 3 resultou em inibição da germinação *in vitro* de *Penicillium expansum*, fungo presente na maçã. Além disso, AS causou vazamento de proteínas do patógeno para o meio, dano lipídico mensurável e desorganização intracelular. Além disso, o AS é um composto fenólico considerado seguro para o meio ambiente e para a saúde humana, podendo ser uma alternativa aos fungicidas comumente utilizados.¹¹⁷

Quando adicionado na composição de um shampoo, o ácido salicílico atua no tratamento da caspa por contar com a ação antifúngica, removendo o extrato córneo, impedindo o crescimento de fungos e facilitando a penetração de outros agentes antifúngicos.¹¹⁸

Por fim, vale a pena notar que a eficácia dos íons lactato, maleato e salicilato contra os fungos pode variar dependendo de fatores como o tipo específico de fungo, a concentração do ânion escolhido e as condições gerais em que os fungos estão presentes (pH, umidade, disponibilidade de nutrientes).

Além disso, embora um ânion possa inibir o crescimento fúngico, ele pode não erradicar completamente uma infecção fúngica, e tratamentos antifúngicos adicionais podem ser necessários em alguns casos.

3.2.5.5. Clioquinol como antifúngico incorporado

A descoberta de novos antifúngicos é essencial, porém pesquisas mais detalhadas de moléculas com atividade antimicótica conhecida e modificações estruturais para melhorar a ação parecem ser alternativas mais rápidas para esta finalidade.¹¹⁹

Nesse contexto, destaca-se o antifúngico 8-hidroxiquinolina. A 8-hidroxiquinolina e seus derivados são uma subclasse de quinolinas com uma grande variedade de

atividades biológicas. Elas têm sido utilizadas como fungicida na agricultura e conservante nas indústrias têxtil, madeireira e papelaria.¹²⁰

O interesse em 8-hidroxiquinolinas cresceu exponencialmente nas últimas duas décadas por serem consideradas uma estrutura privilegiada que por modificações em posições específicas pode levar a obtenção de novos candidatos a fármacos para diversas enfermidades.¹²⁰ A reatividade da 8-hidroxiquinolina permite a geração e otimização de um grande número de derivados que são amplamente explorados para efeitos biológicos, tais como efeito neuroprotetor, anticancerígeno, antisséptico, antimalárico, antituberculótico, anti-HIV, antibacteriano e antifúngico^{120,121}. Na **Figura 1** está demonstrada a estrutura molecular do membro mais conhecido da família da hidroxiquinolina, o clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina).

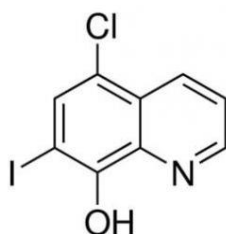


Figura 1. estrutura da molécula do clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina)

O clioquinol é um derivado 5,7-dihalogenado da 8-hidroxiquinolina que foi amplamente usado no período entre 1950 e 1970 como um agente antimicrobiano oral para o tratamento de doenças intestinais e infecções de pele.¹²²

Atualmente o clioquinol é usado como antimicrobiano tópico sob o nome comercial Vioform®.¹²² Além de seu uso como antimicrobiano, o clioquinol se tornou um protótipo para o desenvolvimento de compostos antitumorais e, recentemente, também tem mostrado potencial efeito para o tratamento das doenças de Alzheimer e Parkinson.^{123,124}

Quando usados topicamente, os agentes antifúngicos de formulações convencionais, como cremes e géis, normalmente precisam ser espalhados e ficar em contato com a pele ou pelo por um tempo mínimo para a sua absorção e início da eficácia. Este tempo de retenção pode ser maléfico se causar alguns efeitos colaterais, como vermelhidão, queimação e inchaço no local de inscrição. Devido a isso, várias formulações com o fármaco aprisionado no núcleo de uma miniemulsão são estudadas, pois neste nível de tamanho de partícula, o fármaco pode penetrar em locais específicos

que se quer tratar, e pode-se elevar a concentração e assim acelerar o tratamento visto que o não espalhamento diminuirá os danos a derme do usuário.

Dentre as estratégias para combate de agentes fúngicos, a estratégia escolhida nesse projeto foi o desenvolvimento de miniemulsões como veículo do antifúngico clioquinol.

A seleção dessa estratégia consiste no fato de que a estrutura nanométrica das miniemulsões permite uma melhor permeação no tecido infectado e também na própria célula fúngica, as quais muitas vezes possuem uma espessa parede celular, proveniente de uma evolução da resistência adquirida às próprias substâncias antifúngicas.²⁵ Objetiva-se também a redução e/ou eliminação do efeito colateral no local de aplicação, redução da frequência de dosagem e liberação sustentada da droga.²⁷

O clioquinol é uma molécula com baixíssima solubilidade em água.¹²⁵ Portanto o seu uso direto em formulações aquosas como loções ou xampus visando o tratamento tópico de micoses se torna impraticável. Para tanto, a incorporação desse fármaco em miniemulsões com alta área superficial, alta estabilidade e superfície carregada propicia a sua solubilização em sistemas aquosos, permitindo a preparação de formulações contendo o fármaco disperso homogeneamente por se encontrarem dentro das miniemulsões.⁹ Assim, essas formulações podem ser comercializadas e estocadas sem a ocorrência de precipitação do fármaco no meio.

4.PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste projeto foi investigado a formação de miniemulsões do ácido oleico em meio aquoso na presença de diferentes líquidos iônicos próticos à base do cátion 2-hidroxi dietilamônio. e incorporação do antifúngico clioquinol e análise de atividade antifúngica.

Cada LIP deu origem a uma formulação diferente, e em nenhum momento foram misturados entre si.

4.1. Materiais e métodos

A água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q foi utilizada para a preparação de todas as amostras e soluções.

O ácido oleico foi adquirido da Dinâmica Ltda. (São Paulo, Brasil). O clioquinol foi fornecido pela Faculdade de Farmácia da UFRGS tendo sido adquirido da Sigma-Aldrich do Brasil. O fosfato monobásico de sódio de grau químico foi utilizado.

O corante 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol (HBO) utilizado na análise de fluorescência foi sintetizado de acordo com a literatura¹²⁶ e suas soluções foram preparadas em clorofórmio (CHCl_3) e etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) na concentração de 10^{-4} M. Todos outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico ou farmacêutico e usados como recebidos.

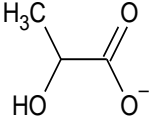
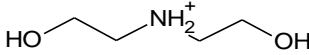
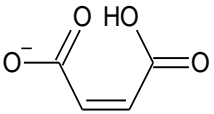
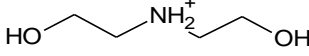
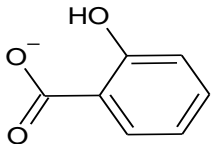
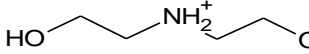
Os líquidos iônicos próticos (LIPs): lactato de 2-hidroxi dietilamônio (2-HDEALa), salicilato de 2-hidroxi dietilamônio (2-HDEASa) e maleato de 2-hidroxi dietilamônio (2-HDEAMa) ilustrados na **Figura 2** foram doados pelo professor Miguel Angel Iglesias (Escola Politécnica, Departamento de Engenharia, Universidade Federal da Bahia (UFBA)).



Figura 2. LIPs da esquerda para a direita: 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa.

Os LIPs foram preparados pela equipe do Professor Miguel conforme literatura,^{99,127,128} e sua estrutura de cátions e ânions está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Estruturas dos cátions e ânions de líquidos iônicos próticos.¹⁰¹

Líquidos Iônicos	Ânions	Cátion (2-hidroxi dietilamônio)
2-HDEALa	 lactato	
2-HDEAMa	 maleato	
2-HDEASa	 salicilato	

4.2. Síntese das Miniemulsões

Para sintetizar as miniemulsões, uma fase aquosa contendo lactato de 2-hidroxi dietilamônio (2-HDEALa), maleato (2-HDEAMa) ou salicilato (2-HDEASa) foi preparada pela dissolução do respectivo LIP em água ultrapura a 25 °C.

A fase aquosa (solução LIP) foi esterilizada por 30 min a 1 bar e 150 °C.

A fase oleosa contendo ácido oleico puro foi esterilizada por filtração através de membranas de 0,22 µm.

Após, as soluções de LIP foram adicionadas assepticamente ao ácido oleico sob agitação magnética a 1250 rpm por 30 minutos a 25 °C.

4.2.1. Análise do efeito da concentração de ácido oleico na formação, tamanho e estabilidade da emulsão.

O efeito da concentração de ácido oleico no tamanho e estabilidade da miniemulsão foi analisado. As sínteses das miniemulsões foram realizadas adicionando-se em um frasco transparente de vidro, 8 mL de cada LIP (2-HDEAMa, 2-HDEALa e 2-HDEASa) na concentração de 20 mM.

Em cada frasco adicionou-se diferentes volumes de ácido oleico afim de se obter as concentrações finais de 10 mM, 24 mM, 48 mM, 80 mM, 100 mM, 130 mM e 160 mM do mesmo. As misturas foram mantidas sob agitação magnética à 1250 rpm, por 30 min e temperatura de 25°C.

Como controle, realizou-se uma mistura com o ácido oleico a 10 mM apenas em água, sem a adição dos LIPs.

Após o término do ensaio, as misturas contendo as miniemulsões foram analisadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico e quanto à estabilidade através da medição do Potencial Zeta pela técnica Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.2. Análise do efeito da concentração de líquidos iônicos próticos na formação, tamanho e estabilidade da emulsão.

Para avaliação do efeito da concentração dos LIPs no tamanho e estabilidade da emulsão, adicionou-se 8 mL de solução contendo diferentes concentrações (20 mM, 50 mM, 100 mM e 150 mM) de cada LIP (2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa) em frascos transparentes de vidro.

Acrescentou-se, nas soluções acima, 25 µL ácido oleico puro para uma concentração final de 10 mM. As misturas foram mantidas sob agitação à 1250 rpm, por 30 min e temperatura de 25°C.

Como controle, realizou-se uma mistura com o ácido oleico a 10 mM apenas em água, sem a adição dos LIPs e uma mistura contendo apenas os LIPs em água sem a adição do ácido oleico.

Após o término do ensaio, as misturas contendo as miniemulsões foram analisadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico e quanto à estabilidade de seu estado emulsionado (miniemulsões) através da medição do Potencial Zeta pela técnica Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3. Caracterização das miniemulsões

Para a caracterização das miniemulsões foram primeiramente avaliados o diâmetro hidrodinâmico e a estabilidade das miniemulsões afim de serem conhecidas as melhores concentrações de cada LIP (2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa) e do ácido oleico para o preparo de miniemulsões com menor tamanho de partícula e maior estabilidade.

4.3.1. Avaliação do diâmetro hidrodinâmico e estabilidade das miniemulsões

As análises de diâmetro hidrodinâmico e Potencial Zeta foram escolhidas como primeiros parâmetros para a classificação das melhores formulações de miniemulsões, ajudando a parametrizar as sínteses e as escolhas das amostras para os ensaios que se seguiriam nas caracterizações necessárias ao objetivo inicial de melhor incorporação de um fármaco antifúngico.

4.3.1.1. Análise do diâmetro de partícula

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) das miniemulsões preparadas foram determinados pela técnica Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

A técnica de DLS mede a difusão de partículas que se movem sob movimento Browniano e a converte em tamanho e distribuição de tamanho usando a relação Stokes-Einstein.

As amostras (n: 3) foram preparadas diluindo as miniemulsões e o controle separadamente com água ultrapura (relação 1:10) e adicionadas em uma cubeta de poliestireno.

Todas as medições foram realizadas em triplicata com um ângulo de detecção de 173°, um comprimento de onda de 633 nm e uma temperatura de 298 K.

Para caracterizar a distribuição de tamanho de partícula usou-se a técnica de espectroscopia de correlação de fótons que foi realizada no mesmo equipamento da leitura do diâmetro hidrodinâmico, o Zetasizer® Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Reino Unido).

O índice de polidispersão (PDI) varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra.⁶⁴ Ou seja, indica a uniformidade do tamanho das gotas dentro da formulação.⁹⁰

Valores de PDI da ordem de 0,2 indicam populações homogêneas, enquanto valores acima de 0,3 representam heterogeneidade.¹²⁹

O diâmetro médio hidrodinâmico (diâmetro médio z) e o PDI foram determinados usando o método cumulante. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.2. Potencial Zeta

A carga superficial das miniemulsões foi determinada através de medidas de Potencial Zeta. As partículas na mistura são colocadas em um campo elétrico, se carregadas, elas vão se movimentar no campo, partículas positivas movimentam-se em direção ao eletrodo negativo, e partículas negativas em direção ao eletrodo positivo.

No entanto, as partículas não movimentam por conta própria; elas carregam uma fina camada de íons e solvente ao seu redor.

A superfície que separa o meio estacionário da partícula em movimento e seus íons e solventes ligados é chamada de superfície de cisalhamento hidrodinâmico, e o Potencial Zeta é o potencial nesta superfície.

O valor desse Potencial se refere à carga elétrica que recobre a partícula sendo, então, um indicativo da estabilidade coloidal: quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor será a probabilidade de agregação, floculação ou sedimentação.⁶⁴

O Potencial Zeta foi medido por mobilidade eletroforética usando um Malvern Nanosizer / Zetasizer® nano-ZS 3600 (Malvern Instruments, Reino Unido). As amostras (n = 3) foram preparadas diluindo as miniemulsões e o controle separadamente com água ultrapura (proporção 1:10) e adicionadas em uma cubeta de poliestireno (DTS1060®, Malvern, Reino Unido). Todas as medições foram realizadas em triplicata. Os resultados são apresentados como potencial zeta médio (mV) e seu desvio padrão (\pm mV).

A condutividade intrínseca dos LIPs geralmente significa que a adição de eletrólito de suporte pode ser evitada.¹⁰⁴ Com isso, neste projeto não se fez uso de adição de cloreto de potássio previamente a este ensaio de Potencial Zeta.

4.3.2. Caracterizações adicionais das miniemulsões

As miniemulsões que apresentaram os menores tamanhos de partícula e as melhores estabilidades foram escolhidas para determinação de características morfológicas e físico-químicas, como análise por microscopia óptica e confocal, pH, RMN, Fluorescência, análises térmicas como DSC e TGA, e por último os ensaios biológicos de erradicação de biofilme fúngico.

4.3.2.1. Determinação do pH das miniemulsões

O pH das miniemulsões foi registrado usando um medidor de pH (PHTEK) a 25 °C. Os valores de pH foram medidos por imersão direta do eletrodo na mistura da miniemulsão.

4.3.2.2. Espectroscopia de Fluorescência.

Miniemulsões contendo corante HBO foram preparadas pela dissolução de 1 mg de corante em 10 mL de CHCl₃ ou etanol seguido da adição de 25 µL de ácido oleico. Após evaporação do solvente em rotaevaporador, 8 mL de LIPs (2-HDEALa, 2-HDEASa e 2-HDEAMa) e/ou água foram adicionados e mantidos sob agitação magnética a 1250 rpm por 30 min a 25°C.

Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos usando um espectrofluorômetro Shimadzu modelo RF-5301PC.S e as larguras de fenda para ambos os monocromadores de excitação e emissão foram ajustadas em 5,0 nm com excitação em 356 nm. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C).

4.3.2.3. Microscopia Óptica e Confocal

As miniemulsões também foram analisadas por microscopia óptica e confocal. As microfotografias ópticas foram realizadas utilizando um microscópio óptico (Olympus®, Hicksville – NY, EUA; modelo BX41) com retroiluminação e ampliação objetiva de 100x, a qual foi acoplada uma Câmera Digital de microscópio de alto desempenho (Olympus® DP73 - 17,28 megapixels de resolução).

As microfotografias confocais foram tiradas usando uma microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) (Olympus®, modelo FV1000) com uma ampliação objetiva de 60 vezes, baseada em um microscópio invertido motorizado IX81.

Velocidades de digitalização de até 4 quadros/segundo com 512 x 512 pixels, modo de digitalização xyz. Laser 1 com comprimento de onda 405 nm e Laser 2 com comprimento de onda 473 nm, excitação 473 nm e emissão 520 nm. As áreas amostrais foram digitalizadas e as imagens foram registradas em timelapse pelo software FV10 Viewer.

Para aumentar o contraste das imagens, 1 mg de corante fluoróforo HBO foi misturado em amostras de miniemulsão. Uma gota dessa amostra foi colocada entre a lâmina de microscópio e a lamínula. Em seguida, a lâmina foi inserida no microscópio para visualização da miniemulsão.¹³⁰

4.3.2.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

As características químicas das miniemulsões foram avaliadas por infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros de FTIR foram registrados na faixa espectral entre 400 e 4000 cm^{-1} e 16 varreduras, e realizados com resolução de 4 cm^{-1} em um equipamento Alpha-P (Bruker, EUA) equipado com um cristal de diamante a 45 °. Os resultados apresentados são uma média de 3 determinações.

4.3.2.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN

A fim de confirmar a estrutura dos LIPs, do ácido oleico e do clioquinol, e assim a não degradação destes enquanto estavam estocados, foram realizados ensaios de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

Os experimentos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de moléculas puras (2-HDEALa, 2-HDEAMa, 2-HDEASa, ácido oleico e clioquinol) foram realizados em um espectrômetro Varian operando na frequência de prótons de 400 MHz e 100 MHz para frequência de carbono. A preparação da amostra exigiu 20 mg da amostra e 1 mL de solvente deuterado (DMSO-d, D_2O ou CDCl_3).

No intuito de verificar possíveis interações inter ou intramoleculares dos sistemas de ácido oleico e LIPs as análises de RMN de ^1H e ^{13}C , COSY e análises de HSQC foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance IIIHD 400 operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Os espectros foram obtidos a 298 K sob condições típicas para ^1H .

As sínteses das miniemulsões para os ensaios de RMN ocorreram conforme os passos descritos no capítulo 4.2, com tempo de agitação de 30 minutos, porém executando as misturas somente dos pares de reagentes (concentração de ácido oleico versus concentração de LIP) escolhidos como aqueles que entregaram o melhor balanço entre alta estabilidade e menor tamanho de partículas.

Para que os resultados RMN das possíveis interações dos reagentes fosse o mais representativo ao que aconteceu nos ensaios prévios (cap. 4.2), primeiramente foi mantida a proporção entre eles.

Um agente limitante foi a quantidade de mínima de água deuterada disponível (0,8 mL para cada mistura). Os demais reagentes foram usados proporcionalmente a este valor.

Os primeiros espectros obtidos demonstraram falta de amplitude de sinais passíveis de boas leituras e interpretações das interações.

Devido a esta falta de sinais, optou-se por elevar a quantidade dos demais reagentes, portanto, alterando-se as proporções na preparação das amostras, optando-se por 25 µL de ácido oleico, 37 mg de 2-HDEALa, 87 mg de 2-HDEAMa, 97 mg de 2-HDEASa e 0,8 mL de água deuterada.

Todos os espectros foram processados com o software Mestre Nova.

4.3.2.6. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

Para entender melhor os LIPs usados neste estudo, a análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi feita para analisar a transição de fase dos três LIPs. As temperaturas de fusão, de cristalização e de transição vítrea foram determinadas para cada LIP, mistura de cada um com o ácido oleico e com o fármaco clioquinol.

A análise DSC foi realizada usando o instrumento DSC Q2000 (TA Instruments).¹³¹ Amostras de cerca de 15-26 mg foram seladas em painéis de alumínio e as amostras foram resfriadas a -80 °C, depois aquecidas a 170 °C e resfriadas novamente a -80 °C a uma taxa de 20 °C/min sob fluxo de nitrogênio. Uma panela T-zero Hermetic limpa e vazia selada com sua tampa foi usada como amostra de referência.

4.3.2.7. Análise Termogravimétrica – TGA

Para se conhecer as temperaturas de estabilidade térmica, foi verificada a temperatura de decomposição térmica por análise termogravimétrica (TGA) realizada usando um sistema SDT Q600 produzido pela TA Instruments, o gás utilizado foi ar sintético 5.0, e vazão de gás de 100 mL/min.

As amostras (9-22 mg) foram executadas em uma panela de alumínio aberta e aquecidas desde a temperatura ambiente até 600 °C a 20 °C.min⁻¹.

Algumas caracterizações (incluindo RMN, FT-IR e TGA)¹³² e pH dos LIPs investigados tem sido relatadas anteriormente pelo grupo inicial de pesquisadores que os sintetizaram na UFBA e estes resultados foram usados como base de comparação das estruturas dos LIPs estudados nesta Tese.

4.4. Incorporação do clioquinol nas miniemulsões mais promissoras como veículo para fármaco.

Após otimização da síntese das miniemulsões, realizou-se, então, os testes para a incorporação do clioquinol no sistema.

Para essa etapa do Projeto, todas as soluções e materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 1 bar e 150 °C a fim de evitar que a interferência de outros microrganismos na ação antifúngica do produto.

Para os ensaios, primeiramente, fez-se a solubilização do clioquinol em ácido oleico em agitação vagarosa, 300 rpm, por 5 minutos. O clioquinol foi utilizado em quantidade representativa a concentração de 0,750 mg/mL.

A partir do clioquinol solubilizado no ácido oleico, adicionou-se as soluções contendo os LIPs nas concentrações de 20 mM de 2-HDEALa, de 50 mM de 2-HDEAMa e de 50 mM de 2-HDEASa. Cada LIP usado separadamente.

A **Figura 3** ilustra como as misturas foram mantidas sob agitação à 1250 rpm, por 30 min à temperatura de 25°C. Como controle, foram sintetizadas as miniemulsões pelo mesmo procedimento sem se adicionar o clioquinol.

Após o término do ensaio, alíquotas das misturas contendo as miniemulsões foram analisadas quanto ao tamanho pelo diâmetro hidrodinâmico e quanto à estabilidade de seu estado emulsionado (miniemulsões) através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e medição do Potencial Zeta pela mobilidade eletroforética.

As amostras foram armazenadas em recipiente de vidro estéril e estas encaminhadas, no mesmo dia, para a Faculdade de Farmácia da UFRGS para os ensaios biológicos.

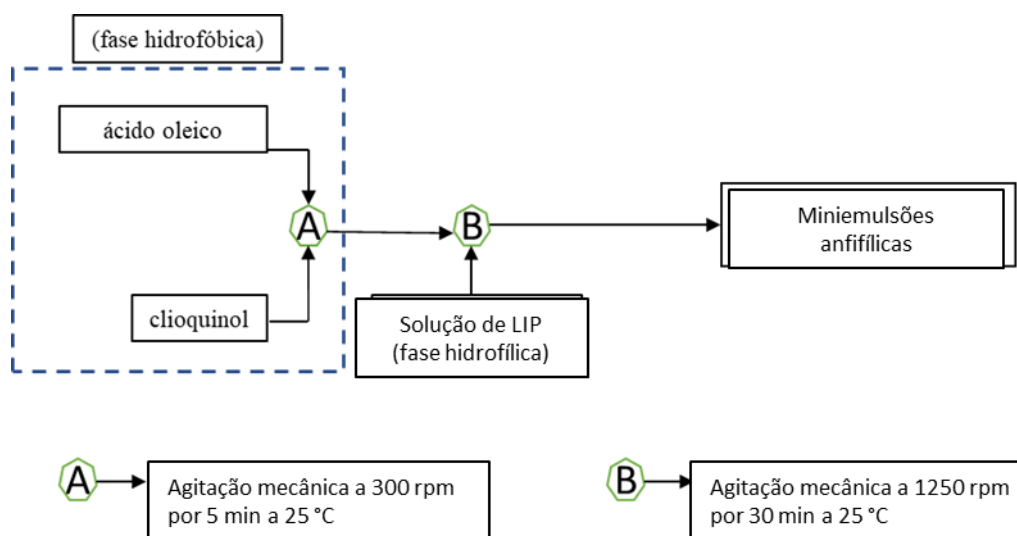


Figura 3. Esquema da preparação das miniemulsões com as duas fases de agitação, a diluição do clioquinol e a de formação da miniemulsão com a adição da solução de LIP.

4.5. Análise da ação antifúngica das miniemulsões sintetizadas contendo o clioquinol.

Visando a utilização do antifúngico clioquinol em formulações como esmaltes, xampus ou sabões líquidos para tratamento tópico de micoses, uma primeira estratégia consistiu em testar a ação antifúngica das miniemulsões contendo clioquinol em unha ou pelo junto ao Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia, UFRGS.

A avaliação da atividade antifúngica combinada em modelos *ex vivo* unha foi realizada, primeiramente, avaliando-se a atividade das miniemulsões em cascos suínos, **Figura 4**, conforme descrito por Quatrin *et al.*¹³³

As miniemulsões testadas foram as sintetizadas conforme descrito no item 4.4.

Testou-se os controles com 20 mM de 2-HDEALa, 50 mM de 2-HDEAMa e 2-HDEASa e 10 mM de ácido oleico. Como controle positivo tem-se os cascos somente com o fungo e como controle negativo, os cascos somente com o clioquinol.

O inóculo fúngico foi preparado a partir do isolado *Trichophyton rubrum* TRU47 e 100 µL da suspensão fúngica (105 UFC/mL) foram inoculados em uma placa de Petri contendo BDA (ágar batata-dextrose), com o auxílio de uma alça de Drigalski.

Os cascos suínos foram cortados em formato de discos com espessura de 1 mm, esterilizados, e, então, adicionados nas placas com ajuda de uma pinça.

Após o período de infecção (cinco dias), os cascos foram transferidos para uma placa contendo SDA, onde o tratamento foi iniciado adicionando diariamente, por sete dias, em cada disco suíno, um volume suficiente da mistura contendo as miniemulsões para cobrir o material (20 µL) (Etapa 1).

A verificação de células fúngicas viáveis que permaneceram no interior dos cascos suínos foi realizada pela contagem das unidades formadora de colônia (UFC).

Para isso, os discos suínos que passaram pelo tratamento foram novamente incubados em placas de SDA e acompanhados por até sete dias para nova verificação de crescimento visível do fungo (Etapa 2).

A porcentagem de erradicação do biofilme é fúngico foi calculada de acordo com a Equação 1⁹, onde, tratamento UFC representa a contagem de células formadoras de colônia após tratamento com as miniemulsões, e controle UFC representa a contagem de células controle apenas com o fungo.

$$\text{Equação 1. eficácia de erradicação do biofilme (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{tratamento UFC}}{\text{controle UFC}} \right) \right] \times 100$$

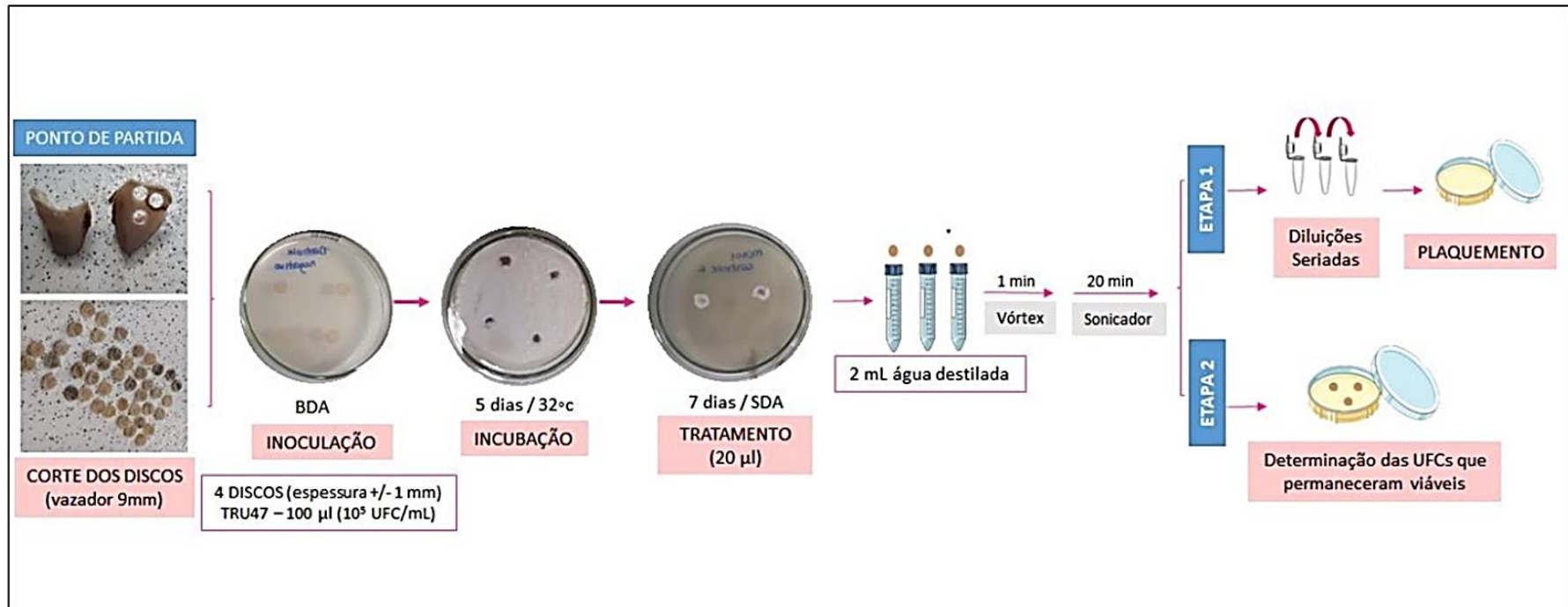


Figura 4. Esquema das etapas do teste de ação antifúngica sobre modelo de onicomicose em cascos suínos.¹³³

4.6. Efeito de formulações com diferentes pH na liberação do fármaco do interior das miniemulsões

Com o intuito de se avaliar a liberação do fármaco clioquinol aprisionado nas miniemulsões estudadas visando uma futura aplicação tópica, estudou-se a perda da estabilidade das miniemulsões após a adição dos seguintes compostos: ácido clorídrico 1 M, ácido acético 1 M, hidróxido de sódio 1 M, sabonete líquido puro e base de unha.

A perda da estabilidade foi avaliada através da alteração visual, do Potencial Zeta e da alteração do tamanho das partículas.

Para a análise do efeito dessas formulações na desestabilização das miniemulsões e liberação do clioquinol, as amostras foram preparadas conforme descrito no capítulo 4.4.

Após a preparação das miniemulsões, dividiu-se o volume da mistura em 6 porções: 1 – sem adição de reagentes (amostra Controle); 2 – adição de até 1 mL de HCl 1 M; 3 – adição de até 1 mL de ácido acético 1 M; 4 – adição de até 1 mL de NaOH 1 M; 5 – adição de até 1 mL de sabonete líquido; 6 – adição de até 1 mL de base de unha.

As soluções foram adicionadas gota-a-gota à mistura até observação de diminuição da turbidez do sistema e formação de 2 fases ou até um volume máximo de 1 mL.

Em outra fase de testes com outros agentes modificadores do pH das miniemulsões, o hidróxido de amônio 1M e o fosfato monossódico 1M também estiveram dentro das mesmas condições de ensaios.

4.7. Análise da ação antifúngica das miniemulsões na erradicação do biofilme *microsporium canis* em pelo de animal

Devido ao grande apelo que os efeitos do fungo *Microsporium canis* causa nos animais, e por já existirem amostras tanto do pelo como do fungo na biblioteca do laboratório da Micologia Aplicada da Farmácia UFRGS novos ensaios de remoção e de inibição foram realizados com amostras de pelos de cães.

*4.7.1. Erradicação do biofilme *Microsporium canis* de amostras de pelo de animal*

Para a remoção do biofilme fez-se as etapas de isolamento do fungo e a preparação das amostras para receber o fungo e o tratamento de erradicação.

4.7.1.1. Isolado fúngico.

O isolado *Microsporium canis* (MCA13) foi utilizado neste estudo. O isolado está depositado na Coleção de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.7.1.2. Infecção *ex vivo* da haste capilar.

A eficácia das miniemulsões na remoção do biofilme fúngico foi avaliada. Após cultivo nos pelos ao longo de 5 dias, em 4,5 mL de TSB e 0,5 µL de inóculo fúngico *M. canis* (MCA13), resultando em uma suspensão de 10⁸ células/ml, o pelo foi tratado com as formulações de miniemulsão por 15 min. Também foram expostos ao pelo os LIPs puros e a miniemulsão formada apenas com o ácido oleico sem os LIPs. Os pelos foram então lavados com água e colocados em um tubo Falcon contendo 5 ml de água destilada (**Figura 5**) e, posteriormente, agitados em vórtex por 1 min e depois sonicados por 20 min para remover as células fúngicas aderidas.⁹

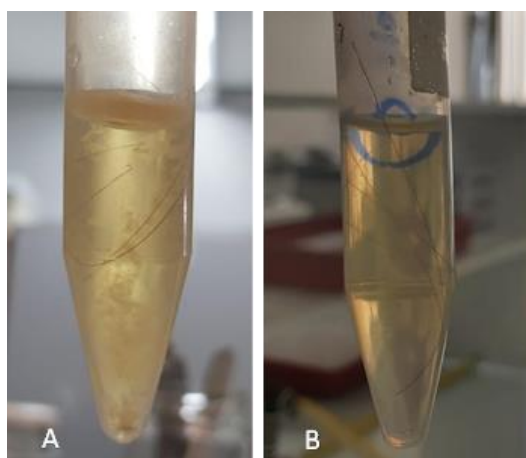


Figura 5. (A) Formação de biofilme fúngico no pelo em contato com o inóculo fúngico de MCA13 após 5 dias de infecção, (B) pelo incubado por 5 dias sem inóculo fúngico.

As experiências foram realizadas em triplicata. Também foram processados um controle positivo, contendo apenas o inóculo fúngico (controle não tratado), e um controle negativo, sem adição de inóculo fúngico. Uma alíquota de 10 µl das suspensões sonicadas foi colocada em uma placa de ágar Sabouraud dextrose (SDA) e espalhada usando uma espátula Drigalski. Estas etapas estão ilustradas na **Figura 6**.

Ao final do período de incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC).

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, bem como o teste de comparações múltiplas de Tukey (software Minitab®; versão 19.2). $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

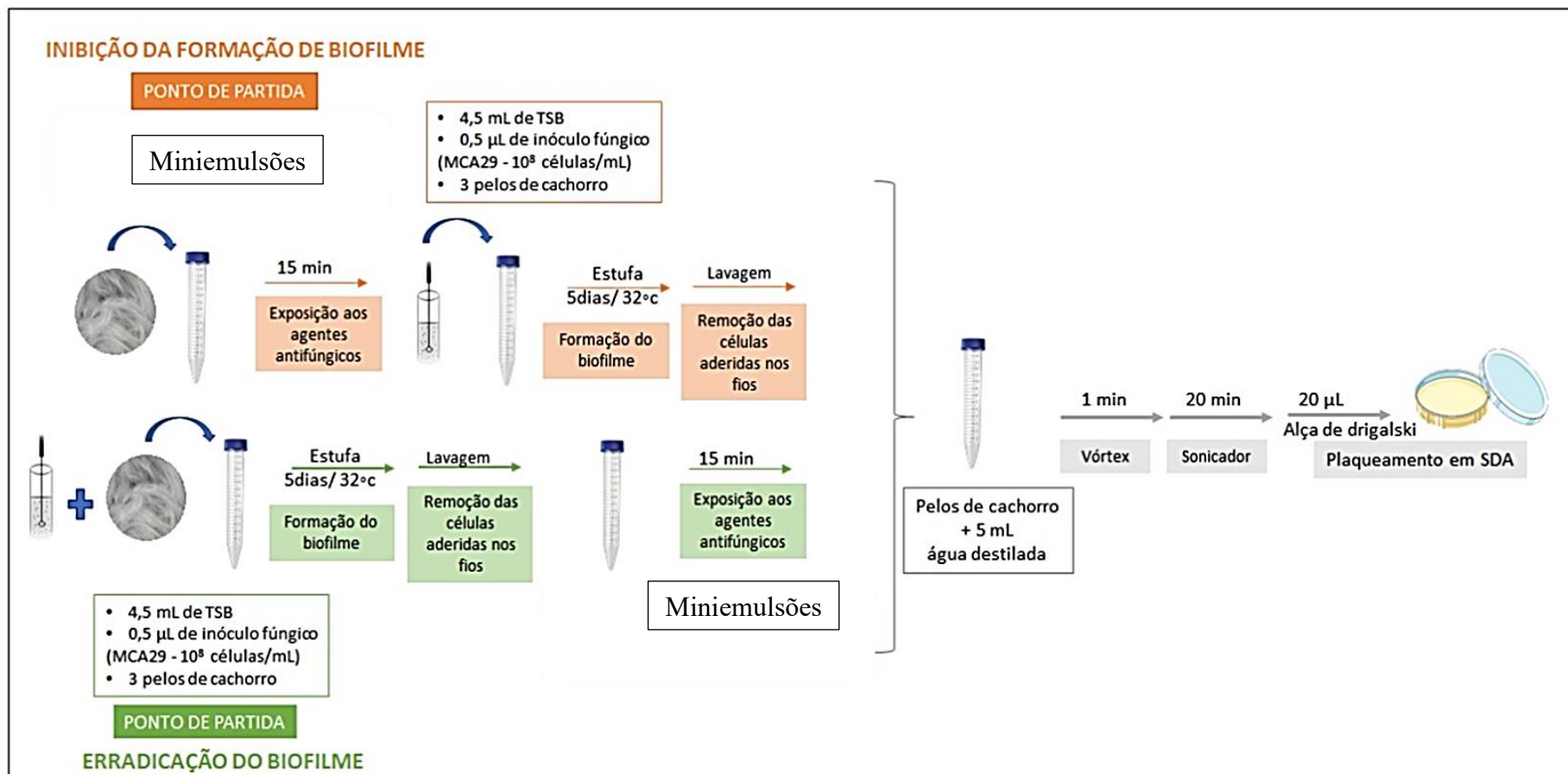


Figura 6. Testes de inibição e erradicação de biofilme de *microsporium canis* em pelos.

4.7.1.3. Uso do Fosfato Monossódico aplicado em conjunto com as miniemulsões

Objetivando quebra da estabilidade das miniemulsões e liberação do clioquinol, nova batelada de formulações (Tabela 2) foram preparadas, em duplicata, agora optando-se pelo reagente fosfato monossódico em uma solução 1 molar. Este é um agente conhecido por ser usado como tampão, e tem o seu pH geralmente em torno de 4,5 a 5,5.

Tabela 2. Amostras para os Ensaios de Remoção e Inibição do biofilme fúngico em pelos.

Formulações

ácido oleico 10 mM + LIP 2-HDEALa 20 mM (aq.)

ácido oleico 10 mM + LIP 2-HDEAMa 50 mM (aq.)

ácido oleico 10 mM + LIP 2-HDEALSa 50 mM (aq.)

(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEALa 20 mM (aq.)

(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEAMa 50 mM (aq.)

(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEASa 50 mM (aq.)

(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEALa 20 mM (aq.) – para adição de NaH_2PO_4 1M

(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEAMa 50 mM (aq.) – para adição de NaH_2PO_4 1M

(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEASa 50 mM (aq.) – para adição de NaH_2PO_4 1M

clioquinol + ácido oleico (amostra do clioquinol dissolvido)

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos durante o período de desenvolvimento experimental da presente tese de doutorado.

5.1. Síntese das miniemulsões

Macroscopicamente, após a síntese das miniemulsões com os três tipos de LIPs, verificou-se a formação de um líquido branco opalescente e de aspecto homogêneo.

5.1.1. *Análise do efeito da concentração de ácido oleico no tamanho e estabilidade da miniemulsão*

O tamanho das miniemulsões é um fator chave que pode afetar a estabilidade dinâmica das emulsões, suas propriedades e as condições de processo de seu uso.⁸¹

Os locais de ação das interações emulsão-células no corpo são determinados em grande parte pelo tamanho. Pequenas emulsões¹³⁴ (20 nm à 100 nm) podem passar pela fenestra das células sinusoides hepáticas. As emulsões de tamanho intermediário (100 nm à 250 nm) são retidas dentro dos vasos sanguíneos e podem circular por longos períodos nos mesmos. Emulsões maiores^{135,136} (250 nm à 1000 nm) podem ser rapidamente capturadas por células Kupffer levando à digestão de partículas no fígado.¹³⁷

O tamanho das miniemulsões pode ser modulado através de diferentes concentrações de ácido oleico ou do líquido iônico. Para tanto, foram avaliados o diâmetro hidrodinâmico, o PDI e o potencial zeta das miniemulsões.

A carga superficial de uma miniemulsão é determinada pelo Potencial Zeta (PZ). Alguns dos mecanismos de transporte de fármacos mais comumente encontrados incluem adsorção de surfactantes carregados para a superfície de partículas, perda de íons da rede de cristal sólido e ionização de grupos superficiais. Esses processos levam à produção de uma densidade de carga superficial, expressa em coulombs por metro quadrado, que é a medida fundamental de carga na interface.

A carga não pode ser medida diretamente, mas apenas através do campo elétrico que cria ao redor da partícula. Assim, a carga superficial é normalmente caracterizada em termos de tensão na superfície da partícula, o potencial da superfície, em vez de uma densidade de carga, embora um geralmente possa ser calculado a partir do outro. Sua magnitude é bastante sensível a variações no meio, e serve como poderosa ferramenta

para definição das melhores condições de trabalho. Quando o Potencial Zeta é nulo, é denominado como ponto isoelétrico, e a região em torno desse valor corresponde à região de menor estabilidade das suspensões do ponto de vista eletrostático.¹³⁸

A Tabela 3 traz os resultados do diâmetro hidrodinâmico e da estabilidade das miniemulsões formadas a partir de diferentes concentrações do ácido oleico, mantendo-se fixa a concentração de cada LIP.

Tabela 3. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta de miniemulsões preparadas com 20 mM de LIPs e diferentes concentrações de ácido oleico.

	Fase oleosa					Fase
	Concentração de ácido oleico (mM)					Aquosa
	10	50	100	130	160	20 mM
Tamanho (nm)	259 ± 6	305 ± 7	307 ± 21	298 ± 4	323 ± 5	2-HDEALa 20 mM
PDI*	0,17	0,21	0,58	0,53	0,44	
PZ (mV)	-51 ± 2	-39 ± 3	-51 ± 2	-43 ± 0	-53 ± 2	
Tamanho (nm)	228 ± 11	260 ± 6	264 ± 12	282 ± 12	330 ± 10	2-HDEAMa 20 mM
PDI*	0,19	0,21	0,21	0,22	0,23	
PZ (mV)	-70 ± 1	-17 ± 1	-51 ± 1	-39 ± 2	-51 ± 2	
Tamanho (nm)	245 ± 9	290 ± 27	170 ± 21	294 ± 33	250 ± 22	2-HDEASa 20 mM
PDI*	0,18	0,24	1	0,34	0,87	
PZ (mV)	-55 ± 0	-60 ± 0	-30 ± 2	-52 ± 2	-27 ± 1	

Os valores representam média ± desvio padrão (n = 3). *PDI: índice de polidispersão.

Os LIPs podem atuar como emulsificantes, sendo barreira mecânica e através da formação de um potencial de superfície (potencial zeta), pode produzir forças elétricas repulsivas entre as gotas de óleo que se aproximam, dificultando a coalescência.⁹⁰

Neste trabalho, todas as miniemulsões formadas com diferentes concentrações de ácido oleico e soluções aquosas de LIP 20 mM apresentaram valores de potencial zeta negativos, indicando que as superfícies das miniemulsões estavam carregadas negativamente.

Além disso, para uma miniemulsão eletrostaticamente estável, o potencial zeta deve ter um valor inferior a -30 mV ou superior a +30 mV.⁶⁰ Para os três LIPs testados, as miniemulsões formadas com menor concentração de ácido oleico apresentaram boa estabilidade eletrostática (PZ inferior a -50 mV).

Estes resultados indicam que a presença de grupos carboxilato nos LIPs provavelmente desempenharam um papel na estabilização eletrostática da miniemulsão. Em trabalho anterior foi observado que nanoemulsões produzidas com alginato de sódio e ácido oleico apresentavam valores de potencial zeta abaixo de - 30 mV. Os autores sugerem que a estabilidade eletrostática das nanoemulsões estava relacionada à presença de grupos carboxilato e hidroxila no alginato de sódio.⁶⁰

Para as miniemulsões sintetizadas utilizando os LIPs 2-HDEALa ou 2-HDEAMa os resultados são claros de que a melhor formulação para cada LIP foi com a mistura com 10 mM de ácido oleico, para o diâmetro, o PDI e a estabilidade medida por PZ.

Para as miniemulsões sintetizadas utilizando o LIP 2-HDEASa tanto a concentração de 10 mM como a de 100 mM de ácido oleico foram capazes de formar miniemulsões de tamanhos menores, 245 e 170 nm, respectivamente.

Porém, as miniemulsões utilizando o LIP 2-HDEASa com o ácido oleico na concentração de 10 mM, formaram miniemulsões com maior estabilidade -55 mV e PDI 0,18.

5.1.2. Análise do efeito da concentração dos líquidos iônicos próticos no tamanho e estabilidade da emulsão

A análise do efeito da concentração dos LIPs no tamanho e estabilidade da miniemulsão foi realizado adicionando-se diferentes concentrações dos LIPs 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa (20 mM, 50 mM, 100 mM e 150 mM) e ácido oleico puro para uma concentração final de 10 mM. Após a síntese, o tamanho das miniemulsões foi determinado pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e a estabilidade através da medição do Potencial Zeta.

A Tabela 4 traz os resultados do diâmetro e estabilidade das miniemulsões formadas a partir de diferentes concentrações dos LIPs, mantendo-se fixa a concentração de ácido oleico

Conforme observado na tabela 4, as concentrações de 20 mM de 2-HDEALa, 50 mM de 2-HDEAMa e 50 mM de 2-HDEASa produziram miniemulsões de menores diâmetros e boa estabilidade (259 nm; 196 nm; 184 nm, respectivamente). baixo PDI (< 0,22) e boa estabilidade eletrostática (-51, -86 e -73 mV, respectivamente).

Além disso, em todas as condições testadas, as superfícies das miniemulsões estavam carregadas negativamente. A maioria das miniemulsões exibe valores de potencial zeta abaixo de -30 mV, o que sugere estabilidade eletrostática.

Tabela 4. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta de miniemulsões preparadas com 10 mM de ácido oleico e diferentes concentrações de 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa.

	Fase Aquosa 2-HDEALa (mM)				Fase oleosa
	20	50	100	150	
Tamanho (nm)	259 ± 6	337 ± 12	403 ± 100	262 ± 4	ácido oleico 10 mM
PDI*	0,17	0,31	0,25	0,21	
PZ (mV)	-51 ± 2	-66 ± 1	-49 ± 1	-35 ± 1	
2-HDEAMa (mM)					
	20	50	100	150	
Tamanho (nm)	228 ± 11	196 ± 21	245 ± 17	255 ± 7	ácido oleico 10 mM
PDI*	0,19	0,21	0,31	0,25	
PZ (mV)	-70 ± 1	-86 ± 10	-69 ± 3	-46 ± 0	
2-HDEASa (mM)					
	20	50	100	150	
Tamanho (nm)	245 ± 9	184 ± 7	195 ± 4	245 ± 8	ácido oleico 10 mM
PDI*	0,18	0,22	0,21	0,29	
PZ (mV)	-55 ± 0	-73 ± 2	-66 ± 4	-42 ± 1	

Os valores representam média ± desvio padrão (n = 3). *PDI: índice de polidispersão.

Tendo em vista os valores negativos de Potencial Zeta acredita-se que houve uma preferência pela exposição dos ânions dos LIPs no meio externo.

A partir de nossos resultados, observou-se um tamanho menor de miniemulsões obtidas com LIPs com ânions maleato e salicilato em comparação com ânion lactato.

Isso pode ser atribuído ao maior volume molecular dos ânions maleato e salicilato em comparação ao ânion lactato, o que poderia levar ao impedimento estérico, resultando na formação de gotículas menores.

Além disso, os grupos polares nos ânions maleato e salicilato podem aumentar a estabilização eletrostática da gota, resultando em uma formação de tamanho de gota menor.

Em outro estudo, nanoemulsões foram preparadas utilizando óleo de palma com alto teor oleico, gelatina e proteína de soro de leite. Foi observada uma relação direta do soro e do óleo com o tamanho das gotas da nanoemulsão.⁸¹ Os autores sugeriram que a camada proteica ao redor do óleo promove um aumento na estabilidade da nanoemulsão e uma redução na coalescência das gotas.

Cabe ressaltar que as reações de síntese utilizando apenas as soluções dos LIPs nas diferentes concentrações, sem a adição do ácido oleico, não levaram à formação de miniemulsões, e que a síntese envolvendo apenas água com ácido oleico na concentração

de 10 mM, sem a adição de LIP formou miniemulsões também carregadas negativamente (-55 mV), porém com grande diâmetro e dispersão de tamanho (4166 ± 2926 nm), como visto na tabela 5.

Portanto, a utilização dos LIPs torna-se essencial na síntese das miniemulsões sendo capazes de produzir miniemulsões estáveis e de reduzido tamanho.

Em geral, quando o óleo está em níveis elevados, proporcionaram partículas maiores das miniemulsões. O aumento do teor de óleo, pode levar a um aumento da viscosidade da fase dispersa e, conseqüentemente, a um aumento da resistência ao fluxo e restrição da taxa de quebra de gotas.⁹⁰

A distribuição de tamanho das miniemulsões pode ser visualizada na **Figura 7**. A miniemulsão com 10 mM de ácido oleico e 20 mM de 2-HDEALa exibiu uma dispersão monomodal sem gotículas de emulsão maiores que 1000 nm (**Figura 7a**).

Da mesma forma, para miniemulsões com 10 mM de ácido oleico e LIPs 50 mM de 2-HDEAMa e 2-HDEASa, o processo de síntese alcançou controle de tamanho, com menos de 2% da gota de emulsão excedendo 1000 nm de tamanho (**Figura 7b e c**).

Valores de PDI $< 0,30$ são importantes em relação à estabilidade física das miniemulsões, demonstrando controle de tamanho na síntese e boa qualidade das miniemulsões.¹³⁹⁻¹⁴¹

Os valores de PDI $< 0,20$ observados Tabela 3 para miniemulsões com menor concentração de ácido oleico indicou que sobre estas condições um controle de tamanho foi alcançado nestas sínteses.

A partir dos resultados apresentados neste estudo, os LIPs utilizados neste trabalho desempenham um papel importante junto com o ácido oleico na formação de miniemulsões homogêneas e estáveis sob agitação magnética simples com tempo de reação curto (30 min) sem a necessidade de energia adicional. Os resultados sugerem que esses LIPs em meio aquoso são capazes de formar uma camada ao redor do ácido oleico, evitando a coalescência das gotículas e criando miniemulsões.

A redução do tamanho de uma emulsão para a escala de miniemulsão proporciona uma área superficial maior que pode aumentar a atividade antimicrobiana.¹⁴²

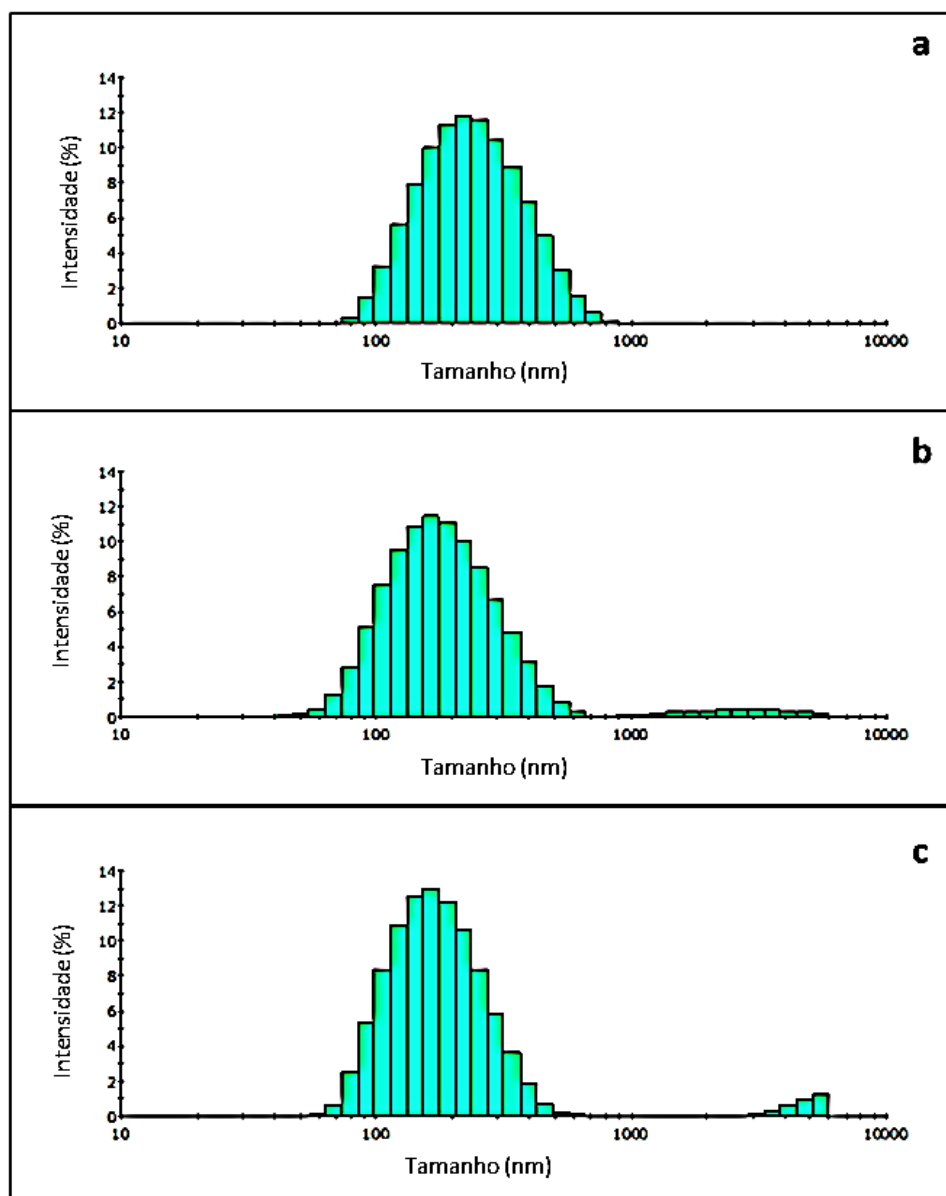


Figura 7. Distribuição de tamanho de miniemulsões com LIPs: a) 2-HDEALa, b) 2-HDEAMa e c) 2-HDEASa.

O pH das miniemulsões a serem utilizadas no tratamento das dermatofitoses é um fator importante a ser considerado para evitar danos às células epiteliais.

Pode-se verificar na Tabela 5 que o pH das miniemulsões otimizadas foram 5,0 para a miniemulsão com 2-HDEALa 20 Mm e ácido oleico 10 mM (ME20La10AO); 7,0 para a miniemulsão com 2-HDEAMa 50 Mm e ácido oleico 10 mM (ME50Ma10AO) e 6,0 para a miniemulsão com 2-HDEASa 50 mM e ácido oleico 10 mM (ME50Sa10AO).

O pH da pele é levemente ácido com valor de pH entre 4,7 e 5,7.^{143,144} As miniemulsões sintetizadas neste trabalho apresentaram pH próximos aos valores encontrados na pele humana. Portanto, nenhuma das miniemulsões está numa faixa de pH prejudicial à pele humana e animal.

Tabela 5. pH, diâmetro médio z (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das miniemulsões e um controle apenas com ácido oleico em água (ME10AO).

Miniemulsões	pH	Tamanho (nm)	PDI*	Potencial Zeta (mV)
ME20La10AO	5.0	259 ± 6	0.17	-51 ± 2
ME50Ma10AO	7.0	196 ± 21	0.21	-86 ± 10
ME50Sa10AO	6.0	184 ± 7	0.22	-73 ± 2
ME10AO	8.0	4166 ± 2926	1	-55 ± 5

O conhecimento do pH das miniemulsões também é muito importante para a manutenção do seu estado emulsionado, seus tamanhos de partículas e formatos.

Variar o pH altera o estado de protonação do ácido oleico e dos LIPs, que por sua vez influencia a densidade de carga superficial e a geometria de empacotamento no sistema.¹⁴⁵

5.2. Incorporação do antifúngico nas miniemulsões mais promissoras como veículo para fármaco.

Para a incorporação do antifúngico clioquinol, foram sintetizadas miniemulsões utilizando as concentrações de ácido oleico e LIPs otimizados, sendo essas, 10 mM de ácido oleico e 20 mM do LIP 2-HDEALa, 50 mM do LIP 2-HDEAMa e 50 mM do LIP 2-HDEASa.

Nessa etapa, todas as soluções e materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 1 bar e 150°C a fim de evitar que outros microrganismos interfiram na ação antifúngica do produto.

Na Tabela 6 estão os resultados do diâmetro hidrodinâmico e da estabilidade (Potencial Zeta) das miniemulsões formadas após incorporação do antifúngico clioquinol.

Pode-se observar que a incorporação do clioquinol, no interior das miniemulsões, não levou a uma modificação do diâmetro destas, bem como da estabilidade em comparação às respectivas miniemulsões sem o antifúngico.

Cabe ressaltar que da mesma forma que a síntese envolvendo apenas o ácido oleico na concentração de 10 mM sem a adição de LIP formou miniemulsões carregadas negativamente (-55 ± 5 mV), porém com grande diâmetro e dispersão de tamanho (4166

± 2926 nm), essa mesma síntese com a adição do clioquinol, promoveu a formação de miniemulsões e possível aprisionamento do clioquinol, porém essas miniemulsões continuaram apresentando um grande diâmetro e menor estabilidade (2599 ± 559 nm) e (-48 ± 4 mV) quando comparada às miniemulsões formadas com os LIPs.

Deaguero e colaboradores encapsularam o antifúngico miconazol em nanoemulsões de colesterol/oleato de sódio e observaram a formação de emulsões dentro da faixa nano (± 300 nm), onde certa formulação resultou em 383 ± 103 nm e 88 ± 5 mV, o que representa polidispersão moderada e estabilidade alta.⁶²

Quando comparado com o creme disponível comercialmente, actavis, bem como com o miconazol livre a formulação de nanoemulsões de miconazol exibiu inibição fúngica aumentada por um fator de três ou mais.

Além disso, com tamanhos menores de nanopartículas, maiores porcentagens de miconazol puderam ser administradas, aumentando ainda mais a eficácia do mesmo.⁶⁵

Tabela 6. Diâmetro médio z, PDI e potencial zeta (PZ) das miniemulsões e de amostras controle antes e após a incorporação do antifúngico clioquinol.

Formulações	diâmetro (nm)	PDI*	PZ (mV)
ME20La10AO	211 ± 27	$0,28 \pm 0,05$	-66 ± 2
ME50Ma10AO	191 ± 30	$0,38 \pm 0,02$	-86 ± 5
ME50Sa10AO	200 ± 22	$0,33 \pm 0,02$	-82 ± 4
ME20La10AO c/ clioquinol	205 ± 3	$0,23 \pm 0,02$	-63 ± 4
ME50Ma10AO c/ clioquinol	182 ± 15	$0,33 \pm 0,07$	-87 ± 6
ME50Sa10AO c/ clioquinol	261 ± 45	$0,32 \pm 0,03$	-80 ± 6
ME10AO	4166 ± 2926	1 ± 0	-55 ± 5
ME10AO c/ clioquinol	2599 ± 559	$0,98 \pm 0,03$	-48 ± 4

Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 3). *PDI: índice de polidispersão.

5.3. Caracterização das miniemulsões

As miniemulsões foram caracterizadas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, de Fluorescência, de Infravermelho, Microscopia Óptica e Confocal, Calorimetria Exploratória Diferencial e Análise Termogravimétrica.

5.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Os resultados dos reagentes em separado confirmaram a integridade das estruturas dos LIPs, do ácido oleico e do clioquinol, corroborando com aqueles encontrados em trabalhos anteriores relatados na literatura.^{102,146}

2-HDEALa

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ ppm 4.01 (q, 1H), 3.77 (t, 4H), 3.14 (t, 4H), 1.23 (d, 3H).

¹³C RMN (101 MHz, D₂O) δ ppm 182.12, 68.23, 56.31, 48.70, 20.04.

2-HDEAMa

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ ppm 6.36 (s, 2H), 3.69 (t, 4H), 3.07 (t, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, D₂O) δ ppm 174.04, 135.26, 56.30, 48.67.

2-HDEASa

¹H RMN (400 MHz, d₂o) δ 7.71 (t, 1H), 7.25 (t, 1H), 6.75 (q, 2H), 3.65 (t, 4H), 2.96 (t, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, d₂o) δ 175.08, 159.47, 133.64, 130.17, 119.01, 117.78, 116.01, 56.22, 48.59.

Ácido oleico

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9.68 (s, 1H), 5.28 (d, 2H), 2.28 (t, 2H), 1.96 (t, 2H), 1.57 (s, 2H), 1.26 (s, 18H), 0.83 (t, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 179.90, 129.90, 34.08, 31.96, 29.58, 29.10, 27.22, 24.70, 22.71, 14.06.

Clioquinol.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.94 (d, 1H), 8.45 (d, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.74 (q, 1H), 3.42 (s, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 153.57, 149.61, 137.47, 134.92, 132.94, 125.66, 123.38, 119.38, 78.89, 39.50.

Quanto à análise da composição da miniemulsão, todos as miniemulsões apresentaram os sinais característicos dos componentes da mistura.

Possíveis interações entre as moléculas dos LIPs com o ácido oleico e com a água não são definitivas com ^1H , ^{13}C , COSY e HSQC, porém o somatório destas análises propiciou uma informação sobre o assunto. Foi observado um sinal provavelmente dos dois hidrogênios e do nitrogênio do cátion dos LIPs (**Figura 8**).

Na parte catiônica dos LIPs testados, os hidrogênios ligados ao nitrogênio são hidrogênios ácidos. Na análise de RMN existe uma troca destes pelo deutério da água deuterada. É normal trocar esses hidrogênios mais ácidos, estes são mais lábeis, ocorre a quebra da ligação mais facilmente, eles saem, e o deutério ocupa as posições, formando uma ligação mais estável.

No caso dos líquidos iônicos próticos testados, quando nas amostras de cada um com ácido oleico, esse sinal apareceu ainda com os hidrogênios, tendo uma intensidade significativa.

Observou-se que sem a presença do ácido oleico, a troca de deutério é mais intensa. Com o ácido oleico este sinal ficou mais preservado. Isto pode estar relacionado à diminuição da polaridade do meio devido à presença de ácido oleico e/ou à interação da parte catiônica do LIP com o ácido oleico, sob condições de RMN, promovendo encapsulamento eficiente do ácido oleico pelo LIP na miniemulsão, o que reduziria a possibilidade de troca H/D no sítio de nitrogênio do IL.

Estes resultados concordam com os resultados interpretados da análise dos potenciais zeta das miniemulsões. Provavelmente, na miniemulsão, os grupos carboxilato da parte aniônica dos LIPs estão em contato com a fase aquosa, estabilizando a miniemulsão pela entrega da alta carga negativa, e a parte catiônica está em contato com a fase de ácido oleico, sendo os participantes do núcleo das miniemulsões.

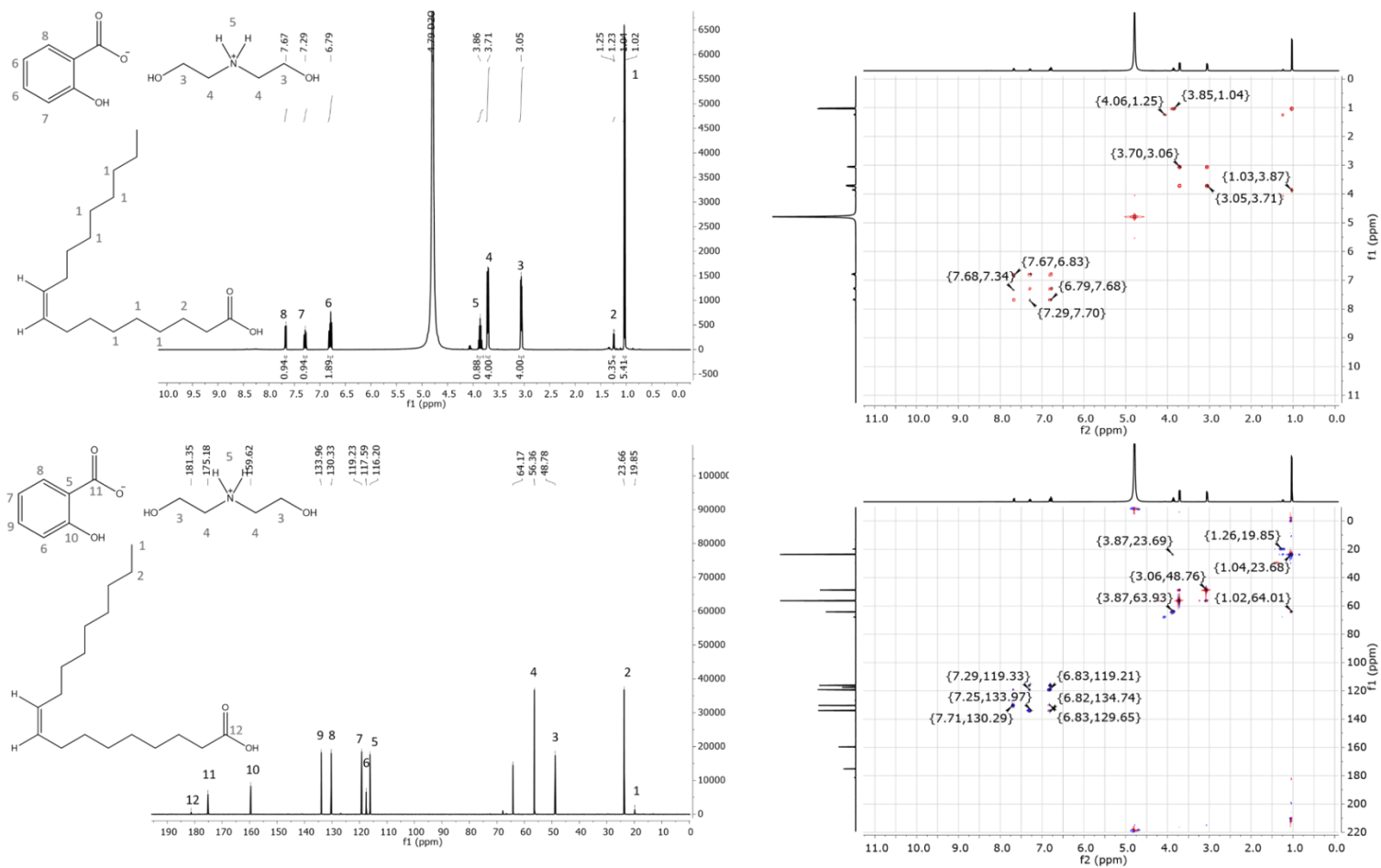


Figura 8. Resultados RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e HSQC para a miniemulsão com o LIP 2-HDEASa.

5.3.2. Espectroscopia de Fluorescência

Para elucidar a microestrutura das miniemulsões foi realizado um ensaio de espectroscopia de emissão de fluorescência com um corante de transferência intramolecular de prótons no estado excitado (ESIPT) como sonda fluorescente. É bem sabido que a emissão de fluorescência dos corantes ESIPT depende da polaridade do microambiente.¹⁴⁷

Os líquidos iônicos são uma nova classe de solventes que ganharam atenção significativa de pesquisadores que trabalham com corantes ESIPT devido às suas propriedades distintas.¹⁴⁸⁻¹⁵²

O comportamento ESIPT inverso de certos corantes ESIPT na presença de LIs foi explorado através da técnica de espectroscopia de fluorescência.

Esta técnica é utilizada porque a emissão dupla de fluorescência correspondente às formas enol e ceto, bem como suas intensidades relativas, demonstraram ser dependentes dos LIs.

Desde 2010, estudos apontam para essa correlação, como visto em Kimura *et al.* estudo a dinâmica de fluorescência de 4'-N,N-dietilamino-3-hidroxi-flavona, uma importante classe de corante ESIPT, em vários líquidos iônicos à temperatura ambiente.¹⁵³

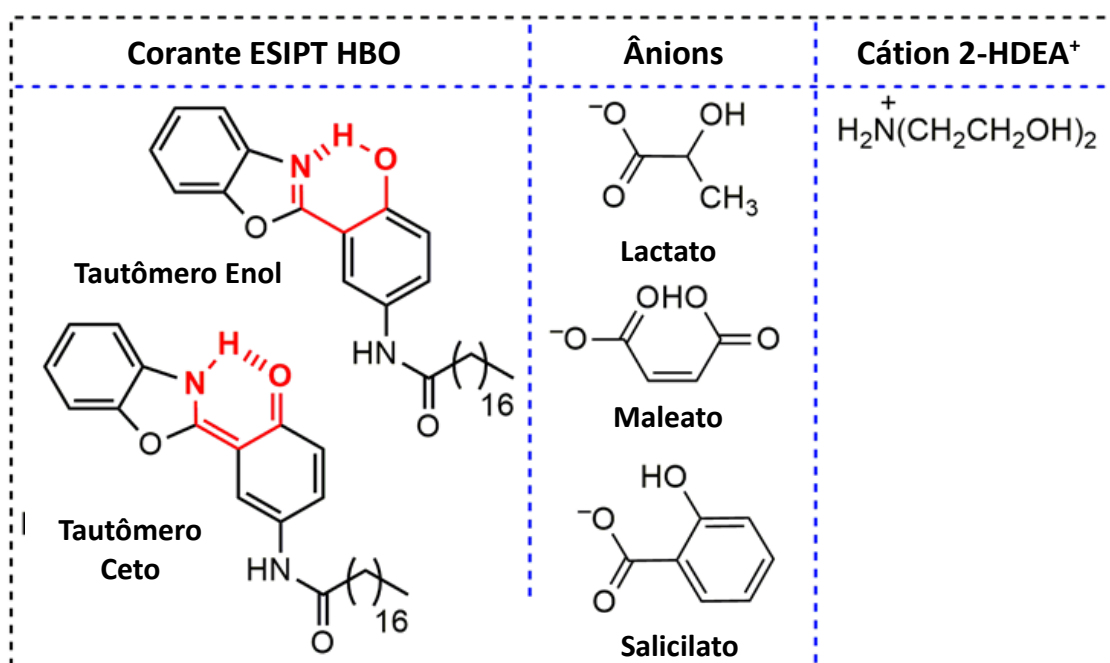


Figura 9. Estrutura química do corante HBO e do cátion [2-HDEA]⁺ e dos ânions [La]⁻, [Ma]⁻ e [Sa]⁻ dos LIPs utilizados no presente estudo.

Neste trabalho, os espectros de fluorescência do corante HBO foram medidos na presença das miniemulsões com os LIPs 2-HDEALa, 2-HDEAMa, 2-HDEASa e uma amostra sem a presença de qualquer LIP, somente ácido oleico e água, utilizando etanol como solvente (10^{-4} M). Na **Figura 9** estão as estruturas do corante e dos LIPs.

Os solventes CHCl_3 e etanol foram escolhidos para simular um ambiente polar/aprótico e polar/prótico, respectivamente. O corante HBO apresentou apenas uma banda de emissão (508 nm) que corresponde à banda ESIPT em clorofórmio e duas bandas de emissão devido aos confôrmeros enol/ceto (405 nm e 508 nm, respectivamente) em etanol como solvente.

Como resultado, na **Figura 10**, pôde-se observar que a emissão de fluorescência do corante HBO foi dependente dos LIPs puros: o corante HBO apresentou apenas a banda ESIPT na presença de 2-HDEALa (20 mM) e duas bandas enol/ceto na presença de 2-HDEAMa (50 mM); a banda ESIPT estava ausente e apenas a banda enol foi detectada na presença de 2-HDEASa (50 mM). Estes resultados indicam que a emissão ESIPT foi provavelmente favorecida em um LIP de menor viscosidade, como 2-HDEALa, em comparação com os de maior viscosidade 2-HDEAMa e 2-HDEASa, como já relatado na literatura para outro corante ESIPT.¹⁵⁰

Conforme observado para LIPs puros, a dinâmica da emissão do corante HBO nas miniemulsões dependeu da natureza dos ânions do LI. Uma miniemulsão apenas com água e ácido oleico foi preparada para comparação. Nas miniemulsões com 2-HDEALa e 2-HDEASa a banda ESIPT foi predominante (500 nm), o que indica que o corante foi inserido em ambiente apolar promovido pelo ácido oleico sem contato com a água.

Por outro lado, na miniemulsão com o LIP 2-HDEAMa apenas a banda enol foi observada (412 nm), indicando que o corante faz ligações de hidrogênio com moléculas de água e evita a emissão do ceto-tautômero.

Estes resultados estão disponíveis na **Figura 10** e, na **Figura 11** encontra-se uma representação esquemática demonstrando a formação de miniemulsões fluorescentes utilizando o corante HBO.

Além disso, o comportamento de fluorescência do corante HBO nas miniemulsões contendo lactato e salicilato como contra-ânions é semelhante ao das miniemulsões apenas com água e ácido oleico (**Figura 10**). Estes resultados indicam que nas miniemulsões com 2-HDEALa e 2-HDEASa o ácido oleico é eficientemente circundado por LIP, formando uma miniemulsão micelar/vesicular. Estes resultados concordam com o que foi observado pela análise de RMN.

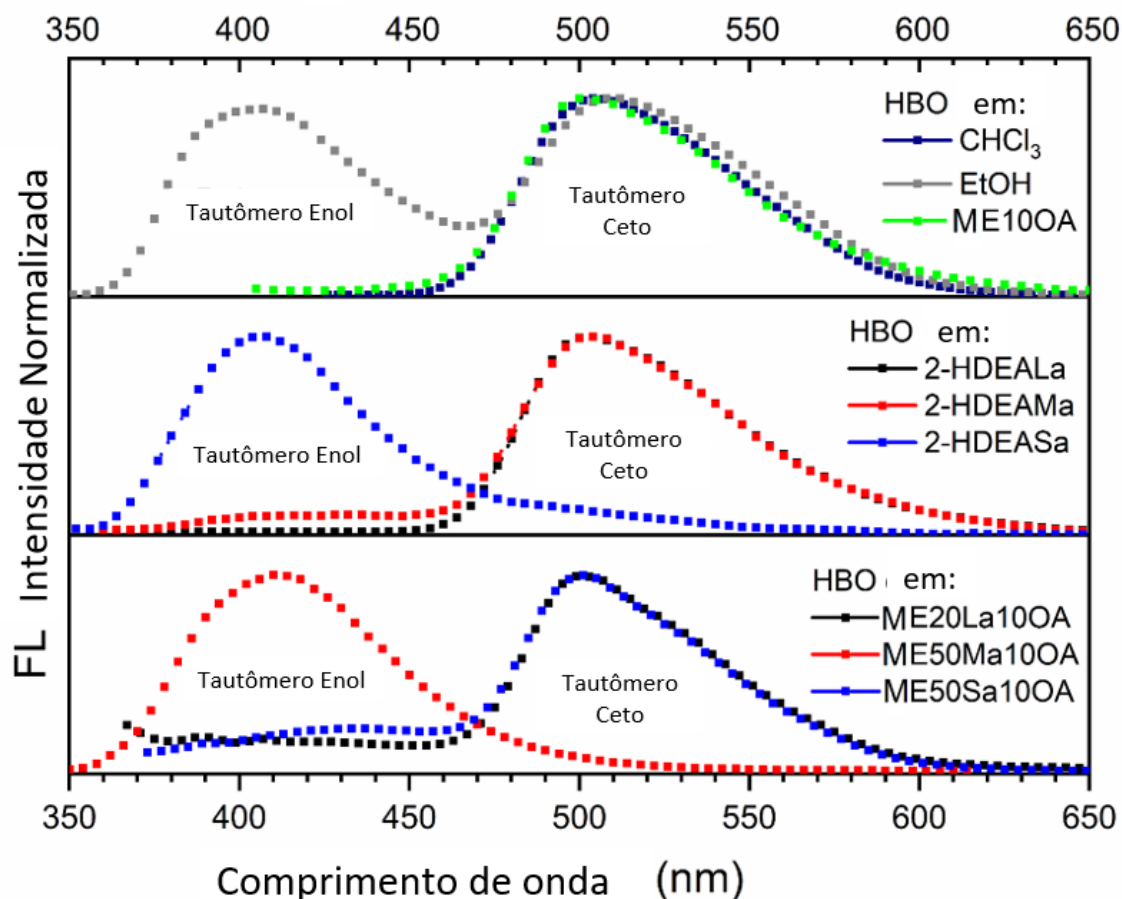


Figura 10. Espectros de emissão de fluorescência do corante HBO na presença dos LIPs puros 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa em etanol (10^{-4} M) e miniemulsões com os LIPs 2-HDEALa 20 mM e 10 mM de ácido oleico (ME20La10OA), 2-HDEAMa (ME50Ma10OA), 2-HDEASa (ME50Sa10OA). Os espectros de emissão de fluorescência do corante HBO em clorofórmio, etanol e miniemulsão apenas com água e ácido oleico (NE100A) foram feitos para comparação.

Vale ressaltar novamente que de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, os LIPs desempenham um papel importante junto com o ácido oleico na formação eficiente de miniemulsões sob agitação magnética simples com tempo de reação curto (30 min), sem a necessidade de energia adicional. Em outro trabalho, o corante HBO lipofílico exibiu uma banda estreita de emissão de fluorescência devido ao mecanismo ES IPT na presença de lipossomas de L- α -fosfatidilcolina (ECPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC). O entorno proporcionado pelos lipossomas desempenhou papel fundamental na fotofísica do corante HBO de tal forma que o corante foi inserido na bicamada lipídica sem contato com a água.¹²⁶

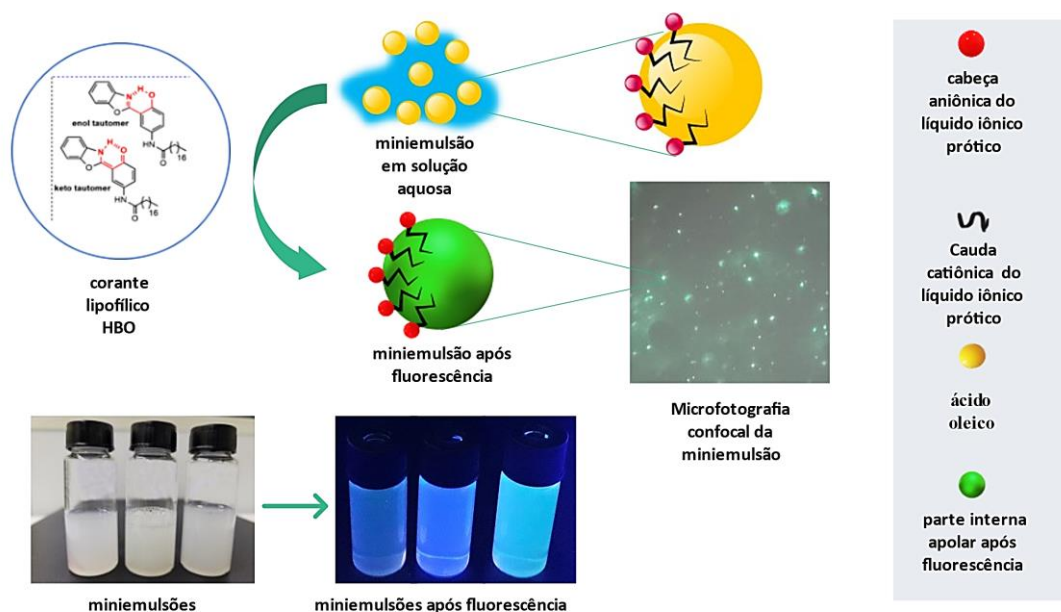


Figura 11. Representação esquemática demonstrando a formação de miniemulsões fluorescentes utilizando corante HBO.

A diferença no comportamento de fluorescência do corante em miniemulsão com o LIP 2-HDEAMa pode estar associada ao maior potencial zeta desta miniemulsão (-73 ± 2 mV; **Tabela 5**). Como a superfície desta miniemulsão é mais negativa, a ligação de hidrogênio intramolecular do corante necessária para a emissão do ESIPT é quebrada para dar lugar às interações intermoleculares de hidrogênio.

5.3.3. Microscopia Óptica e Confocal

O corante fluoróforo 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol (HBO) foi utilizado para que ao se inserir na parte lipídica das partículas das miniemulsões revelasse se estas estão realmente no núcleo e estão sem contato com a água circundante. O corante HBO tem cadeias alquílicas mais longas e é mais parecido com a estrutura lipídica e as interações intermoleculares de van der Waals são favorecidas, mantendo os corantes dentro do emaranhado de cadeias alquílicas.

A microscopia óptica revelou estruturas esféricas para as miniemulsões dos LIPs com ácido oleico. Na **Figura 12-a, b e c** pode-se observar uma menor dispersão de diâmetro hidrodinâmico das partículas, o que concorda com os resultados da **Tabela 5**. Na **Figura 12-d** observa-se que as miniemulsões preparadas sem LIPs, somente com ácido oleico em água, apresentaram estruturas amorfas com tendência a formar agregados.

Assim, verificou-se que a adição de LIP na síntese da miniemulsão melhorou sua morfologia e estabilidade.¹³¹

As imagens apresentadas nestes resultados são fotografias de um instante e não conseguem passar a dinâmica do movimento das partículas pelo movimento Browniano que é característico destas. Em vídeos gravados pode-se verificar deslocamentos laterais, e quando se usa como parâmetro a distância das partículas com a lente dos microscópios claramente tem-se um sobe e desce das miniemulsões, tanto para o microscópio óptico, quanto no confocal. Devido a estas diferenças de profundidade as imagens fotográficas podem entregar, em um primeiro momento, ideias errôneas dos diâmetros hidrodinâmicos das partículas.

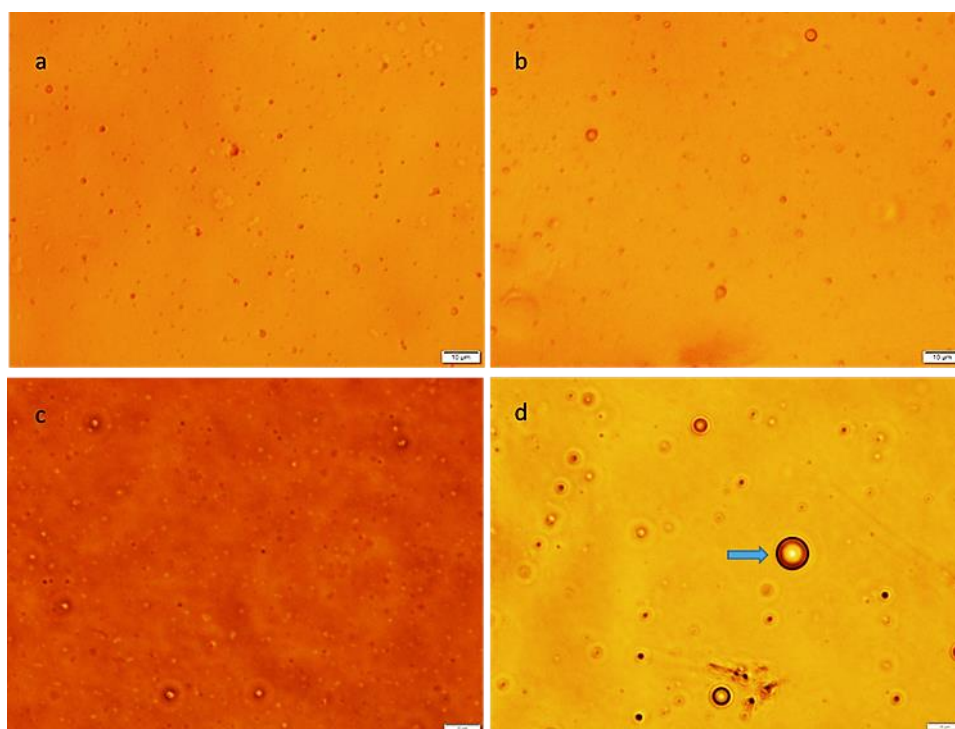


Figura 12. Fotografias de microscopia óptica das miniemulsões com ácido oleico e: (a) 2-HDEALa; (b) 2-HDEAMa; (c) 2-HDEASa; (d) sem LIP

Na **Figura 13** pode-se observar pela Microscopia Confocal utilizando o corante HBO foi efetiva em mostrar que todas as miniemulsões apresentaram formato esférico cujos tamanhos estavam na faixa dos diâmetros medidos por espalhamento dinâmico de luz.

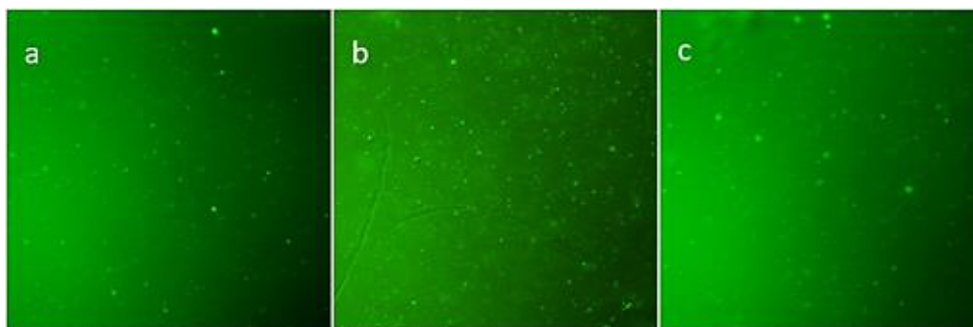


Figura 13. Microfotografias Confocal de amostras de miniemulsões: (a) 2-HDEALa, (b) 2-HDEAMa, (c) 2-HDEASa.

5.3.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

As características químicas das miniemulsões foram avaliadas por infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros observados nas **Figura 14 (b)-(d)** obtidos para cada solução de LIP com ácido oleico e clioquinol não se mostraram conclusivo, tendo-se grande influência da água nos espectros.

A **Figura 14** pode ser usada para confirmar as estruturas do ácido oleico e o fármaco clioquinol. Na **Figura 14(a)** são verificadas bandas na região de 1635 cm^{-1} (estiramento =C-H), pico muito amplo de 3410 até 2350 cm^{-1} (estiramento O-H do ácido carboxílico) e pico agudo em 1708 cm^{-1} característica do estiramento simétrico da ligação carbonila (vibração C=O) de ácidos graxos, os quais confirmam que trabalhamos com o ácido oleico. Há ainda bandas em 2922 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} (C-H deformação angular), 1395 cm^{-1} (C-H deformação).

Picos característicos do clioquinol também podem ser visualizados na **Figura 14(a)** 3140 e 1205 cm^{-1} (O-H fenólico), 3060 cm^{-1} (C-H aromático), 1610 e 1580 cm^{-1} (C=C e C=N aromáticos), 1265 cm^{-1} (C-O), 960 cm^{-1} (alongamento C-Cl aromático) e 785 cm^{-1} (3 H adjacentes em anel aromático). Há também picos em 1750 , 1495 , 1370 , 1330 , 1200 , 875 , 805 , 729 , 650 e 565 cm^{-1} .

Estes picos não são visíveis nos espectros que representam as misturas contendo as miniemulsões com cada LIP e ácido oleico. Contando com as outras técnicas analíticas utilizadas neste trabalho, pode-se sugerir que o não aparecimento dos picos do fármaco pode indicar que o mesmo esteja fortemente encapsulado, ou como dito acima, os mesmos não aparecem por estar em concentração muito reduzida perante a água da solução.

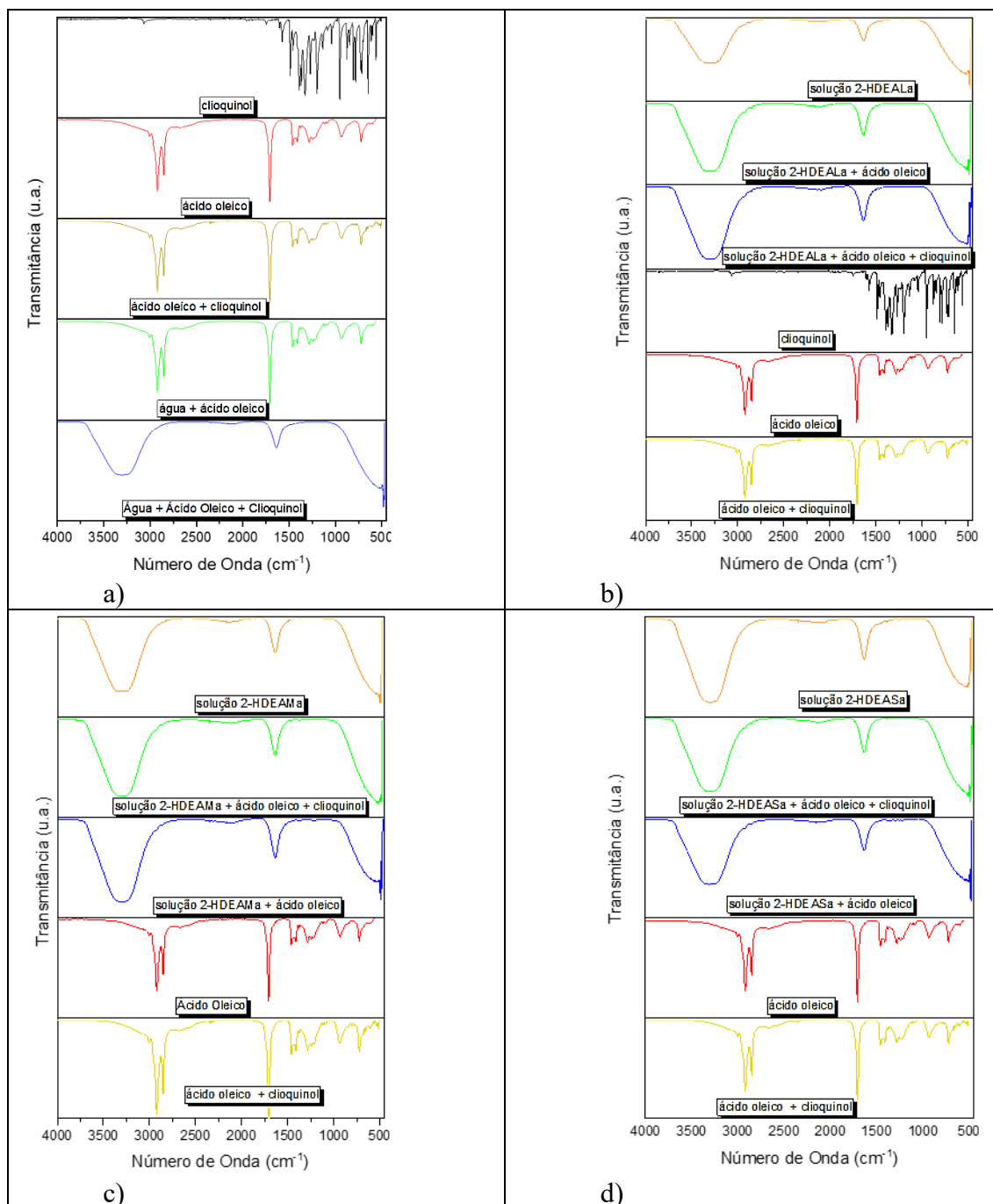


Figura 14. Comparação dos espectros do FTIR de (a) substâncias controle; misturas com os LIPs: (b) 2-HDEALa; (c) 2-HDEAMa; (d) 2-HDEASa.

Para as soluções dos LIPs, na literatura, quanto ao espectro FT-IR¹⁵⁴, os mesmos apresentam uma banda larga na faixa de 3700-2400 cm^{-1} para uma estrutura de amônio (NH_2^+). A vibração de alongamento (O-H) 3700-3000 cm^{-1} está incorporada nesta banda. A banda larga centrada em 1600 cm^{-1} é uma banda combinada de estiramento de carbonila e vibrações de curvatura do plano (N-H).

Utilizando do software on-line SpectraBase da Wiley, foi possível montar espectros de comparação dos resultados das amostras deste trabalho com algumas bibliotecas da Wiley.

Os espectros a seguir (**Figura 15** a **Figura 21**) demonstram grandes aproximações das amostras reagentes deste trabalho com as da biblioteca e, também aparecem outros espectros com variações das montagens de comparação das interações das miniemulsões

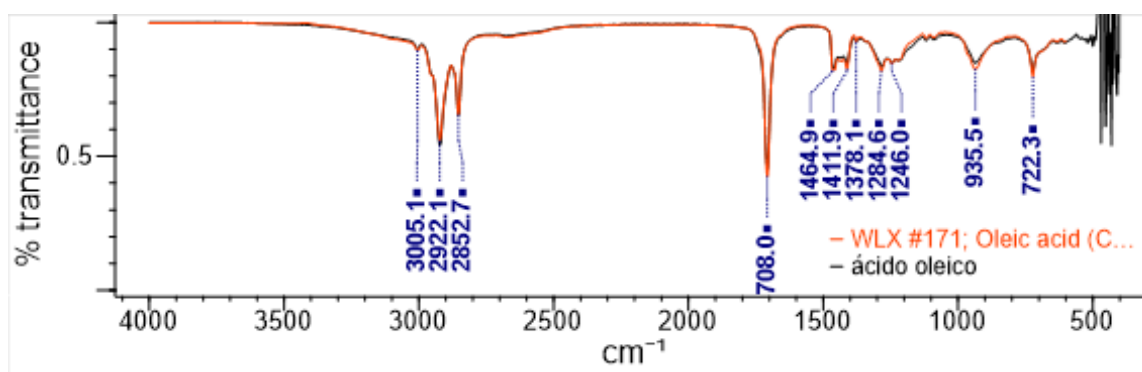


Figura 15. Comparação dos espectros do FTIR do ácido oleico utilizado neste trabalho com o apresentado na biblioteca Wiley.

Na **Figura 15** pode-se observar que o espectro do ácido oleico desta Tese coincide em muito com o espectro do ácido oleico WLX #171 da biblioteca Wiley.

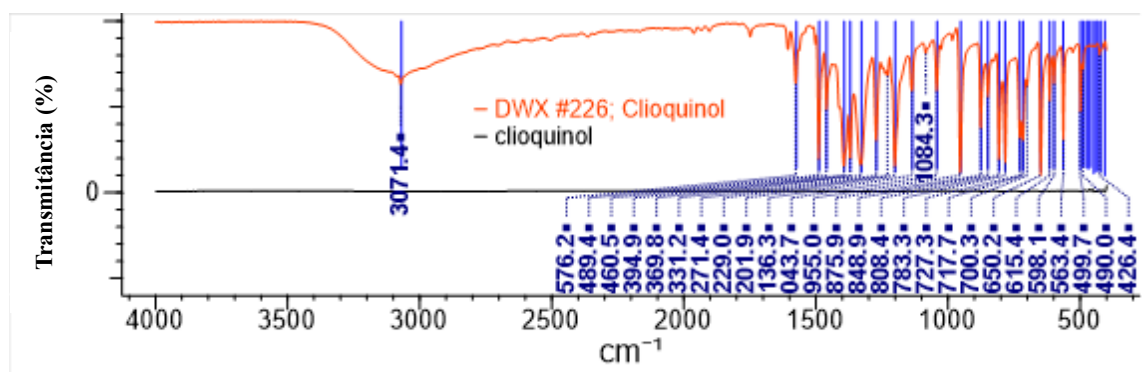


Figura 16. Comparação dos espectros do FTIR do clioquinol utilizado neste trabalho com o apresentado na biblioteca Wiley.

Na **Figura 16** pode-se observar que o espectro do clioquinol desta Tese coincide em muito com o espectro do clioquinol DWX #226 da biblioteca Wiley.

Estas semelhanças, somadas aos resultados de outras técnicas, como RMN, resulta em afirmar que aquelas amostras são de ácido oleico e clioquinol.

Na **Figura 17** é visível que o espectro de uma amostra do LIP 2-HDEALa em concentração 20 mM é totalmente influenciado pela água, tal é a identificação que os picos demonstram. A baixa concentração do LIP perante a quantidade de água presente acaba por esconder qualquer possibilidade dos seus picos se sobreporem a amplitude dos picos que identificam a água.

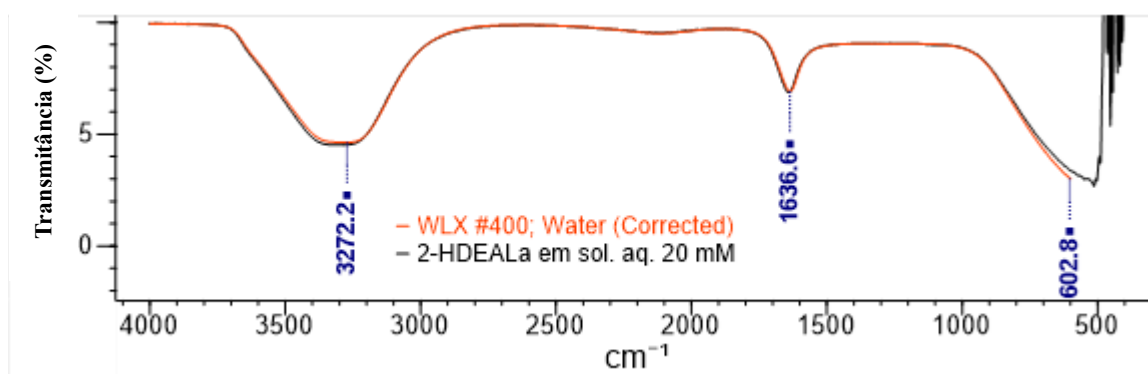


Figura 17. Comparação dos espectros do FTIR do LIP 2-HDEALa em solução aquosa 20 mM com amostra de água pura da biblioteca Wiley.

Na **Figura 18** é visível que o espectro de uma amostra do LIP 2-HDEAMa em concentração 50 mM também é comandado pela água, visto a baixa concentração do LIP este não consegue sobrepor seus picos.

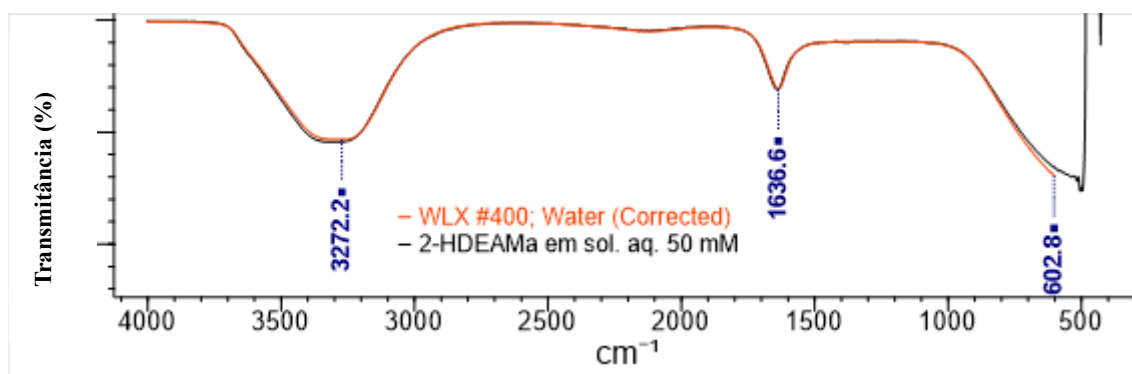


Figura 18. Comparação dos espectros do FTIR do LIP 2-HDEAMa em solução aquosa 50 mM com amostra de água pura da biblioteca Wiley.

Na **Figura 19** é visível que o espectro de uma amostra do LIP 2-HDEASa em concentração 50 mM também é comandado pela água, visto a baixa concentração do LIP este não consegue sobrepor seus picos perante os das amplitudes da água.

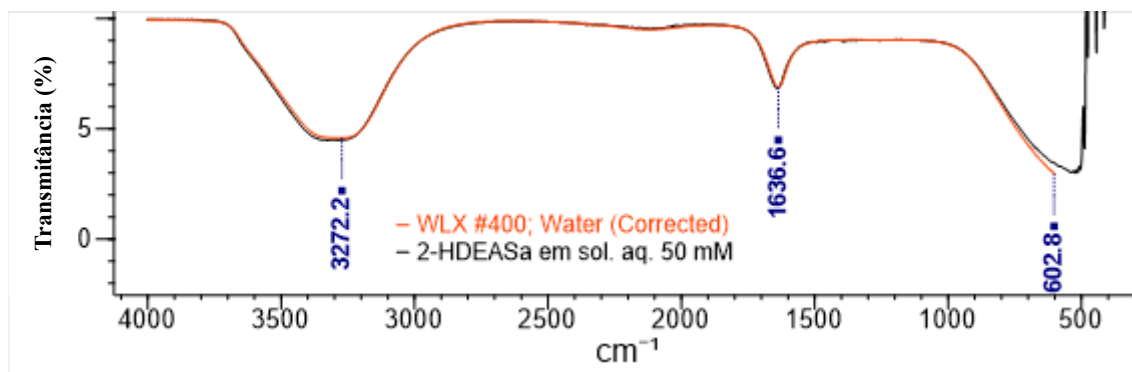


Figura 19. Comparação dos espectros do FTIR do LIP 2-HDEASa em solução aquosa 50 mM com amostra de água pura da biblioteca Wiley.

O espectrograma da **Figura 20** foi construído para demonstrar que qualquer que seja o LIP estudado nesta pesquisa, 2-HDEALa, 2-HDEAMa, ou 2-HDEASa, não é visível uma diferença de comportamento conforme muda o seu ânion, pois a predominância da água na amostra supera a apresentação de picos dos LIPs.

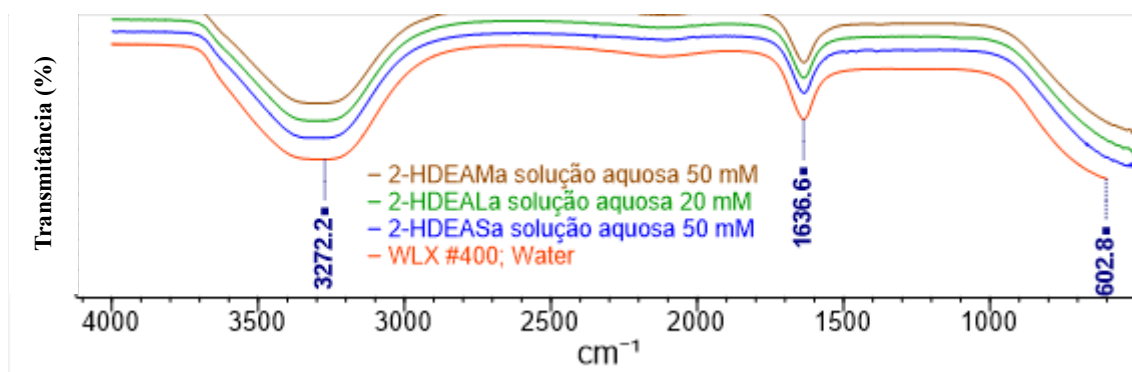


Figura 20. Comparação dos espectros do FTIR dos 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa em solução aquosa comparados com o espectro IR-ATR da água pura da biblioteca Wiley.

O espectrograma da **Figura 21** foi formatado para demonstrar que o espectro da miniemulsão do LIP 2-HDEALa 20 mM, já com o clioquinol dissolvido no ácido oleico (linha azul) não apresenta algum pico de interação nesta amostra referente as amostras de clioquinol (linha roxa) e ácido oleico (linha vermelha) em separados. Os espectros estão deslocados para facilitar a visualização das curvas individualmente. (versão modificada das representações da **Figura 14**).

Presume-se que estes reagentes não conseguiram influenciar no espectro da amostra completa (La + ác. Ole. + clioq.) devido às suas baixas concentrações.

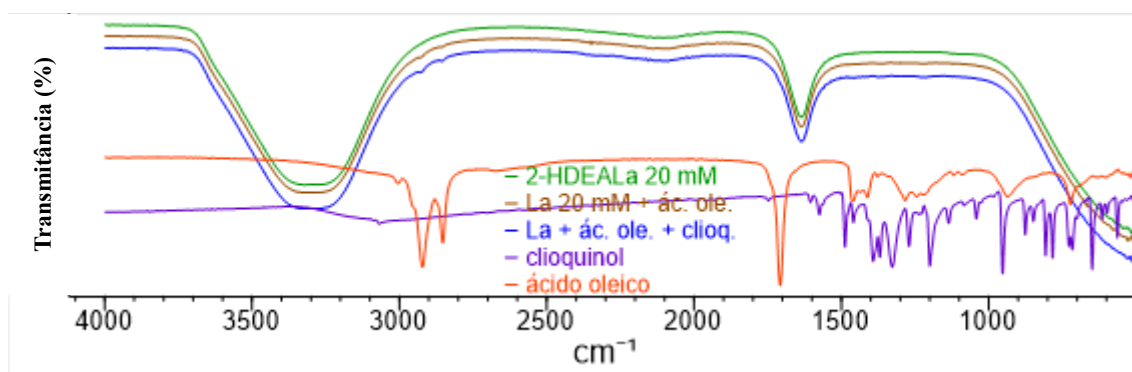


Figura 21. Comparação dos espectros do FTIR do 2-HDEALa em solução aquosa comparados com os espectros do clioquinol e do ácido oleico. Linha azul: (La + ác. ole. + clioq.) miniemulsão do LIP 2-HDEALa 20 mM contendo clioquinol. Linha marrom: (La 20 mM + ác. ole.) miniemulsão do LIP 2-HDEALa.

5.3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC

É de suma importância o conhecimento das interações térmicas de amostras que ao mesmo tempo são utilizadas na síntese de nanomateriais e tem objetivo fim uma aplicação biológica.¹⁵⁵

Em geral, os líquidos iônicos são muito difíceis de cristalizar, muitas vezes permanecendo na forma de líquidos metaestáveis.¹⁵⁶ Ao realizar as análises de DSC em um líquido iônico prótico, almejou-se obter informações detalhadas sobre suas propriedades térmicas, transições de fase e estabilidade térmica, o que é fundamental para entender seu desempenho e aplicabilidade em diferentes condições. Picos de degradação térmica ou decomposição podem indicar limitações de temperatura para a aplicação prática dos líquidos iônicos próticos.

Para entender a faixa de temperatura em que o líquido iônico prótico pode ser usado efetivamente estudou-se a temperatura de transição de fase. A capacidade calorífica, que pode ser entendida como a quantidade de energia envolvida em uma

determinada transição de fase é possível calcular pelas áreas sob os picos das transições de fase.

É importante salientar que o uso da técnica de DSC em gráficos de comparação, torna-se com menos efeito positivo na elucidação dos fenômenos de interação. Estes fenômenos podem estar sobre efeito como Forças van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, ligações de hidrogênio, hidratação, entropia conformacional e o ambiente físico (como pH e força iônica) das soluções dos LIPs e suas misturas.

Na **Figura 22** que representa o DSC de fusão da amostra do LIP 2-HDEALa puro pode-se verificar uma Tg em $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual confirma sua estrutura química, pois pela literatura encontrou-se uma referência para $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹⁵⁷ O precursor ácido láctico tem temperatura de fusão em $53\text{ }^{\circ}\text{C}$.

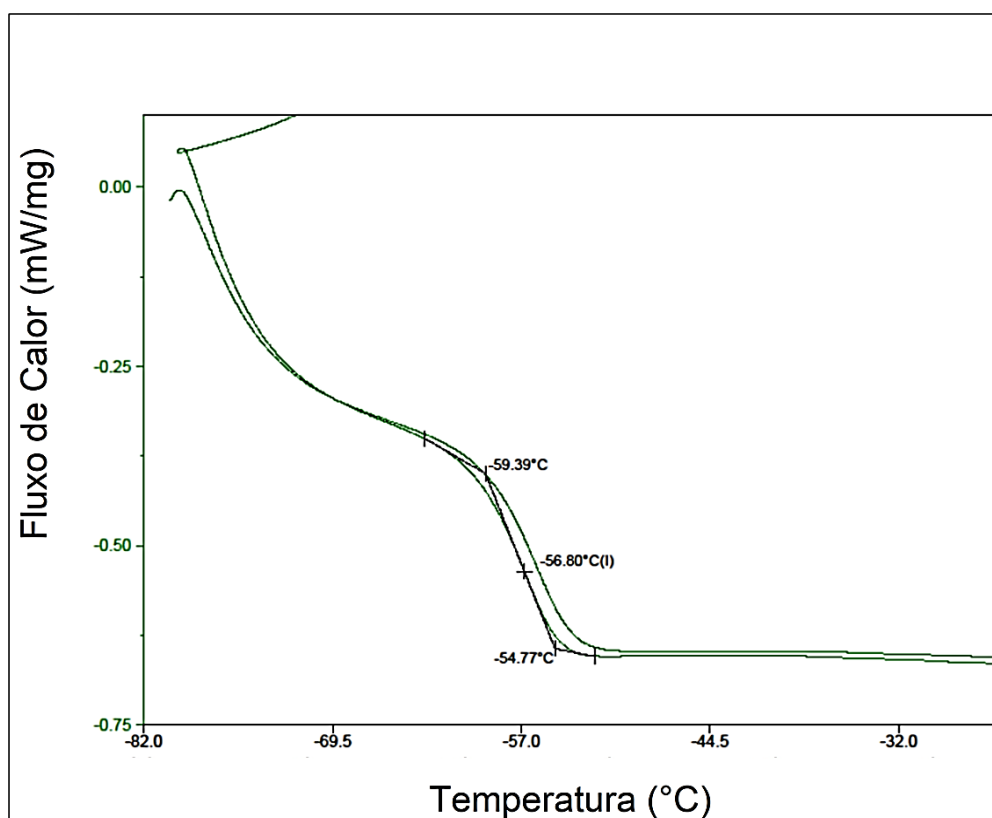


Figura 22. Termograma DSC de fusão da amostra do LIP 2-HDEALa puro.

Nas **Figura 23** e na **Figura 24** que representam os DSC de fusão das amostras dos LIPs 2-HDEAMa puro e 2-HDEASa puro, consecutivamente, pode-se verificar Tg de $-49,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o 2-HDEAMa puro e $-60,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o 2-HDEASa puro.

As amostras testadas não apresentaram temperaturas de transição vítrea (Tg's) bem definidas. A Tg transmite uma indicação sobre a coesão das moléculas da amostra.

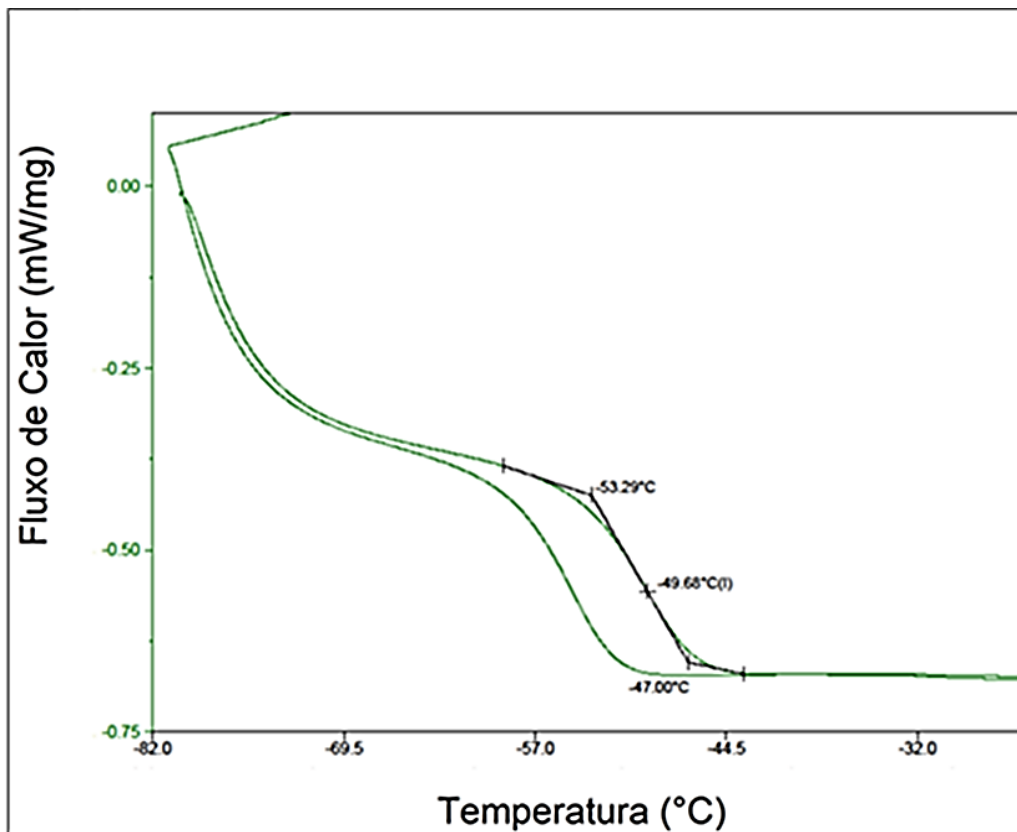


Figura 23. Termograma DSC de fusão da amostra do LIP 2-HDEAMa puro.

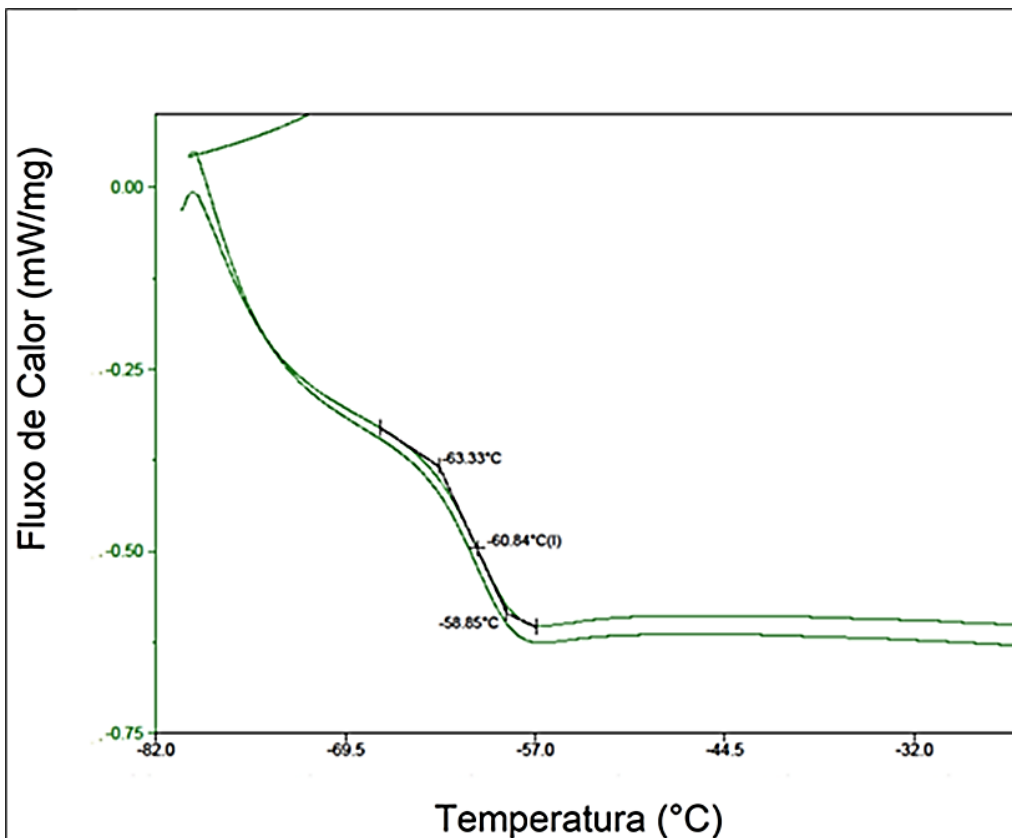


Figura 24. Termograma DSC de fusão da amostra do LIP 2-HDEASa puro.

Conforme pode-se verificar nos termogramas das **Figuras 22 a 24**, convém manter a estabilidade das propriedades das miniemulsões restringindo o seu uso a temperaturas de operação abaixo de 0 °C.¹⁵⁸

Entretanto, na faixa de temperatura do corpo humano ou de um animal, cerca de 35 °C, não aconteceria nenhum tipo de alteração termodinâmica ou estrutural das miniemulsões, facilitando o uso das mesmas pois as propriedades conhecidas das miniemulsões pelos resultados ensaiados são mantidas.

Na **Figura 25** tem-se representados os resultados da análise DSC de Fusão (T_m) de uma amostra do ácido oleico puro e três amostras do grupo do LIP 2-HDEALa (uma em solução de 20 mM, uma mistura da solução com o ácido oleico; e outra com a adição do clioquinol à mistura anterior).

A partir do pico de fusão é possível verificar sensível diferença nas áreas dos picos, o que pode representar diferentes cristalinidades. O ponto de fusão da amostra completa (linha verde) é diferente dos demais indicando que ocorreu alguma interação do clioquinol com o LIP ou o ácido oleico.

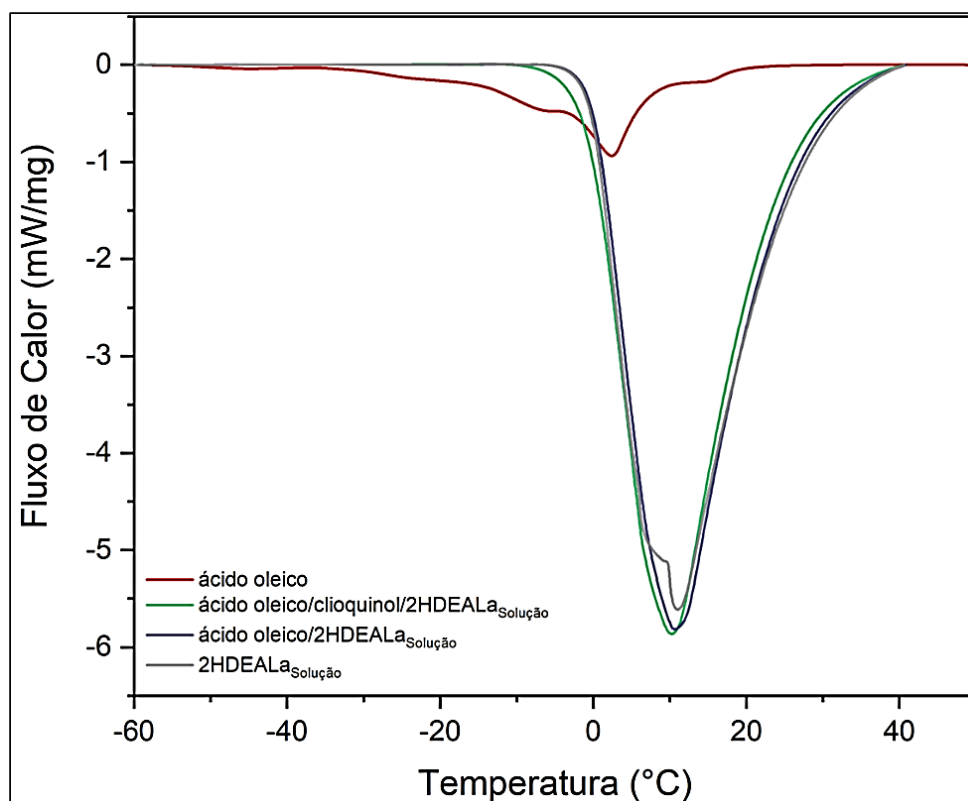


Figura 25. Comparação dos Termogramas DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEALa (em solução de 20 mM, em mistura da solução com o ácido oleico, com a adição do clioquinol a mistura anterior, e uma amostra do ácido oleico puro).

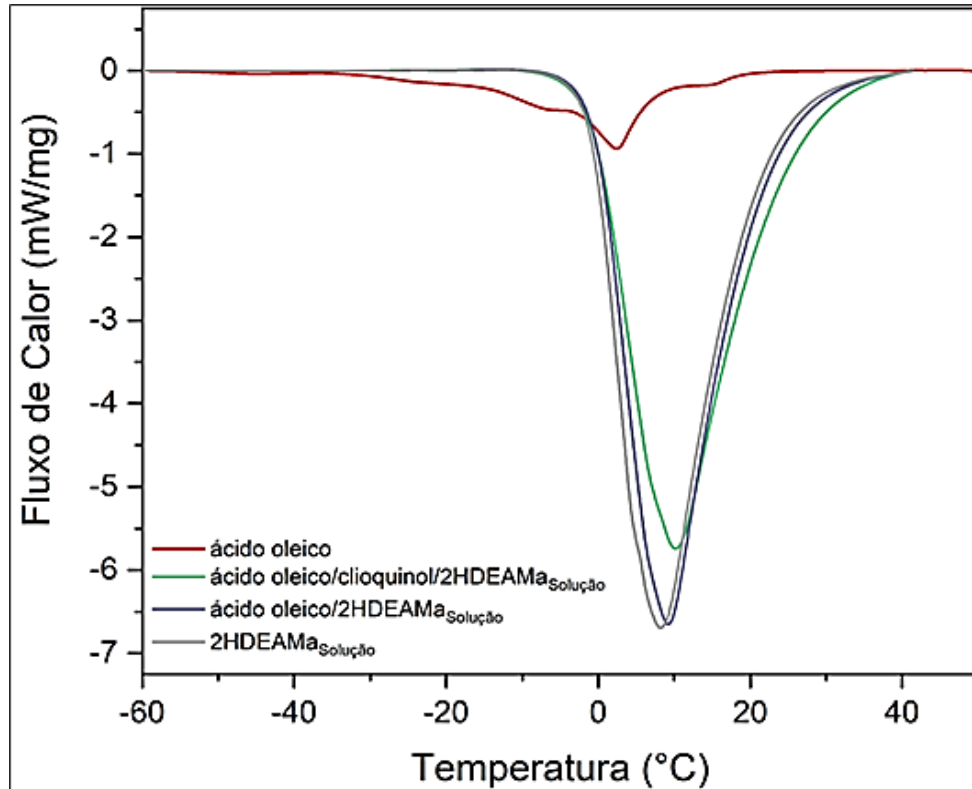


Figura 26. Comparação dos Termogramas DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEAMa (em solução de 50 mM, em mistura da solução com o ácido oleico, com a adição do cloquinol a mistura anterior, e uma amostra do ácido oleico puro).

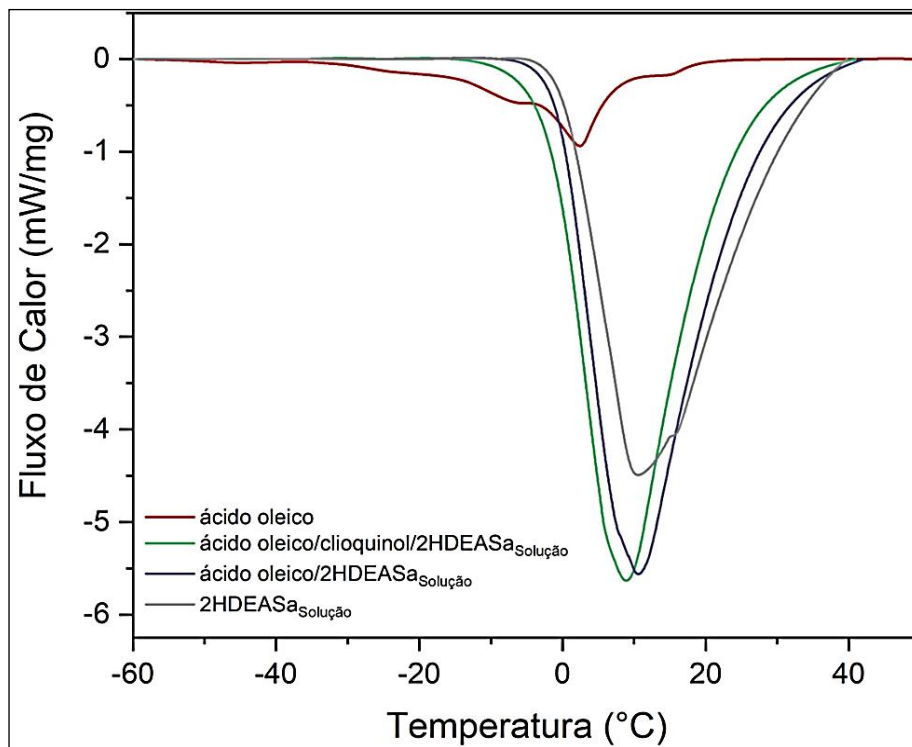


Figura 27. Comparação dos Termogramas DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEASa (em solução de 50 mM, em mistura da solução com o ácido oleico, com a adição do cloquinol a mistura anterior, e uma amostra do ácido oleico puro).

A **Figura 26** representa o DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEAMA a 50 mM onde também é possível ver o deslocamento do pico da T_m da mistura completa.

Na **Figura 27** que representa o DSC de fusão do grupo de amostras do LIP 2-HDEASA a 50 mM é possível verificar um deslocamento bem importante da mistura completa. Isto pode ser devido a estrutura química do íon do LIP, o salicilato. O Anel aromático do ânion é atrativo para um fármaco com anéis aromáticos, como o clioquinol.

Em se tratando de temperatura de cristalização, em emulsões estáveis é esperado que apareça somente um pico para a mistura.

Misturas instáveis apresentam um pico em separado para o óleo emulsificado e outro para a parte não emulsificada.

Na **Figura 28** que representa o DSC de cristalização do grupo de amostras do LIP 2-HDEALA 20 mM pode-se verificar um deslocamento entre os termogramas de maior intensidade.

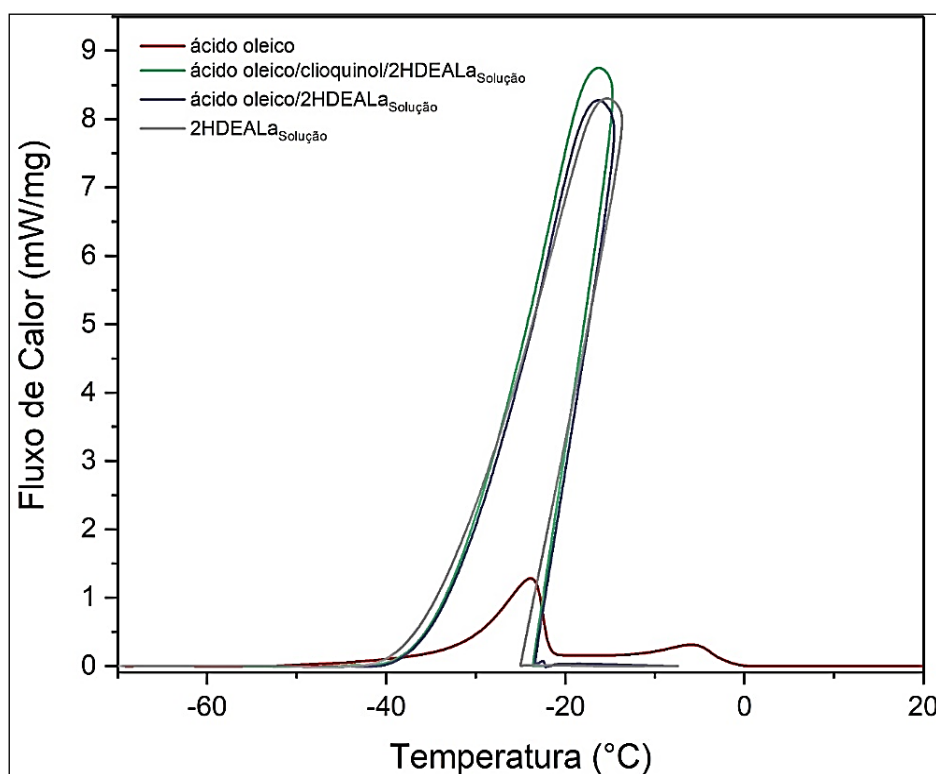


Figura 28. Comparação dos Termogramas DSC de cristalização do grupo de amostras do LIP 2-HDEALA 20 mM.

O ponto de cristalização da amostra completa (linha verde) é diferente dos demais indicando que ocorreu alguma interação do fármaco com o LIP ou o ácido oleico. Pode-se propor que ocorreram interações, pois ao se adicionar o clioquinol, mesmo sendo o

elemento em proporção muito inferior aos demais, comparando áreas sob as curvas, este foi capaz de modificar o resultado da amostra da solução que continha somente o LIP.

Cada termograma produziu durante a corrida térmica somente um pico com a solução aquosa do LIP, um pico quando a amostra continha o LIP misturado com o ácido oleico, e um pico quando a amostra continha ácido oleico, clioquinol e o LIP.

Conforme explicação anterior, onde uma amostra que resulta durante a corrida térmica em somente um pico para um termograma de cristalização, seu resultado é indicativo de uma mistura estável entre seus componentes, o que está em concordância com os resultados de potencial zeta (PZ) que indicavam bons resultados de estabilidade para a amostra.

Na **Figura 29** e **Figura 30** que representa o DSC de cristalização do grupo de amostras dos LIPs 2-HDEAMa 50 mM e 2-HDEASa 50 mM, respectivamente, o comportamento dos resultados foram semelhantes aos do grupo de amostras que continham o LIP 2-HDEALa 20 mM.

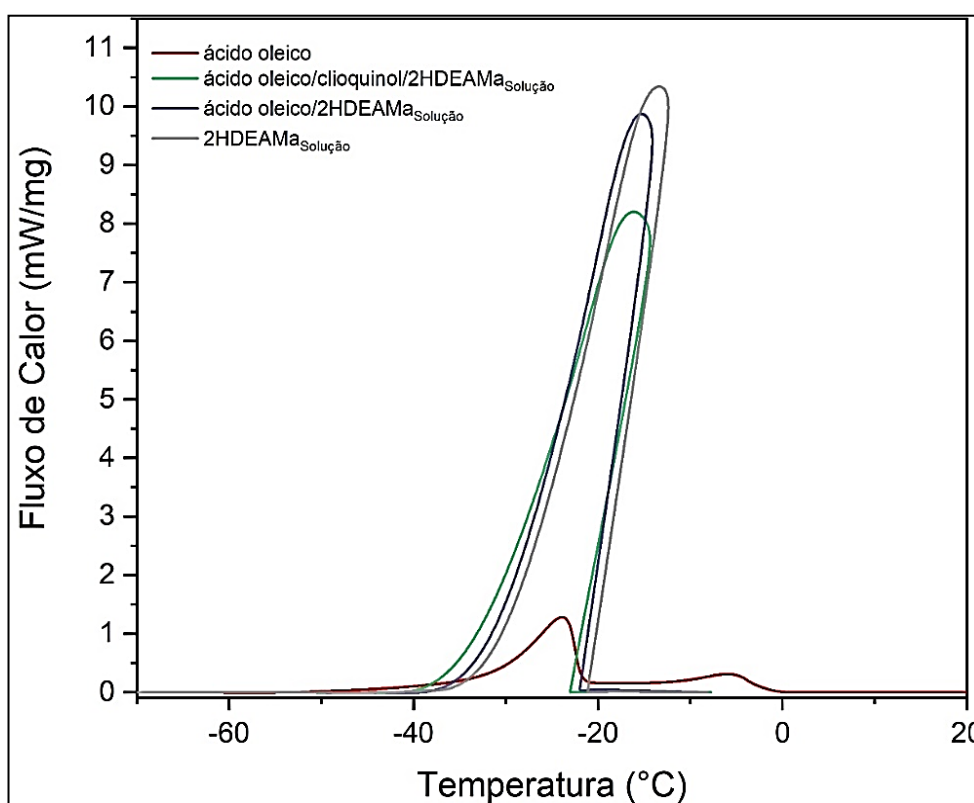


Figura 29. Comparação dos Termogramas DSC de cristalização do grupo de amostras do LIP 2-HDEAMa 50 mM.

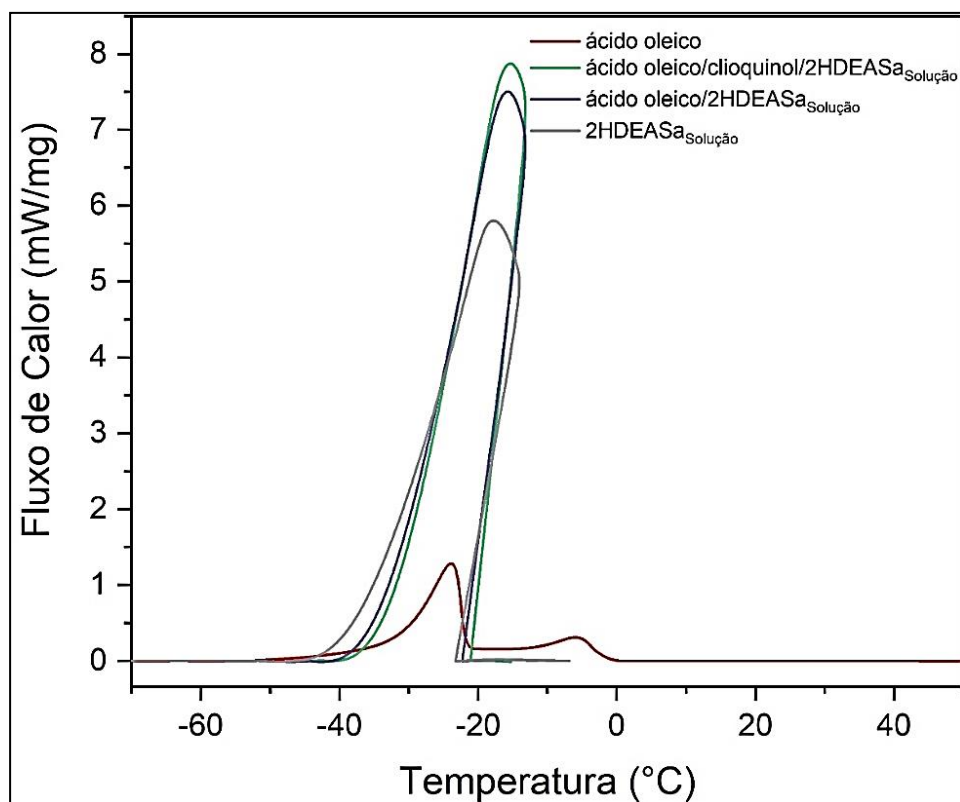


Figura 30. Comparação dos Termogramas DSC de cristalização do grupo de amostras do LIP 2-HDEASa 50 mM.

Na **Tabela 7** na **Tabela 8** estão demonstrados o Calor de Fusão e o Calor de Cristalização obtidos das análises gráficas dos termogramas das **Figuras 22 a 30**.

Exceto pelo Calor de Fusão da amostra de miniemulsão com o LIP 2-HDEASa, as demais amostras apresentaram um comportamento de maiores calores para a fusão do grupo de amostras contendo o LIP 2-HDEALa, depois o 2-HDEAMa, e por fim, em calores mais baixos o grupo de amostras do LIP 2-HDEASa ($\Delta H_f La > Ma > Sa$).

Com estes resultados da **Tabela 7**, pode-se interpretar que o grupo de amostras com o ânion lactato tem um processo de fusão mais tarde que os demais em uma elevação da temperatura das amostras. Da mesma forma que, quando a temperatura diminuir, os componentes com calores de fusão mais baixos, do grupo do íon salicilato, podem cristalizar primeiro. Os ingredientes com calores de fusão mais altos absorverão mais calor durante a fusão e liberarão mais calor durante a cristalização.

Quando analisados os resultados por colunas, nas amostras com os íons maleato e salicilato, pode-se verificar calores diferentes entre quando já existe o cloquinol e quando ainda não foi adicionado as miniemulsões. Isto pode ser um indicativo de que não há uma homogeneidade perfeita nestas misturas, diferente do que é visto no grupo de amostras do íon lactato.

Tabela 7. Calores de Fusão das amostras de 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa com suas soluções aquosas, miniemulsões sem e com clioquinol

Calor de Fusão (J/g)	2-HDEALa 20 mM	2-HDEAMa 50 mM	2-HDEASa 50 mM
Solução aquosa	301,8	286,9	283,4
Miniemulsão sem clioquinol	292,5	287,9	296,9
Miniemulsão com clioquinol	292,6	277,2	266,9

Na **Tabela 8** estes calores de cristalização mais altos para as amostras com o íon lactato confirmam a interpretação anterior. Exceção para a amostra da solução aquosa do íon maleato. Nesta entende-se que uma nova corrida de análises com rampas diferentes de temperatura seria o ideal para uma interpretação mais correta e remoção de qualquer dúvida sobre a manutenção deste resultado.

Ainda sobre a linha de amostras contendo as miniemulsões sem o clioquinol, a pequena diferença dos resultados pode ser devida exclusivamente aos pontos que o pesquisador escolheu nos gráficos para o software calcular os calores gerados nos processos que ocorreram. Um pequeno erro é normalmente reconhecido pela escolha manual que se deve fazer aos pontos que são tangentes as curvas e delimitam os cálculos do software.

Tabela 8. Calor de Cristalização das amostras de 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa com suas soluções aquosas, miniemulsões sem e com clioquinol.

Calor de Cristalização (J/g)	2-HDEALa 20 mM	2-HDEAMa 50 mM	2-HDEASa 50 mM
Solução aquosa	226,4	232,2	223,1
Miniemulsão sem clioquinol	225,7	226,4	227,5
Miniemulsão com clioquinol	229,9	223,7	225,9

5.3.6. Análise Termogravimétrica – TGA

Cuidados com a temperatura máxima de trabalho na preparação das amostras é essencial para os LIPs. O aquecimento acima de sua primeira temperatura de decomposição (perda de massa) promoverá a transferência prótons de volta para a amina devido a possibilidade de evaporação do componente ácido volátil, resultando em uma mistura de reagentes separados: líquido iônico e amina não reagida.^{132,158}

Analisando o termograma, a análise de TGA (**Figura 31**) mostrou a curva de degradação da amostra do LIP 2-HDEALa puro. Um leve decaimento aconteceu provavelmente por evaporação da água em 125 °C, e o decaimento forte por degradação a 271,9 °C.

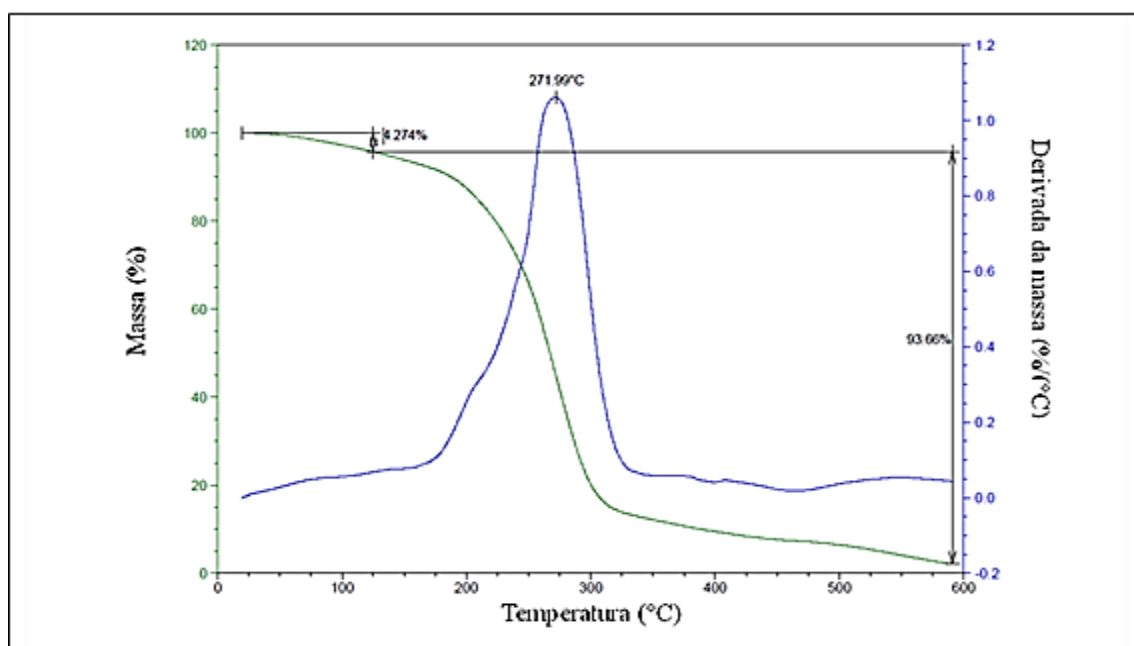


Figura 31. Termograma TGA-DTG do LIP 2-HDEALa (puro).

A análise de TGA do LIP 2-HDEAMa puro (**Figura 32**) mostrou a curva de degradação da amostra com as seguintes temperaturas, 92,7; 119,9; 199,3; 280,8; 386,9 e 577 °C, onde ocorreu alguma perda de massa. Nesta última, provavelmente ocorreu a calcinação total da amostra. Nesta molécula, as interações das duplas ligações são maiores, portanto, mais difícil de quebrar com a elevação da temperatura.

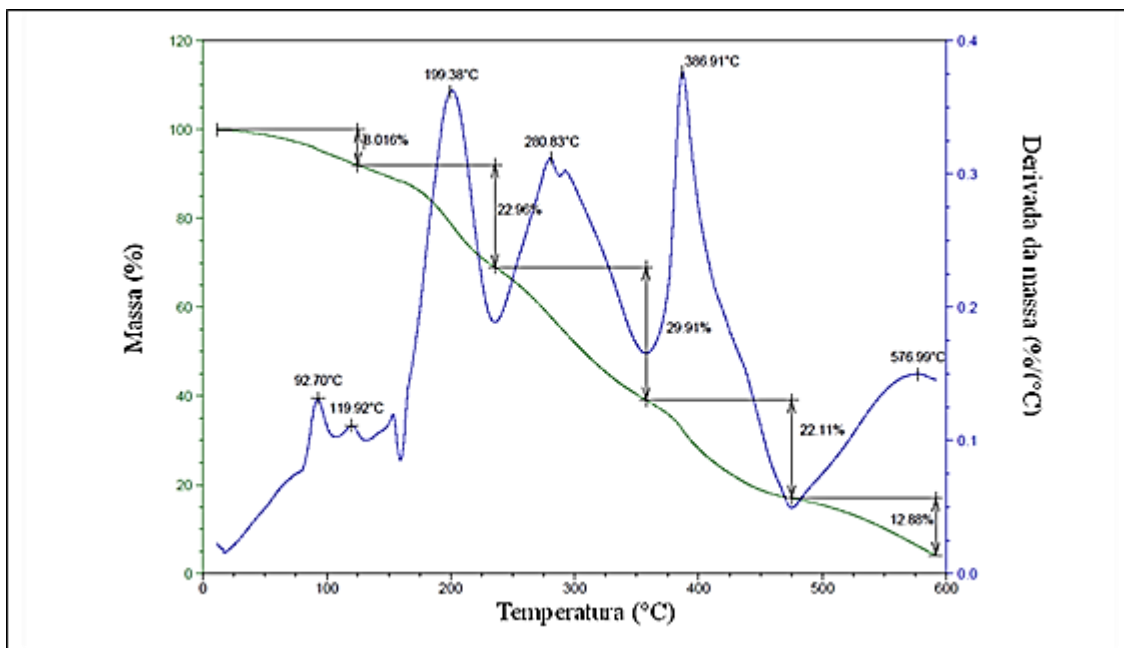


Figura 32. Termograma TGA-DTG do LIP 2-HDEAMa (puro).

Na Figura 33, Figura 34 e Figura 35, consecutivamente, tem-se as temperaturas de degradação das amostras do LIP 2-HDEASa puro (103,7; 246,6; 306,5 e 549 °C), ácido oleico (281,6; 377,7; 455,7 e 538,3 °C), e para o clioquinol (216,7; 285,0 e 508,6 °C).

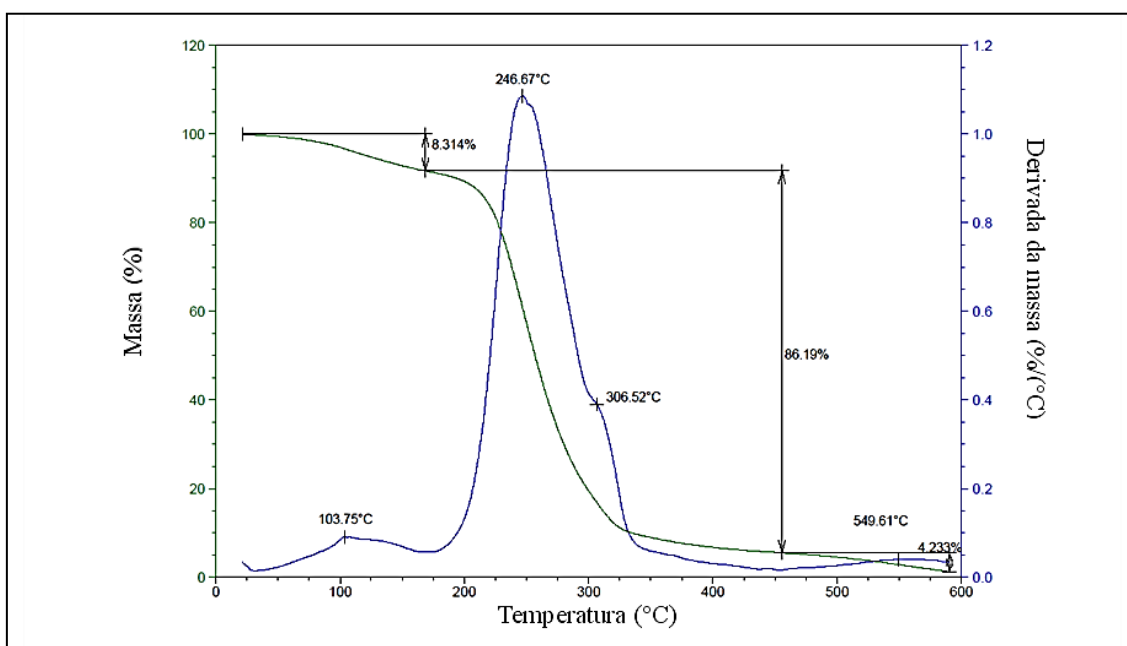


Figura 33. Termograma TGA-DTG do LIP 2-HDEASa (puro).

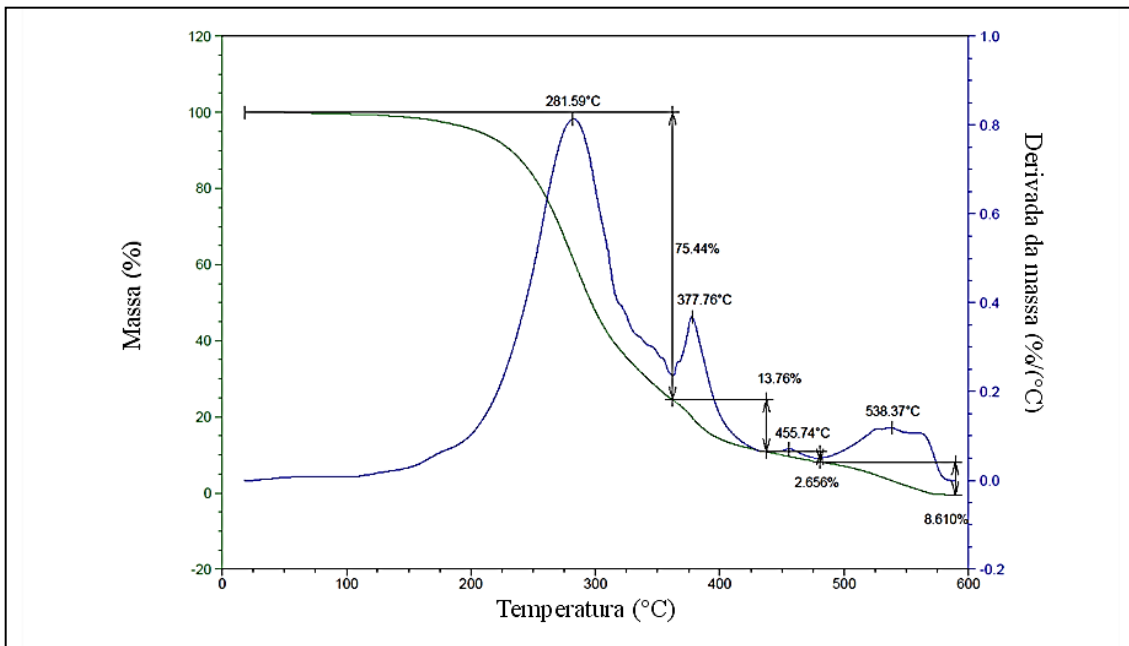


Figura 34. Termograma TGA-DTG do ácido oleico (puro).

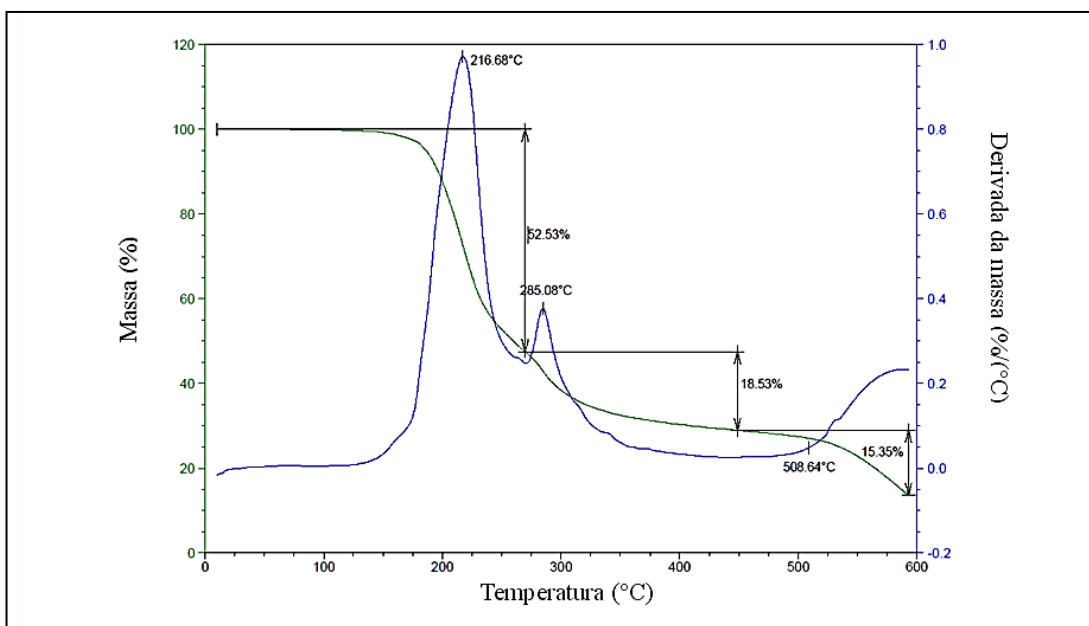


Figura 35. Termograma TGA-DTG do clioquinol (puro).

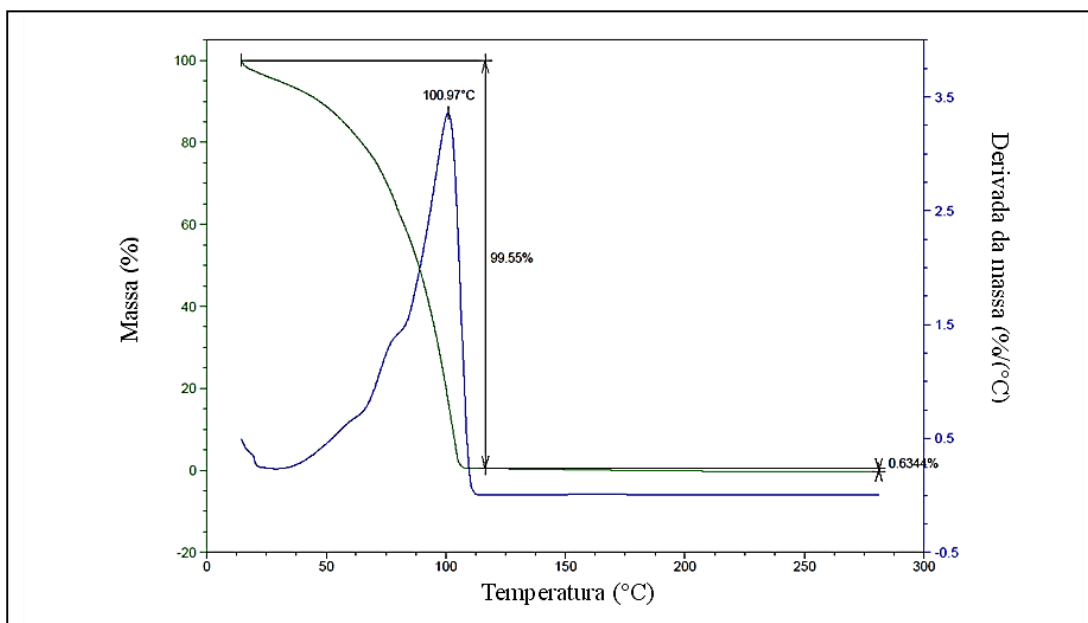


Figura 36. Termograma TGA-DTG: miniemulsão contendo ácido oleico, clioquinol e LIP 2-HDEALa 20 mM.

Nas **Figuras 36 a 38**, tem-se os termogramas das miniemulsões contendo os LIPs 2-HDEALa 20 mM, 2-HDEAMa 50 mM e 2-HDEASa 50 mM, respectivamente, com clioquinol. Nestes é possível verificar que o fenômeno de evaporação da água, elemento preponderante nas formulações é o mandatário e acontece com perda de massa superior a 96 % próximo da temperatura de evaporação da água.

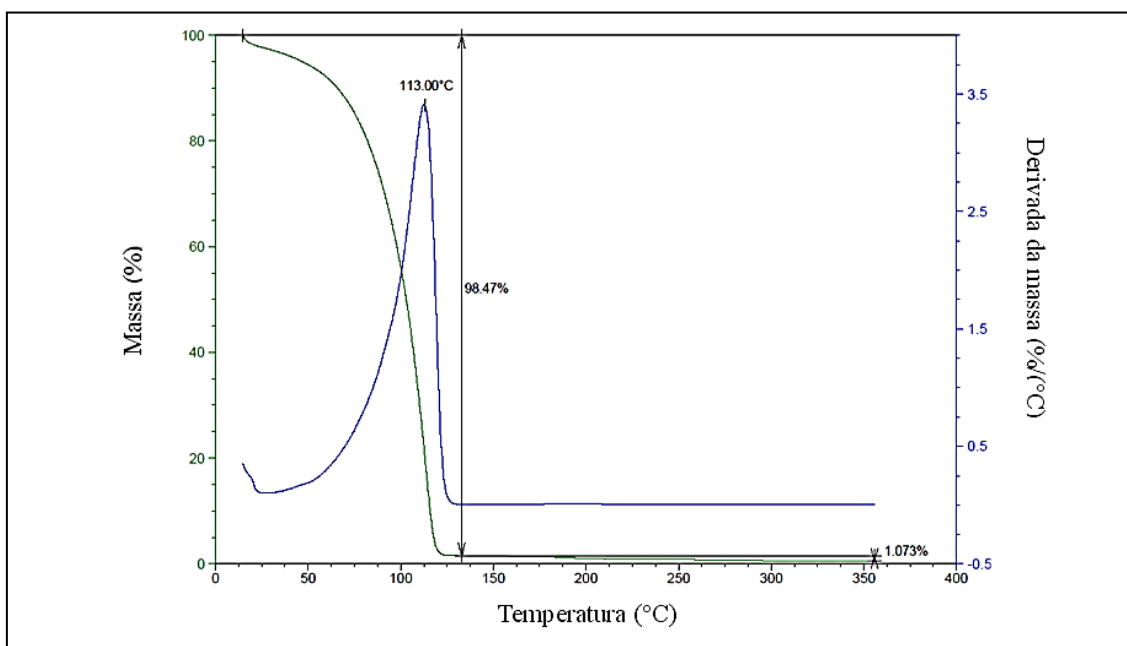


Figura 37. TGA-DTG: miniemulsão ácido oleico, clioquinol e LIP 2-HDEAMa 50 mM.

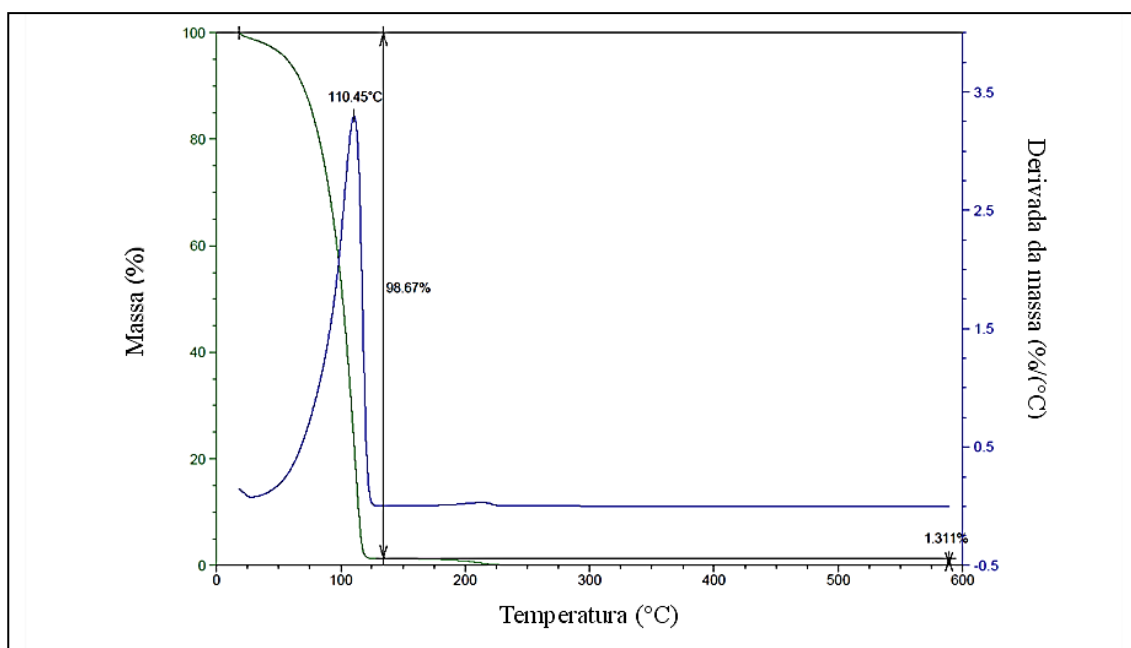


Figura 38. Termograma TGA-DTG: miniemulsão contendo ácido oleico, clioquinol e LIP 2-HDEASa 50 mM.

Na **Tabela 9** encontram-se os resultados de Temperatura de degradação dos LIPs puros, em solução aquosa para as suas concentrações de 20, 50 e 50 mM, consecutivamente para o 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa, fechando com formulações das miniemulsões com e sem o clioquinol para cada LIP.

Tabela 9. TGA – DTGs: Termogravimetria Derivada (%/°C) dos LIPs e suas miniemulsões Temperaturas de degradação (°C) para perdas de massa acima de 86 %

Amostras	2-HDEALa	2-HDEAMa	2-HDEASa
LIP puro	271,99	*	246,67
LIP solução	103,87 ^a	102,05 ^b	109,29 ^c
ME _{xx} 10OA ^d	110,36	112,65	101,75
ME _{xx} 10OAc ^e	100,97	113,00	110,45

^a(a) 2-HDEALa 20 mM, (b) 2-HDEAMa 50 mM, (c) 2-HDEASa 50 Mm. (d) ME_{xx}10OA: miniemulsão (ME) produto da mistura de cada solução de LIP nas concentrações (a), (b), ou (c) com o ácido oleico a 10 mM. (e) ME_{xx}10OAc miniemulsão produto de (d) com clioquinol incorporado. (xx) conforme concentração de cada LIP em (a), (b) ou (c) *2-HDEAMa puro Maior degradação aconteceu em 280,83 °C com perda de massa de 29,91 %.

Fica perceptível pela **Tabela 9** que quando as amostras envolvem o uso de uma solução aquosa, proporcionalmente a variação da temperatura de degradação é pouco apreciável.

O LIP 2-HDEALa puro demonstrou um comportamento de perda de massa muito parecido com o de seu precursor, o ácido láctico. A amostra analisada não apresenta um platô. Tão logo inicia o seu aquecimento há perda de umidade, e na faixa próxima de 185 °C tem-se a maior perda de massa. Conforme literatura, os processos que ocorrem são desidratação, bem como reações de redução e descarboxilação.¹⁵⁹

Diferente dos outros LIPs que tiveram somente 2 e 3 temperaturas de degradação (LIP 2-HDEALa e LIP 2-HDEASa, consecutivamente), para o LIP 2-HDEAMa é perceptível no seu termograma sete temperaturas onde ocorreram perdas de massa. Este resultado sugere uma amostra que recebeu impurezas, pois o normal quando se trata do ácido maleico é ter uma temperatura de degradação terminando em 240 °C.¹⁶⁰

Na temperatura próxima de 246 °C cogita-se que a parte aniônica do 2-HDEASa puro sofreu a degradação para fenol e dióxido de carbono, perdendo cerca de 86 % de sua massa de amostra. Em amostras de ácido salicílico espera-se uma degradação em torno de 210 °C,¹⁶¹ porém é importante que ocorrem variações pela escolha da rampa de aquecimento e pela pureza da amostra, e no caso desta Tese, o ácido salicílico é somente uma parte da estrutura analisada, mas que demonstra ter forte influência para acontecer a degradação do LIP 2-HDEASa.

Devido as características definidas pela composição das miniemulsões onde a água é preponderante, com o uso da técnica de TGA não foi possível verificar a interação entre as substâncias da mistura, ou a formação de qualquer estrutura vesicular, porém a TGA foi muito importante para se conhecer as temperaturas de degradação dos reagentes que são matéria-prima das miniemulsões.

5.4. Análise da ação antifúngica das miniemulsões sintetizadas contendo o clioquinol

O intuito desse projeto consistiu em desenvolver uma miniemulsão estável e solúvel em água que permitisse a inclusão do fármaco clioquinol (antifúngico pouco solúvel em soluções aquosas) em formulações como esmaltes e xampus para tratamento tópico de micoses.

Para tal, após a síntese das miniemulsões e incorporação do clioquinol, testou-se, primeiramente, a ação antifúngica do composto em unhas. Os testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia, UFRGS.

Conforme a **Figura 39**, comparando-se as unhas tratadas com todas as miniemulsões sintetizadas e os controles positivos (somente unhas e o fungo) bem como, com o controle negativo (somente unhas e clioquinol), pode-se observar que, após 3 dias

de tratamento, houve uma pequena inibição no crescimento do fungo para as miniemulsões contendo os LIPs 2-HDEAMa e o 2-HDEASa, mas não o esperado para um tratamento eficaz. O mesmo observou-se para a miniemulsões contendo os LIPs 2-HDEALa (sem foto guardada pelo laboratório de micologia).

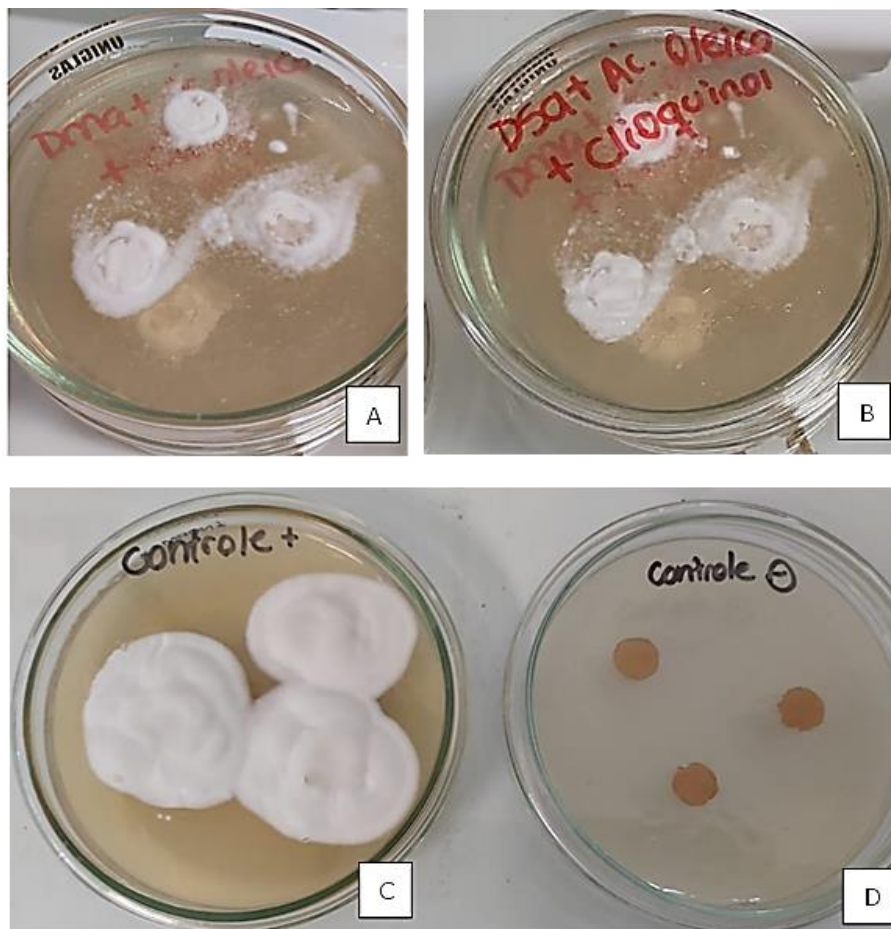


Figura 39. Placas contendo o meio BDA com o fungo *Trichophyton rubrum* e os discos de cascos suínos. Tratamento da unha, após 3 dias, com as miniemulsões sintetizadas com 50 mM de 2-HDEAMa, 10 mM de ácido oleico e 750 µg/mL de clioquinol (A), com 50 mM de 2-HDEASa, 10 mM de ácido oleico e 750 µg/mL de clioquinol (B), controle positivo (c) controle negativo (d).

Com os resultados observados, sugere-se que não se obteve o mesmo resultado positivo do observado para o clioquinol puro, pois a alta estabilidade das miniemulsões impediu a total liberação do clioquinol na unha, impossibilitando a ação antifúngica.

A alta estabilidade das miniemulsões contendo o fármaco é muito importante para permitir a presença desse antifúngico em formulações aquosas de forma homogênea. Caso o fármaco fosse adicionado diretamente em formulação aquosa, o mesmo precipitaria evitando a sua ação, bem como, prejudicando a sua comercialização e estocagem.

5.5 Efeito de formulações com diferentes pH na liberação do fármaco do interior das miniemulsões

Conforme estabelecido pelo grupo de estudo do laboratório em conjunto com informações debatidas com membros da Faculdade de Farmácia, passou-se a adotar o objetivo de provocar alterações de pH e verificar em qual faixa as miniemulsões se tornariam instáveis, e assim pudesse ocorrer a liberação do clioquinol.

O objetivo destes ensaios foi alterar as características das miniemulsões sintetizadas e com isto, observar a quebra do estado emulsionado. Resultados que trouxessem o potencial zeta para a faixa entre -30 mV a +30 mV, e principalmente, os mais próximos de zero, indicariam agregação das partículas, quebra das miniemulsões, abertura das miniemulsões e assim, a liberação dos fármacos.

Primeiramente foram preparadas novas bateladas das miniemulsões, conforme capítulo 4.4.

Conforme a **Tabela 10**, as miniemulsões obtidas das sínteses para as amostras controle com os LIPs 2-HDEALa, LIP 2-HDEAMa e LIP 2-HDEASa apresentaram bons valores de diâmetro hidrodinâmico das partículas conforme resultados anteriores (207, 155 e 148 nm, respectivamente) e uma boa estabilidade (-60, -79 e -76 mV, respectivamente).

Após obtenção das miniemulsões com cada LIP, fez-se a adição dos agentes escolhidos conforme os seguintes critérios: caráter básico forte, ácido forte, ácido fraco, e dois exemplos de substâncias que já são comercialmente de uso tópico na higiene e cuidados pessoais, o sabonete líquido e o produto conhecido como base de unha.

Conforme pode-se verificar na **Tabela 10**, a adição de 1 mL do HCl acarretou uma diminuição da estabilidade (PZ de +2, +9 e +4 mV para as miniemulsões com LIP 2-HDEALa, LIP 2-HDEAMa e LIP 2-HDEASa, respectivamente), Porém, o pH muito baixo (pH 1) o eliminou como agente desestabilizador das miniemulsões visto a intenção de seu uso junto a pele humana ou pelo animal.

Verificou-se que a estabilidade das miniemulsões com adição de 1 mL ácido acético diminuiu, porém, também propiciou uma redução do pH. Um dos exemplos está na miniemulsão formada com o LIP 2-HDEALa, a qual o potencial zeta passou do valor de -60 para -24 mV e o pH de 5 para 3,5. Isso pode ser atribuído à mudança no estado de ionização das miniemulsões com ácido acético embutido na bicamada devido à alteração do pH do meio circundante.¹⁶²

Tabela 10. pH, diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das miniemulsões na antes e após adição dos denominados agentes de desestabilização.

Composição das soluções para as miniemulsões (5 mL de A+ x mL de B)		Volume utilizado de B (mL)	pH	Diâmetro (nm)	PDI	PZ (mV)
A	B					
Clioquinol + ácido oleico + 2-HDEALa 20 mM	Controle	-	5	207 ± 5	0,36 ± 0,02	-60 ± 2
	HCl	1	1	505 ± 123	1 ± 0,01	+2 ± 5
	ácido acético	1	3,5	226 ± 11	0,16 ± 0,01	-24 ± 1
	NaOH	0,03	8	N.D.	N.D.	N.D.
	sabonete líquido base de unha	1 0,9	5,5 5	36 ± 8 277 ± 2	0,50 ± 0,23 0,11 ± 0,02	-88 ± 5 -45 ± 6
Clioquinol + ácido oleico + 2-HDEAMa 50 mM	Controle	-	7	155 ± 2	0,24 ± 0	-79 ± 4
	HCl	1	1	*N.D.	*N.D.	+9 ± 2
	ácido acético	1	4	618 ± 25	0,53 ± 0,02	-20 ± 1
	NaOH	0,03	8	120 ± 4	0,24 ± 0	-84 ± 4
	sabonete líquido base de unha	1 0,9	6,5 5	241 ± 51 336 ± 7	0,94 ± 0,1 0,44 ± 0	-58 ± 5 -41 ± 1
Clioquinol + ácido oleico + 2-HDEASa 50 Mm	Controle	-	6	148 ± 2	0,32 ± 0,01	-76 ± 3
	HCl	1	1	150 ± 122	1 ± 0,01	+4 ± 1
	ácido acético	1	3,5	293 ± 17	0,26 ± 0,02	-28 ± 2
	NaOH	0,03	8,5	119 ± 10	0,30 ± 0,01	-79 ± 2
	sabonete líquido base de unha	1 0,9	6 5	214,2 ± 145 135 ± 2	0,89 ± 0,19 0,38 ± 0,03	-63 ± 2 -49 ± 11

*N.D.: não disponível. Zetasizer® indicou miniemulsões instáveis por rápida aglomeração.

Abaixo de 4,0 no pH, a separação de fases ocorreu em minutos. A redução do pH diminuiria a densidade iônica da emulsão, e reduziria as forças de repulsão entre eles.

Na adição de NaOH, verificou-se que somente com a adição de 30 µL de NaOH foi possível observar a olho nu o desaparecimento da turbidez, indicando uma possível desestabilização da amostra.

Porém, não se observou alteração no potencial zeta das miniemulsões. Miniemulsões com os LIPs 2-HDEAMa e com 2-HDEASa com o uso do hidróxido de sódio (NaOH) indicaram valores de diâmetro das partículas e uma boa estabilidade pela resposta do DLS-PZ (120 nm, -84 mV), (119 nm, -79 mV), respectivamente, mas estes resultados não indicam emulsões desestabilizadas.

Enquanto as miniemulsões estiverem em meio de cargas negativas, como exemplo (OH⁻), será mantida a repulsão eletrostática entre suas partículas, e assim, não ocorrerá agregação destas e será mantido o estado emulsionado e as miniemulsões com o fármaco aprisionado.¹⁶² Uma possível explicação está no fato que em particular, as miniemulsões de ácido graxo (ácido oleico) aniônicas são estáveis dentro de uma faixa de pH alcalino,

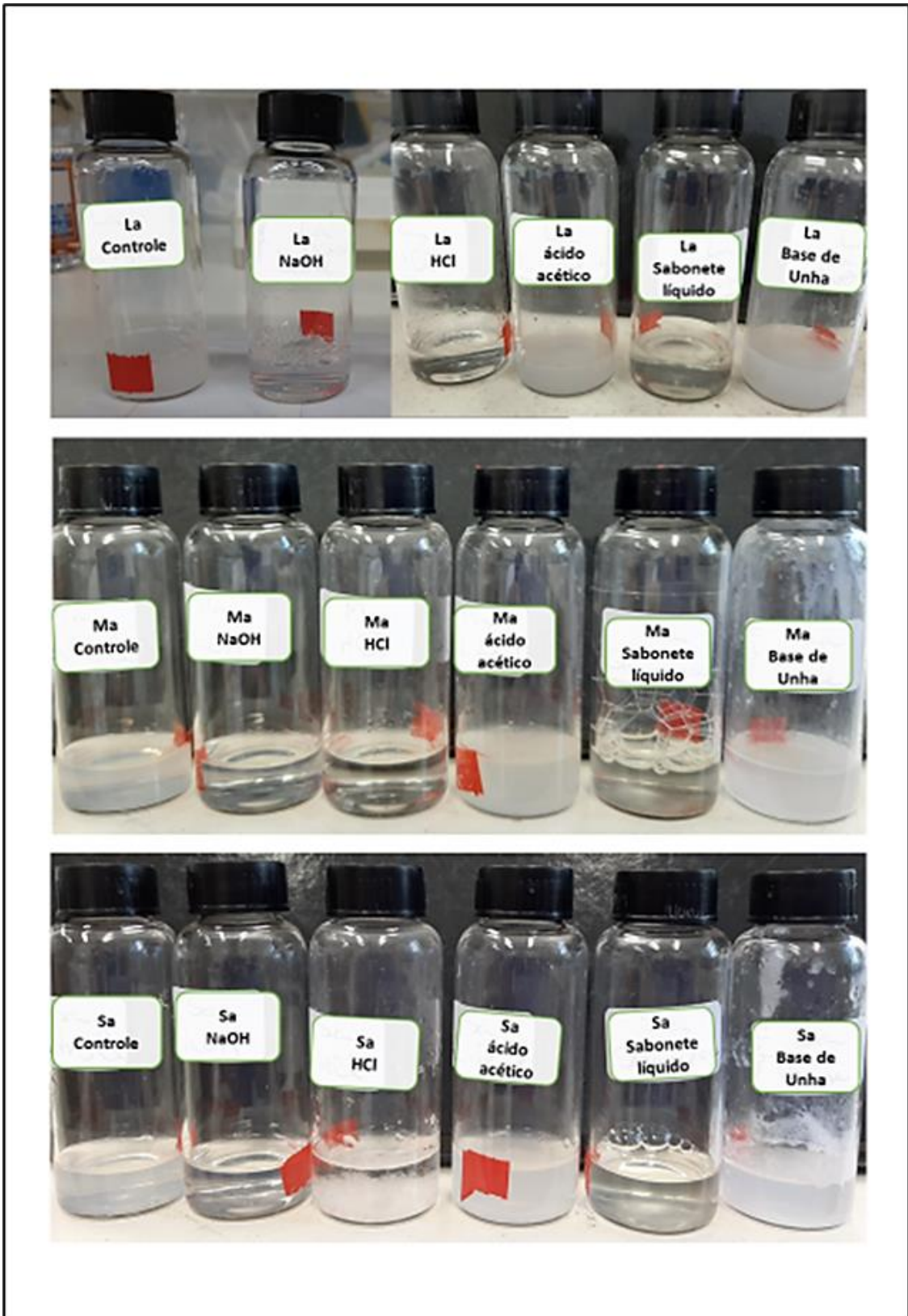


Figura 40. Observações visuais para o resultado da síntese de emulsão com os LIPs (2-HDEALa: (La); 2-HDEAMa: (Ma); 2-HDEASa: (Sa) - (24 horas após o final da síntese e o término da adição de todos os agentes).

como os encontrados nesta pesquisa que estão na faixa de 8 a 8,5.¹⁶³ Porém, conforme a **Figura 40**, os resultados de Potencial Zeta são conflitantes com o visual da amostra logo após adição mínima de 30 µL de NaOH.

Como ácido oleico é fracamente aniônico, a emulsão que o tem como base hidrofóbica só é estável até um máximo pH em torno de 8,0. Para ácidos graxos e seus sabões em pH alto, todas as moléculas de ácido graxo tornam-se ionizadas e a repulsão entre moléculas carregadas de forma semelhante em uma monocamada adsorvida desses ânions pode resultar em uma expansão da monocamada, que por sua vez pode levar a um enfraquecimento e seu filme ficar instável.¹⁶⁴

No caso da adição de sabonete líquido na emulsão formada com o LIP 2-HDEALa, observou-se a elevação do pH e um aumento da estabilidade das miniemulsões (PZ de -88 mV). No caso da miniemulsão formada com o LIP 2-HDEAMa, verificou-se a diminuição do pH e a redução do potencial zeta (**Tabela 10**). Porém, em todos os casos observou-se a diminuição da turbidez. Para a miniemulsão com o LIP 2-HDEASa verificou-se leve redução do potencial zeta ao adicionar o agente, mesmo sem alteração do pH.

Utilizando-se a base de unha como agente da desestabilização das miniemulsões, conforme **Tabela 10**, após passadas 24 horas da síntese das miniemulsões e adição deste agente observou-se que se manteve um estado emulsionado. Conforme a **Tabela 10**, o pH 5 resultante da mistura foi o mesmo para todos os LIPs. Todos tiveram redução do potencial zeta.

Visto que a intenção era achar um bom agente desestabilizante das miniemulsões, levando em conta o critério de 1 mL como máximo volume a ser adicionado e ter-se um visual de estado emulsionado quebrado, pode-se afirmar que nenhum agente atingiu junto todos os critérios (pH seguro mais próximo do normal da pele, diminuir a estabilidade visual, diminuir o potencial zeta, e aumentar a agregação das partículas visto no PDI elevado).

O ácido clorídrico HCl agiu muito bem em termos de PZ e PDI, mas o pH resultante da quantidade necessária a uma desestabilização visual não deixa seguro o seu uso.

Após análises das influências de todos os agentes, foi possível verificar que o uso do agente NaOH nas miniemulsões dos três LIPs mostrou-se com maior potencial para liberação do antifúngico em termos de um mínimo de volume visualmente já remover o estado emulsionado que era muito perceptível nas amostras controle.

Em outra fase de testes com outros agentes modificadores do pH das miniemulsões, o hidróxido de amônio também teve comportamento muito semelhante a todos os resultados dos três LIPs com o hidróxido de sódio, dentro das mesmas condições de ensaios.

Pela interpretação dos resultados estes agentes não seguiram como uma escolha correta quando do uso de miniemulsões com o fármaco clioquinol.

Para a quebra do estado emulsionado, após novos ensaios com reagentes como: fosfato de sódio monobásico 1M (NaH_2PO_4), fosfato de sódio bibásico 1M (Na_2HPO_4), ácido cítrico 1M, hidróxido de magnésio 1 %, e tampão Tris (10 mM) – EDTA (1 mM) – TE com pH 9, e verificou-se que o fosfato de sódio monobásico é muito bem indicado.

Além do bom resultado visual, para as amostras da miniemulsão 2-HDEALa os resultados obtidos indicaram pH aceitável (5,0), alto PDI (>0,316) e importante redução do PZ (-42 mV), chegando na faixa de baixa resistência a manter o estado emulsionado.

No caso das miniemulsões com o LIP 2-HDEAMa o uso do fosfato também resultou em um pH aceitável (5,0), alto PDI (0,9668) e importante redução do PZ (-21 mV). Já para as amostras da miniemulsão 2-HDEASa ao usarmos o fosfato monobásico obteve-se pH aceitável (5,0), alto PDI (0,706) e importante redução do PZ (-23 m V).

Alguns shampoos têm fosfato de sódio monobásico em sua formulação (Palmolive® Naturals®) para ajustes de pH, como tamponamentos, e haveria a possibilidade de se misturar a loção com a miniemulsão no shampoo na ocasião da aplicação no antifúngico.

5.6. Análise da ação antifúngica das miniemulsões na erradicação do biofilme *microsporum canis* em pelos de animal

Os resultados ao se avaliar a atividade antifúngica em pelos de animais estão descritos neste capítulo. Para tanto, a ação antifúngica das miniemulsões foi testada na erradicação do biofilme *Microsporum canis* em pelos de animal.

Nestes testes analisou-se em duplicata as miniemulsões dos LIPs com o ácido oleico, e as miniemulsões dos LIPs com o ácido oleico e clioquinol. Nesta última miniemulsão, em uma duplicata foi adicionado o fosfato de sódio monobásico 1M.

Nos resultados da **Tabela 11** pode-se verificar que os percentuais de inibição não são altos, o que indica que estas formulações não são eficazes quando se quer evitar que o fungo cresça.

Tabela 11. Inibição da Formação do biofilme (pelos pré-tratados com as formulações).

Formulações	Erradicação (%)
10 mM de ácido oleico e 20 mM de 2-HDEALa	46
10 mM de ácido oleico e 50 mM de 2-HDEAMa	18
10 mM de ácido oleico e 50 mM de 2-HDEASa	37
Clioquinol + ácido oleico	54
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEALa 20 mM (aq.) + NaH ₂ PO ₄ 1M	0
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEAMa 50 mM (aq.) + NaH ₂ PO ₄ 1M	32
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEASa 50 mM (aq.) + NaH ₂ PO ₄ 1M	28
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEALa 20 mM (aq.)	*
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEAMa 50 mM (aq.)	*
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEASa 50 mM (aq.)	*

*= amostras tiveram crescimento predominante de bactérias.

Já os resultados demonstrados na **Tabela 12** indicaram ótimos resultados de erradicação do biofilme formado em pelos tratados após o biofilme fúngico formado. Percebe-se que mesmo as formulações sem o fármaco clioquinol tiveram efetividade total.

Tabela 12. Remoção do biofilme formado (pelos tratados após a formação do biofilme).

Formulações	Erradicação (%)
10 mM de ácido oleico e 20 mM de 2-HDEALa	100
10 mM de ácido oleico e 50 mM de 2-HDEAMa	100
10 mM de ácido oleico e 50 mM de 2-HDEASa	100
Clioquinol + ácido oleico	9
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEALa 20 mM (aq.) + NaH ₂ PO ₄ 1M	100
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEAMa 50 mM (aq.) + NaH ₂ PO ₄ 1M	100
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEASa 50 mM (aq.) + NaH ₂ PO ₄ 1M	100
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEALa 20 mM (aq.)	*
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEAMa 50 mM (aq.)	*
(clioquinol + ácido oleico 10 mM) + LIP 2-HDEASa 50 mM (aq.)	*

*= amostras teve crescimento predominante de bactérias.

A partir deste ponto, decidiu-se por não continuar com os ensaios com a incorporação do fármaco, assim reduz-se uma etapa da formulação, erros de manipulação e incorporação do antifúngico clioquinol e reduz-se os custos com a aquisição do fármaco.

Na conclusão das pesquisas, realizou-se ensaios que comprovassem a efetividade do uso dos LIPs, porém em formulações emulsionadas com o ácido oleico, testando-se em conjunto com amostras dos LIPs puros e, com amostras só com água e ácido oleico misturados.

Conforme a **Tabela 13**, no presente trabalho, os resultados obtidos para remoção do biofilme nos pelos demonstraram que as três miniemulsões contendo 10 mM de ácido oleico e 20 mM de 2-HDEALa, 50 mM de 2-HDEAMa, 50 mM de 2-HDEASa promoveram a completa erradicação do fungo *M. canis*.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as três formulações, pois foi removido 100% do biofilme fúngico formado.

Ainda pela **Tabela 13** é possível verificar que as amostras dos LIPs puros não trouxeram resultados satisfatórios quando comparadas com estes LIPs em uma apresentação emulsionada.

E, a amostra da mistura agitada somente de água e ácido oleico teve resultado bom, mas inferior ao atingido pelas miniemulsões com os três LIPs, cada um em separado na sua respectiva formulação.

Tabela 13. Erradicação do biofilme de *Microsporium canis* em fios de pelos de animais. Os pelos foram lavados com água e tratados com as formulações por 15 min.

Formulações	Erradicação (%)
10 mM de ácido oleico e 20 mM de 2-HDEALa	100 ^a
10mM de ácido oleico e 50 mM de 2-HDEAMa	100 ^a
10 mM de ácido oleico e 50 mM de 2-HDEASa	100 ^a
10 mM de ácido oleico	90 ± 0.08 ^b
2-HDEALa puro	67 ± 0.11 ^b
2-HDEAMa puro	95 ± 0.11 ^a
2-HDEASa puro	95 ± 0.02 ^a
Controle positivo	0

Os valores representam média ± desvio padrão em triplicata para cada ponto. Valores médios com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste ANOVA Tukey (p < 0,005).

Os resultados encontrados neste estudo corroboram os de outros trabalhos publicados sobre a atividade de compostos iônicos contra fungos.^{165,166}

Ribas *et al.*¹⁶⁵ relataram que compostos iônicos demonstraram atividade antidermatófito, inclusive contra dermatófitos multirresistentes. Esses compostos iônicos podem ser uma excelente alternativa terapêutica no combate a diversos fungos. Dessa forma, Bergamo *et al.*¹⁶⁷ descreveram atividade contra isolados de *Candida tropicalis* multirresistentes, e Ribas *et al.*¹⁶⁵ demonstraram atividade potente contra *Fusarium graminearum*.

No presente trabalho, o LIP com ânion lactato puro foi menos eficiente que os LIP com ânions maleato e salicilato puros, e nenhum deles apresentou 100% de erradicação do biofilme. A mesma observação foi feita para o ácido oleico 10 mM, que mostrou apenas 90% de erradicação do biofilme.

Dimitri *et al.*¹⁶⁷ avaliaram a atividade antimicrobiana de LIPs com o cátion 1-amônio-2-propanol e diferentes ânions para aplicação na remoção de fungos e bactérias de papéis deteriorados.

Através deste trabalho de pesquisa, este autor pode afirmar que todos os LIPs testados apresentaram atividade antimicrobiana e isso é significativamente afetado pelo tamanho e pelos grupos funcionais específicos na estrutura do ânion do LIP.

Destaca-se que, os LIPs de hidroxidietilamônio com os ânions empregados apresentam atividade antimicrobiana para um amplo espectro de patógenos humanos e exibem eficácia de inibição comparável à gentamicina, sendo potenciais agentes antimicrobianos.¹¹³

Neste trabalho, as miniemulsões contendo os LIPs proporcionaram a erradicação total do biofilme. Portanto, a utilização das miniemulsões à base de ácido oleico e dos três LIPs para tratamento de pelos de animais apresentou efeito sinérgico, aumentando a atividade antibiofilme em comparação aos LIPs puros e à miniemulsão preparada apenas com ácido oleico.¹³¹

Os resultados deste estudo também foram comparados com dados da literatura (**Tabela 14**)^{85,141,168-171} em que nanoemulsões foram aplicadas como agente antibiofilme. Vale ressaltar que a atividade antibiofilme observada neste estudo foi comparável, ou em alguns casos até superior, à relatada na literatura.

Esses achados sugerem que as miniemulsões sintetizadas neste trabalho têm potencial para serem utilizadas como formulação solúvel em água, como uma loção, para o tratamento de dermatoses de pelos de animais.

Tabela 14. Atividade antibiofilme de nanoemulsões comparadas as miniemulsões produzidas neste trabalho.

Tipo de nanoemulsão	Tamanho médio (nm)	Atividade antibiofilme	Tempo de exposição (min)	Ref.
Nanoemulsão baseada em Óleo essencial de <i>Thymus daenensis</i> Tween 80 como surfactante não iônico e lecitina como co-surfactante	172	56 % Contra biofilme de <i>Acinetobacter baumannii</i>	1440	168
Nanoemulsão baseada em solução salina tamponada com fosfato (PBS - fase aquosa), colesterol e óleo de girassol (fase oleosa) e éter cetílico de polioxietileno (20) (Brij® 58) e fosfatidilcolina de soja como surfactante	44 a 47	66 % contra biofilme de <i>Candida auris</i>	1440	169
Nanoemulsão baseada em óleo de soja, cloreto de cetilpiridínio e Triton X-100 em água	308	92 % contra <i>Actinomyces viscosus</i> , 89 % contra <i>Candida albicans</i>	30	170
Nanoemulsão baseada em acetato de clorexidina, Tween 80, propileno glicol, e miristato de isopropila	63	100 % contra resistente methicillin <i>Staphylococcus aureus</i>	1440	85

Tipo de nanoemulsão	Tamanho médio (nm)	Atividade antibiofilme	Tempo de exposição (min)	Ref.
Nanoemulsão com base de óleo span 60, e água. Posteriormente, as nanoemulsões formuladas foram enxertadas com a matriz de hidrogel à base de goma gelana.	49	81 % contra <i>Staphylococcus aureus</i> , 72 % contra <i>Bacillus subtilis</i> , 66 % contra <i>Escherichia coli</i> e 68 % contra <i>Candida albicans</i> .	1440	171
Nanoemulsão baseada em óleo essencial <i>Zanthoxylum schinifolium</i> Sieb. et Zucc, Tween 80 e água.	106	72 % em biomassa de biofilme pré-formado de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1440	141
Nanoemulsão baseada em LIP 2-HDEALa, 2-HDEASa e 2-HDEAMa com ácido oleico em água.	259, 196 e 184 nm p/ 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa	100 % contra <i>Microsporium canis</i>	15	nesta Tese

Continuação da Tabela 14.

Uma ilustração geral do caminho até o atingimento destes objetivos pode ser visualizada na **Figura 41**.

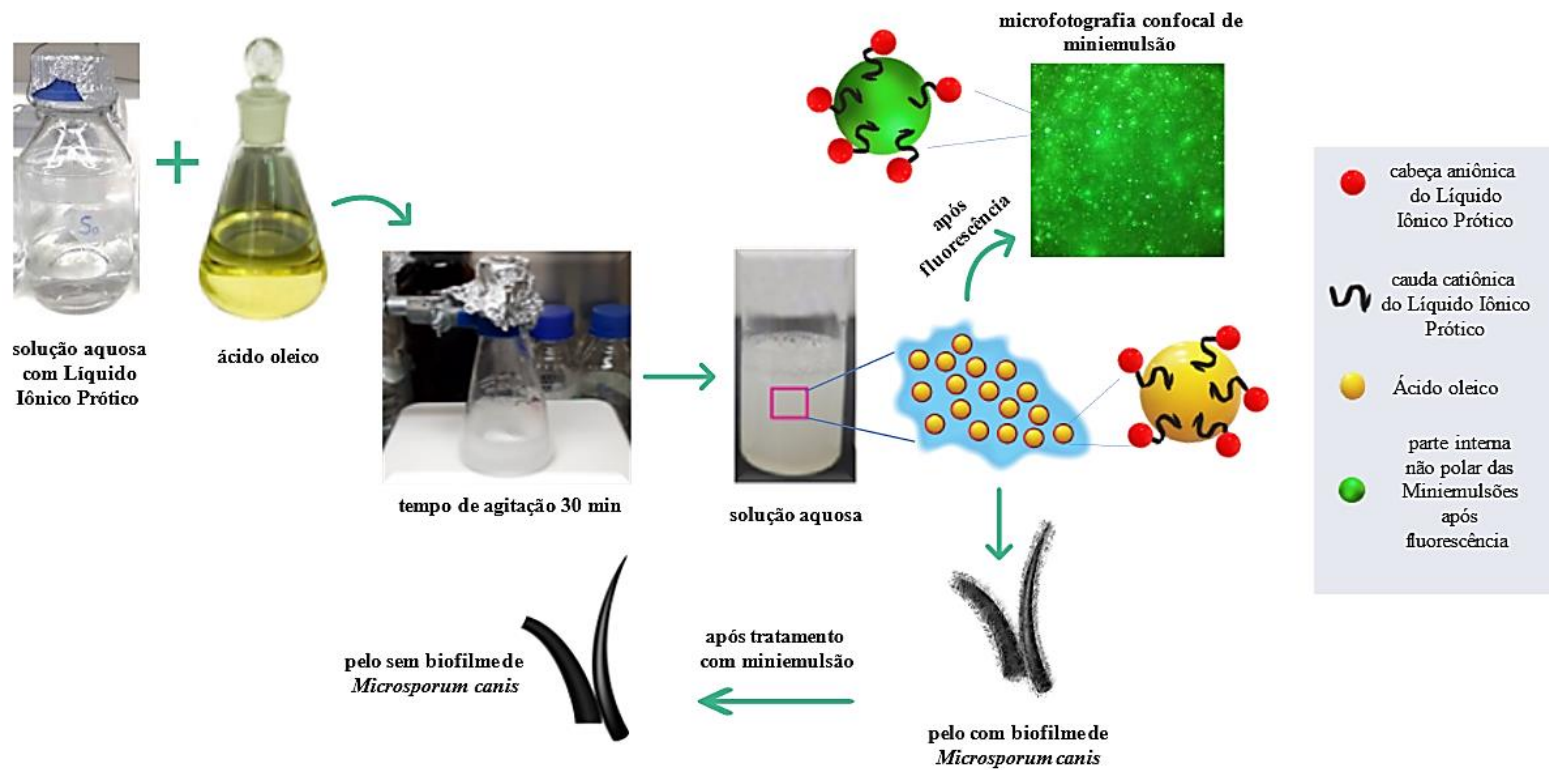


Figura 41. Síntese verde de miniemulsão desenvolvida com solução aquosa de LIP e ácido oleico em uma etapa e reduzido custo com atividade de 100 % na remoção de biofilme *Microsporium canis*.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, até onde tem-se conhecimento, relata-se pela primeira vez uma síntese simples e de baixo custo de miniemulsões utilizando moléculas verdes como líquidos iônicos próticos e ácido oleico e sua utilização na erradicação do fungo *M. canis* causador da dermatofitose em pelos de animais.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que as concentrações de 2-HDEALa 20 mM, 2-HDEAMa 50 mM e 2-HDEASa 50 mM e ácido oleico 10 mM produziram miniemulsões com pequenos diâmetros, baixo PDI e boa estabilidade eletrostática sob agitação magnética simples em um curto tempo de reação a uma temperatura de 25 °C.

Macroscopicamente, após síntese da miniemulsão, verificou-se a formação de um líquido branco opalescente e de aspecto homogêneo. Microscopicamente, a miniemulsão apresentou o formato esférico e seu pH foi próximo ao da pele humana e animal, o que indica que nenhuma das miniemulsões está em uma faixa de pH prejudicial à pele.

Conforme os resultados de caracterização das matérias-primas utilizadas para a formação das miniemulsões, tanto o ácido oleico, os LIPs e o clioquinol usados estavam íntegros no momento que foram utilizados.

A análise de RMN mostrou que provavelmente ocorreu interação da parte catiônica de todos os LIPs com o ácido oleico, promovendo encapsulação eficiente do ácido oleico pelos LIPs na miniemulsão.

Além disso, a análise de fluorescência confirmou que os LIPs em meio aquoso foram capazes de formar uma camada ao redor do ácido oleico, evitando a coalescência das gotículas, criando miniemulsões.

Considerando a natureza altamente higroscópica dos LIPs, devido à presença de grupos hidroxila, a absorção de umidade do ambiente pode ser a principal razão para as diferenças relatadas nos resultados de análises térmicas.

A partir dos ensaios dos diâmetros das partículas, o menor tamanho da emulsão foi alcançado misturando a menor quantidade de ácido oleico com as segundas menores concentrações dos LIPs testados. As miniemulsões sintetizadas utilizando-se os LIPs mostraram-se mais estáveis que as com apenas ácido oleico.

O antifúngico, clioquinol, foi eficientemente incorporado pelas miniemulsões sintetizadas com o ácido oleico e os LIPs 2-HDEALa, 2-HDEAMa e 2-HDEASa. Após a

incorporação do fármaco, as miniemulsões permaneceram com um tamanho pequeno e alta estabilização, permitindo que sirvam como transporte do clioquinol em formulações aquosas como, por exemplo, shampoos.

Apesar da alta estabilidade das miniemulsões contendo o fármaco ser muito importante para permitir a presença desse antifúngico em formulações aquosas de forma homogênea, a mesma impediu a liberação do clioquinol em testes nas unhas de porco, impossibilitando a ação antifúngica. A liberação do clioquinol das miniemulsões foi testada a partir de agentes com potencial desestabilizante. Após análises das influências de todos os primeiros agentes escolhidos para alteração do pH, foi possível verificar que em um ou mais critérios estes agentes não são passíveis de uso.

Além dos resultados das miniemulsões à incorporação eficiente do antifúngico enquanto ainda na fase de testes em unhas, a partir de novos ensaios, desta vez de erradicação de biofilme de *Microsporum canis* cem pelos de animal, pode-se verificar os ótimos resultados das miniemulsões na erradicação total do biofilme sem a necessidade da incorporação do fármaco. Vale ressaltar que todas as miniemulsões apresentaram efeito sinérgico, aumentando a atividade antibiofilme em comparação aos LIPs puros e à miniemulsão preparada apenas com ácido oleico.

Estes resultados abrem um novo campo de estudo envolvendo novos materiais utilizando líquidos iônicos na área terapêutica. Portanto, os resultados deste estudo sugerem que esses materiais poderiam ser um potencial formulação solúvel em água para ser utilizada como loção no tratamento de dermatoses de pelos animais.

7.PERSPECTIVAS DE TRABALHO

Os estudos desenvolvidos durante este trabalho de doutorado apontam para diversas perspectivas e possibilidades de pesquisas que podem ser produzidas e aprimoradas quanto ao tema de produção de miniemulsões antifúngicas:

- Avaliar o tempo para a perda de estabilidade das miniemulsões utilizando medição do Potencial Zeta em período longo de tempo visando simular o tempo de prateleira.
- Testar as miniemulsões nos ensaios de irritabilidade em simulações *in vitro* junto ao laboratório da Faculdade de Farmácia.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sardi, J. C. O.; Scorzoni, L.; Bernardi, T.; Fusco-Almeida, A. M.; Mendes Giannini, M. J. S. Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J. Med. Microbiol.** v. 62, p. 10–24, 2013.
2. Fuentesfria, A. M.; Pippi, B.; Dalla Lana, D. F.; Donato, K. K.; de Andrade, S. F. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 66, p. 2–13, 2018.
3. Harding, M. W.; Marques, L. L. R.; Howard, R. J.; Olson, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends Microbiol.** v. 17, p. 475–480, 2009.
4. Abdel-Aziz, M. M.; Al-Omar, M. S.; Mohammed, H. A.; Emam, T. M. In vitro and Ex vivo antibiofilm activity of a lipopeptide biosurfactant produced by the entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain against *Microsporum canis*. **Microorganisms.** v. 8, p. 232, 2020.
5. Pascoli, A.; Bortolatto, A.; Reis Filho, N.; Ferreira, M.; De Nardi, A. Dermatofitose por *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*: revisão de literatura. v. 3, p. 206–211, 2014.
6. Zhou, F.; Xu, H.; Song, Z.; Zhu, L.; Feng, S.; Feng, R. α -Linolenic acid-modified pluronic 127-CS copolymeric micelles for the skin targeted delivery of amphotericin B. **New J Chem.** v. 43, p. 444–453, 2019.
7. Nenoff, P.; Krüger, C.; Ginter-Hanselmayer, G.; Tietz, H. J. Mycology-an update. Part 1: Dermatophytes: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. **JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology.** v. 12, p. 188–210, 2014.
8. Witkowska, E.; Jagielski, T.; Kamińska, A. Genus- and species-level identification of dermatophyte fungi by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.** v. 192, p. 285–290, 2018.
9. Da Costa, B.; Pippi, B.; Berlitz, S. J.; Carvalho, A. R.; Teixeira, M. L.; Kulkamp-Guerreiro, I. C.; Andrade, S. F.; Fuentesfria, A. M. Evaluation of activity and toxicity of combining clioquinol with ciclopirox and terbinafine in alternative models of dermatophytosis. **Mycoses.** v. 64, p. 727–733, 2021.
10. Costa, B. S. **Atividade antidermatofítica do Clioquinol combinado com ciclopirox e terbinafina em ensaios *in vitro* e *ex vivo*.** 2020. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.
11. Kumar, L.; Verma, S.; Bhardwaj, A.; Vaidya, S.; Vaidya, B. Eradication of superficial fungal infections by conventional and novel approaches: A comprehensive review. **Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.** v. 42, p. 32–46, 2014.
12. Abastabar, M.; Jedi, A.; Guillot, J.; Ilkit, M.; Eidi, S.; Hedayati, M. T.; Shokohi, T.; Daie Ghazvini, R.; Rezaei-Matehkolaie, A.; Katiraei, F.; Javidnia, J.; Ahmadi, B.; Badali, H. In vitro activities of 15 antifungal drugs against a large collection of clinical isolates of *Microsporum canis*. **Mycoses.** v. 62, p. 1069–1078, 2019.
13. Shimizu, A.; Kuriyama, Y.; Futatsuya, T.; Anzawa, K.; Nishio, M.; Kanai, S.; Ishikawa, O.; Motegi, S. Inflammatory tinea capitis due to *Microsporum canis* transmitted from asymptomatic domestic cats. **J. Cutan. Immunol. Allergy.** v. 5, p. 150–152, 2022.
14. Di Mattia, D.; Fondati, A.; Monaco, M.; Pasquetti, M.; Peano, A. Comparison of two inoculation methods for *Microsporum canis* culture using the toothbrush sampling technique. **Vet. Dermatol.** v. 30, p. 60–e17, 2019.
15. Da Cunha, M. M.; Capote-Bonato, F.; Capoci, I. R. G.; Bonato, D. V.; Ghizzi, L. G.; Paiva-Lima, P.; Baeza, L. C.; Svidzinski, T. I. E. Epidemiological investigation and

- molecular typing of dermatophytosis caused by *Microsporum canis* in dogs and cats. **Prev. Vet. Med.** v. 167, p. 39–45, 2019.
16. Köhler, J. R.; Hube, B.; Puccia, R.; Casadevall, A.; Perfect, J. R. Fungi that Infect Humans. **The Fungal Kingdom.** v. 5, n. 3, p. 811–843, 2017.
 17. De Aguiar Peres, N. T.; Maranhão, F. C. A.; Rossi, A.; Martinez-Rossi, N. M. Dermatophytes: Host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An. Bras. Dermatol.** v. 85, p. 657–667, 2010.
 18. Pires, C. A. A.; da Cruz, N. F. S.; Lobato, A. M.; de Sousa, P. O.; Carneiro, F. R. O.; Mendes, A. M. D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **An. Bras. Dermatol.** v. 89, p. 259–264, 2014.
 19. Sahoo, A.; Mahajan, R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. **Indian Dermatol. Online J.** v. 7, p. 77, 2016.
 20. Durdu, M.; Ilkit, M.; Tamadon, Y.; Toloee, A.; Rafati, H.; Seyedmousavi, S. Topical and systemic antifungals in dermatology practice. **Expert Rev. Clin. Pharmacol.** v. 10, p. 225–237, 2017.
 21. Aneke, C. I.; Otranto, D.; Cafarchia, C. Therapy and antifungal susceptibility profile of *microsporum canis*. **J. Fungi,** v. 4, p. 107, 2018.
 22. Leesombun, A.; Thanapakdechakul, K.; Suwannawiang, J.; Mukto, P.; Sunpradit, S.; Bangphoomi, N.; Changbunjong, T.; Thongjuy, O.; Weluwanarak, T.; Boonmasawai, S. Effects of *Coleus amboinicus* L. Essential Oil and Ethanolic Extracts on Planktonic Cells and Biofilm Formation of *Microsporum canis* Isolated from Feline Dermatophytosis. **Antibiotics.** v. 11, p. 1734, 2022.
 23. Campoy, S.; Adrio, J. L. Antifungals. **Biochem. Pharmacol.** v. 133, p. 86–96, 2017.
 24. Chang, Y. L.; Yu, S. J.; Heitman, J.; Wellington, M.; Chen, Y. L. New facets of antifungal therapy. **Virulence.** v. 8, p. 222–236, 2017.
 25. Souza, A. C. O.; Amaral, A. C. Antifungal therapy for systemic mycosis and the nanobiotechnology era: Improving efficacy, biodistribution and toxicity. **Front. Microbiol.** v. 8, p. 1–13, 2017.
 26. Ahmad, I. Z.; Ahmad, A.; Tabassum, H.; Kuddus, M. Chapter 8 - A cosmeceutical perspective of engineered nanoparticles. **Handbook of Nanomaterials for Manufacturing Applications.** p. 193-223, 2020.
 27. Verma, S.; Utreja, P. Vesicular nanocarrier based treatment of skin fungal infections : Potential and emerging trends in nanoscale pharmacotherapy. **Asian J. Pharm. Sci.** v. 14, p. 117–129, 2019.
 28. Ji, Z.; Guo, W.; Sakkiyah, S.; Liu, J.; Patterson, T. A.; Hong, H. Nanomaterial databases: Data sources for promoting design and risk assessment of nanomaterials. **Nanomaterials.** v. 11, p. 1599, 2021.
 29. COMITEE ON TECHNOLOGY. Manufacturing The Future. Relatório. Washington, 2008.
 30. Nikalje, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. **Med. Chem. (Los Angeles).** v. 5, p. 81–89, 2015.
 31. Mohd-Setapar, S. H.; John, C. P.; Mohd-Nasir, H.; Azim, M. M.; Ahmad, A.; Alshammari, M. B. Application of Nanotechnology Incorporated with Natural Ingredients in Natural Cosmetics. **Cosmetics.** v. 9, p. 1–20, 2022.
 32. de Paula Dias, B.; de Castro Ribeiro, E. M.; Gonçalves, R. L.; Oliveira, D. S.; Ferreira, T. H.; de Mello Silva, B. Nanotechnology in Brazil and the development of products with antimicrobial activity. **Quim. Nova.** v. 44, p. 1084–1092, 2021.
 33. Aflori, M. Smart nanomaterials for biomedical applications—a review. **Nanomaterials.** v. 11, p. 1–33, 2021.
 34. StatNano. Top 20 Countries in Holding Nanotechnology Patents in 2021. Disponível em:

- <https://statnano.com/news/70323/Top-20-Countries-in-Holding-Nanotechnology-Patents-in-2021>. Acesso em: 6 de abril de 2023.
35. StatNano. Top 20 Countries by Nanotechnology Publications in 2022. Disponível em: <https://statnano.com/news/72057/Top-20-Countries-by-Nanotechnology-Publications-in-2022>. Acesso em: 20 de junho de 2023.
 36. Nanotechnology Market. **Precedence Research Report**. Disponível em: <https://www.precedenceresearch.com/nanotechnology-market>. Acesso em: 23 de julho de 2023.
 37. Kim, Hyunhong; Choi, Seong-Hyeon; Kim, Mijung; Park, Jang-Ung; Bae, Joonwon; Park, Jongnam. Seed-mediated synthesis of ultra-long copper nanowires and their application as transparent conducting electrodes, **Applied Surface Science**. v. 422, p. 731-737, 2017.
 38. Laletina, Svetlana S.; Mamatkulov, Mikhail; Shor, Aleksey M.; Shor, Elena A.; Kaichev, Vasily V.; Yudanov, Ilya V. Size and structure effects on platinum nanocatalysts: theoretical insights from methanol dehydrogenation. **Nanoscale**. v. 14, p. 4145-4155, 2022.
 39. de Knoop, Ludvig; Kuisma, Mikael J.; Löfgren, Joakim; Lodewijks, Kristof; Thuvander, Mattias; Erhart, Paul; Dmitriev, Alexandre; Olsson, Eva. Electric-field-controlled reversible order-disorder switching of a metal tip surface. **Phys. Rev. Mater.** v. 2, p. 085006, p. 085006(6), 2018.
 40. Chaturvedi, S.; Dave, P. N.; Shah, N. K. Applications of nano-catalyst in new era. **J. Saudi Chem. Soc.** v. 16, p. 307–325, 2012.
 41. COMITEE ON TECHNOLOGY. **Nanotechnology Research Directions: IWGN Workshop Report**. Relatório. Washington, 1999.
 42. Soares, S.; Sousa, J.; Pais, A.; Vitorino, C. Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. **Front. Chem.** v. 6, p. 1–15, 2018.
 43. Đorđević, S.; Gonzalez, M. M.; Conejos-Sánchez, I.; Carreira, B.; Pozzi, S.; Acúrcio, R. C.; Satchi-Fainaro, R.; Florindo, H. F.; Vicent, M. J. Current hurdles to the translation of nanomedicines from bench to the clinic. **Drug Deliv. Transl. Res.** v. 12, p. 500–525, 2022.
 44. Paramasivam, G.; Palem, V. V.; Sundaram, T.; Sundaram, V.; Kishore, S. C.; Bellucci, S. Nanomaterials: Synthesis and applications in theranostics. **Nanomaterials**. v. 11, p. 3228, 2021.
 45. Ratner, B. M.; Ratner, D. **Nanotechnology: A Gentle Introduction to the Next Big Idea**. 1ª edição. EUA: Pearson, 2003, 208 p.
 46. Rashighi, M.; Harris, J. E. Engineered nanomaterial applications in perinatal therapeutics. **Physiol. Behav.** v. 176, p. 139–148, 2017.
 47. Janib, S. M.; Moses, A. S.; MacKay, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 62, p. 1052–1063, 2010.
 48. SSN, F.; TDCP, G.; J, H. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. **Sri Lankan J. Infect. Dis.** v. 8, p. 2–11, 2018.
 49. Fytianos, G.; Rahdar, A.; Kyzas, G. Z. Nanomaterials in cosmetics: Recent updates. **Nanomaterials**. v. 10, p. 1–16, 2020.
 50. Bhalla, N.; Ingle, N.; Patel, H.; Jayaprakash, A.; Patri, S. V.; Kaushik, A.; Haranath, D. A facile approach to fabricate and embed multifunctional nano ZnO into soap matrix and liquid cleansing products for enhanced antibacterial and photostability for health and hygiene applications. **Arab. J. Chem.** v. 15, p. 103862, 2022.
 51. Carrouel, F.; Viennot, S.; Ottolenghi, L.; Gaillard, C.; Bourgeois, D. Nanoparticles as anti-microbial, anti-inflammatory, and remineralizing agents in oral care cosmetics: A review of the current situation. **Nanomaterials**. v. 10, p. 140, 2020.

52. Miastkowska, M.; Lasoń, E.; Sikora, E.; Wolińska-Kennard, K. Preparation and characterization of water-based nano-perfumes. **Nanomaterials**. v. 8, p. 981, 2018.
53. Faria-Silva, A. C.; Costa, A. M.; Ascenso, A.; Ribeiro, H. M.; Marto, J.; Gonçalves, L. M.; Carvalheiro, M.; Simões, S. Chapter 4 - Nanoemulsions for cosmetic products. **Nanocosmetics Fundam. Appl. Toxic.** p. 59–77, 2020.
54. Nieves, E.; Vite, G.; Kozina, A.; Olguin, L. F. Ultrasound-assisted production and optimization of mini-emulsions in a microfluidic chip in continuous-flow. **Ultrason. Sonochem.** v. 74, p. 105556, 2021.
55. Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.** v. 108–109, p. 303–318, 2004.
56. Tiwari, S. B.; Amiji, M. M. Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations. **J. Nanosci. Nanotechnol.** v. 6, p. 3215–3221, 2006.
57. Malik, P.; Singh, M. Study of curcumin antioxidant activities in robust oil-water nanoemulsions. **New Journal of Chemistry.** v. 41, p. 12506-12519, 2017.
58. Menezes, P. dos P.; Andrade, T. de A.; Frank, L. A.; de Souza, E. P. B. S. S.; Trindade, G. das G. G.; Trindade, I. A. S.; Serafini, M. R.; Guterres, S. S.; Araújo, A. A. de S. Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.** v. 559, p. 312–328, 2019.
59. McClements, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter.** v. 8, p. 1719–1729, 2012.
60. Branco, I. G.; Sen, K.; Rinaldi, C. Effect of sodium alginate and different types of oil on the physical properties of ultrasound-assisted nanoemulsions. **Chem. Eng. Process. - Process Intensif.** v. 153, p. 107942, 2020.
61. Donahue, N. D.; Acar, H.; Wilhelm, S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 143, p. 68–96, 2019.
62. Pelaz, C.; *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano.** v. 11, p. 2313–2381, 2017.
63. Mohammadi, G.; Namadi, E.; Mikaeili, A.; Mohammadi, P.; Adibkia, K. Preparation, physicochemical characterization and anti-fungal evaluation of the Nystatin-loaded Eudragit RS100/PLGA nanoparticles. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v. 38, p. 90–96, 2017.
64. Albernaz, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.** 2014. 121 f. Dissertação (mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
65. Deaguero, I. G.; Huda, N.; Rodriguez, V.; Zicari, J.; Al-hilal, T. A.; Badruddoza, A. Z. Nano-Vesicle Based Anti-Fungal Formulation Shows Higher Stability, Skin Diffusion, Biosafety and Anti-Fungal Efficacy In Vitro. **Pharmaceutics.** v. 12, p. 1–12, 2020.
66. Rattanapak, T.; Young, K.; Rades, T.; Hook, S. Comparative study of liposomes, transfersomes, ethosomes and cubosomes for transcutaneous immunisation: Characterisation and in vitro skin penetration. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 64, p. 1560–1569, 2012.
67. Huy X. Ngo, Sylvie Garneau-Tsodikova, and K. D. G. A complex game of hide and seek: the search for new antifungals. **Med. Chem. Commun.** v. 7, p. 1285–1306, 2016.
68. Kulkarni, S. K. **Nanotechnology: Principles and Practices.** 3a edição. India: Springer, 2014, 403 p.
69. Zoabi, A.; Touitou, E.; Margulis, K. Recent advances in nanomaterials for dermal and transdermal applications. **Colloids and Interfaces.** v. 5, p. 18, 2021.
70. Alvarado, H. L.; Abrego, G.; Souto, E. B.; Garduño-Ramirez, M. L.; Clares, B.; García,

- M. L.; Calpena, A. C. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**. v. 130, p. 40–47, 2015.
71. Negi, P.; Singh, B.; Sharma, G.; Beg, S.; Katare, O. P. Biocompatible lidocaine and prilocaine loaded-nanoemulsion system for enhanced percutaneous absorption: QbD-based optimisation, dermatokinetics and in vivo evaluation. **J. Microencapsul.** v. 32, p. 419–431, 2015.
 72. Kaur, A.; Katiyar, S. S.; Kushwah, V.; Jain, S. Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. *Nanomedicine Nanotechnology*, **Biol. Med.** v. 13, p. 1473–1482, 2017.
 73. Roque, L. V.; Dias, I. S.; Cruz, N.; Rebelo, A.; Roberto, A.; Rijo, P.; Reis, C. P. Design of Finasteride-Loaded Nanoparticles for Potential Treatment of Alopecia. **Skin Pharmacol. Physiol.** v. 30, p. 197–204, 2017.
 74. Ikawati, Z.; Murwanti, R.; Meliana, Y.; Kartika, W. The effect of nanoencapsulated centella. **Int. J. Pharm. Sci. Res.** v. 147, p. 11–40, 2016.
 75. Freire, T. B.; Dario, M. F.; Mendes, O. G.; de Oliveira, A. C.; Neto, A. V.; de Faria, D. L. A.; E Silva, V. R. L.; Baby, A. R.; Velasco, M. V. R. Nanoemulsion containing caffeine for cellulite treatment: Characterization and in vitro evaluation. **Brazilian J. Pharm. Sci.** v. 55, p. 1–11, 2019.
 76. Taleb, M. H.; Abdeltawab, N. F.; Shamma, R. N.; Abdelgayed, S. S.; Mohamed, S. S.; Farag, M. A.; Ramadan, M. A. *Origanum vulgare* L. Essential oil as a potential anti-acne topical nanoemulsion—in vitro and in vivo study. **Molecules**. v. 23, p. 2164, 2018.
 77. Arianto, A.; Cindy, C. Preparation and evaluation of sunflower oil nanoemulsion as a sunscreen. **Open Access Maced. J. Med. Sci.** v. 7, p. 3757–3761, 2019.
 78. Jacobus Berlitz, S.; De Villa, D.; Maschmann Inácio, L. A.; Davies, S.; Zatta, K. C.; Guterres, S. S.; Külkamp-Guerreiro, I. C. Azelaic acid-loaded nanoemulsion with hyaluronic acid—a new strategy to treat hyperpigmentary skin disorders. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 45, p. 642–650, 2019.
 79. Barradas, T. N.; de Campos, V. E. B.; Senna, J. P.; Coutinho, C. dos S. C.; Tebaldi, B. S.; Silva, K. G. de H. e.; Mansur, C. R. E. Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. **Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.** v. 480, p. 214–221, 2015.
 80. Sinha, P.; Srivastava, S.; Mishra, N.; Singh, D. K.; Luqman, S.; Chanda, D.; Yadav, N. P. Development, optimization, and characterization of a novel tea tree oil nanogel using response surface methodology. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 42, p. 1434–1445, 2016.
 81. Ricaurte, L.; Hernández-Carrión, M.; Moyano-Molano, M.; Clavijo-Romero, A.; Quintanilla-Carvajal, M. X. Physical, thermal and thermodynamical study of high oleic palm oil nanoemulsions. **Food Chem.** v. 256, p. 62–70, 2018.
 82. Ramalingam, K.; Frohlich, N. C.; Lee, V. A. Effect of nanoemulsion on dental unit waterline biofilm. **J. Dent. Sci.** v. 8, p. 333–336, 2013.
 83. Joaquim, A. R. **Síntese de derivados de 8-Hidroxiquinolina e a avaliação da atividade antimicrobiana**. 2018. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
 84. El-Naggar, M. E.; Abdelgawad, A. M.; Abdel-Sattar, R.; Gibriel, A. A.; Hemdan, B. A. Potential antimicrobial and antibiofilm efficacy of essential oil nanoemulsion loaded polycaprolactone nanofibrous dermal patches. **Eur. Polym. J.** v. 184, p. 111782, 2023.
 85. Song, Z.; Sun, H.; Yang, Y.; Jing, H.; Yang, L.; Tong, Y.; Wei, C.; Wang, Z.; Zou, Q.; Zeng, H. Enhanced efficacy and anti-biofilm activity of novel nanoemulsions against skin burn wound multi-drug resistant MRSA infections. **Nanomedicine**. v. 12, p. 1543–1555, 2016.

86. McClements, D. J.; Jafari, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Adv. Colloid Interface Sci.** v. 251, p. 55–79, 2018.
87. Ahn, C. H.; Barnes, P. D.; Al., E. Springer Handbook of Nanotechnology. 3 ed. Berlin: Springer. 2004. 1964 p.
88. Joe, M. M.; Benson, A.; Saravanan, V. S.; Sa, T. In vitro antibacterial activity of nanoemulsion formulation on biofilm, AHL production, hydrolytic enzyme activity, and pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v. 91, p. 46–55, 2015.
89. Yang, H.; Zhan, X.; Song, L.; Cheng, S.; Su, R.; Zhang, Y.; Guo, D.; Lü, X.; Xia, X.; Shi, C. Synergistic antibacterial and anti-biofilm mechanisms of ultrasound combined with citral nanoemulsion against *Staphylococcus aureus* 29213. **Int. J. Food Microbiol.** v. 391–393, p. 110150, 2023.
90. Dias, D. de O.; Colombo, M.; Kelmann, R. G.; Kaiser, S.; Lucca, L. G.; Teixeira, H. F.; Limberger, R. P.; Veiga, V. F.; Koester, L. S. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Ind. Crops Prod.** v. 59, p. 154–162, 2014.
91. Pelgrift, R. Y.; Friedman, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 65, p. 1803–1815, 2013.
92. Khezerlou, A.; Alizadeh-Sani, M.; Azizi-Lalabadi, M.; Ehsani, A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. **Microb. Pathog.** v. 123, p. 505–526, 2018.
93. Dalla Lana, D. F.; Giuliani, L. M.; Reolon, J. B.; Lopes, W.; Vainstein, M. H.; Danielli, L. J.; Bergamo, V. Z.; Pippi, B.; Apel, M. A.; Teixeira, M. L.; de Oliveira, L. F. S.; Machado, M. M.; de Andrade, S. F.; Marcus M., S.; Ferreira, M.; Munaretto, L. S.; Cruz, L.; Silveira, G. P.; Elayne, E.; Fuentefria, A. M. Nanoemulsion Improves the Antifungal Activity of Allylic Thiocyanates against Yeasts and Filamentous Pathogenic Fungi. **ChemistrySelect.** v. 3, p. 11663–11670, 2018.
94. Kamp, F.; Zakim, D.; Zhang, F.; Hamilton, J. A. Fatty Acid Flip-Flop in Phospholipid Bilayers Is Extremely. **Biochemistry.** v. 34, p. 11928–11937, 1995.
95. Kim, Y. J.; Kim, B. K.; Lee, M. H. Effect of small molecular surfactants on physical, turbidimetric, and rheological properties of Pickering nanoemulsions stabilized with whey protein isolate. **Food Biosci.** v. 51, p. 102214, 2023.
96. Mandal, S.; Kuchlyan, J.; Ghosh, S.; *et al.* Vesicles Formed in Aqueous Mixtures of Cholesterol and Imidazolium Surface Active Ionic Liquid: A Comparison with Common Cationic Surfactant by Water Dynamics. **J. Phys. Chem. B.** v. 118, p. 5913–5923, 2014.
97. Buettner, C. S.; Cognigni, A.; Schröder, C.; Bica-Schröder, K. Surface-active ionic liquids: A review. **J. Mol. Liq.** v. 347, p. 118160, 2022.
98. Alvarez, V. H.; Mattedi, S.; Martin-Pastor, M.; Aznar, M.; Iglesias, M. Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxy ethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}. **J. Chem. Thermodyn.** v. 43, p. 997–1010, 2011.
99. Oliveira, L. M. C.; Iglesias, M.; Mattedi, S.; Boaventura, J. S. Síntese e caracterização de novos Líquidos Iônicos. In: 19º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS–CBECiMat, Campos do Jordão. Brasil, 2010.
100. Pereira, S. C.; Bussamara, R.; Marin, G.; Giordano, R. L. C.; Dupont, J.; Giordano, R. C. Enzymatic synthesis of amoxicillin by penicillin G acylase in the presence of ionic liquids. **Green Chem.** v. 14, p. 3146–3156, 2012.
101. Ferreira, G. A. **Identificação de Líquidos Iônicos Práticos como solventes para aplicações em biocatálise.** 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

102. Mattedi, S.; Carvalho, P. J.; Coutinho, J. A. P.; Alvarez, V. H.; Iglesias, M. High pressure CO₂ solubility in N-methyl-2-hydroxyethylammonium protic ionic liquids. **J. Supercrit. Fluids**. v. 56, p. 224–230, 2011.
103. Oliveira, L.; José, N. M.; Boaventura, J.; Iglesias, M.; Mattedi, S. Proton conducting polymer membrane using the ionic liquid 2-hydroxyethylammonium lactate for ethanol fuel cells. **AIP Conf. Proc.** v. 1400, p. 149–153, 2011.
104. Zhao, C.; Burrell, G.; Torriero, A. A. J.; Separovic, F.; Dunlop, N. F.; MacFarlane, D. R.; Bond, A. M. Electrochemistry of room temperature protic ionic liquids. **J. Phys. Chem. B**. v. 112, p. 6923–6936, 2008.
105. Olivier-Bourbigou, H.; Magna, L.; Morvan, D. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. **Appl. Catal. A Gen.** v. 373, p. 1–56, 2010.
106. Correia, D. M.; Fernandes, L. C.; Martins, P. M.; García-Astrain, C.; Costa, C. M.; Reguera, J.; Lanceros-Méndez, S. Ionic Liquid–Polymer Composites: A New Platform for Multifunctional Applications. **Adv. Funct. Mater.** v. 30, p. 1–43, 2020.
107. Wong, C. Y.; Wong, W. Y.; Loh, K. S.; Lim, K. L. Protic ionic liquids as next-generation proton exchange membrane materials: Current status & future perspectives. **React. Funct. Polym.** v. 171, p. 105160, 2022.
108. Greaves, T. L.; Drummond, C. J. Protic ionic liquids: Properties and applications. **Chem. Rev.** v. 108, p. 206–237, 2008.
109. Ju, C.; Zhao, Q.; Wang, X. Tribological performance of protic ionic liquids containing dibutyldithiophosphate as lubricating additives in O/W emulsions. **Lubr. Sci.** v. 35, p. 1–13, 2023.
110. Avilés, M. D.; Sánchez-Rodríguez, C.; Pamies, R.; Bermúdez, M. D.; Carrión-Vilches, F. J.; Sanfelix, S. G.; Kjøniksen, A. L. New Water-Ethylene Glycol Lubricants with Stearate Ionic Liquid Crystal Additive. **Lubricants**. v. 10, p. 1–16, 2022.
111. Moreno, M.; Aboudzadeh, M. A.; Barandiaran, M. J.; Mecerreyes, D. Facile incorporation of natural carboxylic acids into polymers via polymerization of protic ionic liquids. **J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.** v. 50, p. 1049–1053, 2012.
112. Yao, J. G.; Tan, S. Y.; Metcalfe, P. I.; Fennell, P. S.; Kelsall, G. H.; Hallett, J. P. Demetallization of Sewage Sludge Using Low-Cost Ionic Liquids. **Environ. Sci. Technol.** v. 55, p. 5291–5300, 2021.
113. Ismail Hossain, M.; El-Harbawi, M.; Noaman, Y. A.; Bustam, M. A. B.; Alitheen, N. B. M.; Affandi, N. A.; Hefter, G.; Yin, C. Y. Synthesis and anti-microbial activity of hydroxylammonium ionic liquids. **Chemosphere**. v. 84, p. 101–104, 2011.
114. Bulgasem, B. Y.; Lani, M. N.; Hassan, Z.; Wan Yusoff, W. M.; Fnaish, S. G. Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against Pathogenic *Candida* species. **Mycobiology**. v. 44, p. 302–309, 2016.
115. Liu, A.; Xu, R.; Zhang, S.; Wang, Y.; Hu, B.; Ao, X.; Li, Q.; Li, J.; Hu, K.; Yang, Y.; Liu, S. Antifungal Mechanisms and Application of Lactic Acid Bacteria in Bakery Products: A Review. **Front. Microbiol.** v. 13, 2022.
116. Innocenti, Alessio; Hall, Rebecca A.; Schlicker, Christine; Mühlischlegel, Fritz A.; Supuran, Claudiu T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the b-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with aliphatic and aromatic carboxylates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 2654–2657, 2009.
117. Neto, A. C. R.; Maraschin, M.; Di Piero, R. M. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. **Int. J. Food Microbiol.** v. 215, p. 64–70, 2015.
118. Pasqualim, P. **Estudo Da Microencapsulação De Ácido Salicílico Com Aplicação Dermocósmética**. 2015. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -

Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

119. Fuentefria, A. M. Pesquisas de Inovação em Saúde - Chamada MS-SCTIE-Decit/CNPq nº 12/2018. 2018.
120. Oliveri, V.; Vecchio, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. **Eur. J. Med. Chem.** v. 120, p. 252–274, 2016.
121. Dixit, R. B.; Vanparia, S. F.; Patel, T. S.; Jaganib, C. L.; Doshi, H. V.; Dixit, B. C. Synthesis and antimicrobial activities of sulfonylhydrazide-substituted 8-hydroxyquinoline derivative and its oxinates. **Appl. Organomet. Chem.** v. 24, p. 408–413, 2010.
122. Wehbe, M.; Malhotra, A. K.; Anantha, M.; Lo, C.; Dragowska, W. H.; Dos Santos, N.; Bally, M. B. Development of a copper-clioquinol formulation suitable for intravenous use. **Drug Deliv. Transl. Res.** v. 8, p. 239–251, 2018.
123. Franklin, R. B.; Zou, J.; Zheng, Y.; Naslund, M. J.; Costello, L. C. Cancer and Clinical Research Prostate Tumor Growth in the Mouse Ectopic Xenograft Model: A Zinc. **ClinMed.** v. 3, p. 1–4, 2016.
124. Zhang, Y. H.; Raymick, J.; Sarkar, S.; Lahiri, D. K.; Ray, B.; Holtzman, D.; Dumas, M.; & Schmued, L. C. Efficacy and toxicity of clioquinol treatment and A-beta42 inoculation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **Curr. Alzheimer Res.** v. 10, n. (5), p. 494–506, 2013.
125. Jacobus Berlitz, S.; Reginatto, P.; Machado, G. da R. M.; Fuentefria, A. M.; Morisso, F. D. P.; Contri, R. V.; Külkamp-Guerreiro, I. C. Development of a Clioquinol Nanocarrier as a New, Promising Option for the Treatment of Dermatomycosis. **Pharmaceutics.** v. 15, p. 1–14, 2023.
126. Coelho, F. L.; Rodembusch, F. S.; Campo, L. F. Synthesis, characterization and photophysics of new photoactive esipt lipophilic dyes. partition experiments with different composed liposomes. **Dye. Pigment.** v. 110, p. 134–142, 2014.
127. Andrade, R.; Torres, D.; Ribeiro, F. R.; Chiari-Andréo, B. G.; Oshiro Junior, J. A.; Iglesias, M. Sustainable Cotton Dyeing in Nonaqueous Medium Applying Protic Ionic Liquids. **ACS Sustain. Chem. Eng.** v. 5, p. 8756–8765, 2017.
128. Burrell, G. L.; Burgar, I. M.; Separovic, F.; Dunlop, N. F. Preparation of protic ionic liquids with minimal water content and 15N NMR study of proton transfer. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 12, p. 1571–1577, 2010.
129. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. **Princípios de análise instrumental.** 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009. 1056 p.
130. Franken Dick, P.; Coelho, F. L.; Rodembusch, F. S.; Campo, L. F. Amphiphilic ESIPT benzoxazole derivatives as prospective fluorescent membrane probes. **Tetrahedron Lett.** v. 55, p. 3024–3029, 2014.
131. Pinilla, C. M. B.; Thys, R. C. S.; Brandelli, A. Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic against environmental fungal in wheat bread. **Int. J. Food Microbiol.** v. 293, p. 72–78, 2019.
132. Pinkert, A.; Marsh, K. N.; Pang, S. Alkanolamine Ionic Liquids and Their Inability To Dissolve Crystalline Cellulose. **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 49, p. 11121–11130, 2010.
133. Quatrin, P. M.; Kaminski, T. F. A.; Berlitz, S. J.; Guerreiro, I. C. K.; Canto, R. F. S.; Fuentefria, A. M. Ex vivo nail infection as an effective preclinical method for screening of new topical antifungals. **J. Mycol. Med.** v. 30, p. 100938, 2020.
134. Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Res. Lett.** v. 8, p. 1–9, 2013.
135. Elhissi, A. Liposomes for Pulmonary Drug Delivery: The Role of Formulation and Inhalation Device Design. **Curr. Pharm. Des.** v. 23, p. 362–372, 2017.
136. Sharma, A.; Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **Int. J.**

- Pharm.** v. 154, p. 123–140, 1997.
137. Malvern Instruments. *Biotechnology: The Characterisation and use of liposomes*.
 138. Soares, V. F. **Dispersão e estabilização de partículas submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários**. 2009. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.
 139. Cardoso, A. M.; de Oliveira, E. G.; Coradini, K.; Bruinsmann, F. A.; Aguirre, T.; Lorenzoni, R.; Barcelos, R. C. S.; Roversi, K.; Rossato, D. R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Burger, M. E.; Beck, R. C. R. Chitosan hydrogels containing nanoencapsulated phenytoin for cutaneous use: Skin permeation/penetration and efficacy in wound healing. **Mater. Sci. Eng. C** v. 96, p. 205–217, 2019.
 140. Keivani Nahr, F.; Ghanbarzadeh, B.; Hamishehkar, H.; Kafil, H. S.; Hoseini, M.; Moghadam, B. E. Investigation of physicochemical properties of essential oil loaded nanoliposome for enrichment purposes. **Lwt** v. 105, p. 282–289, 2019.
 141. Liao, S.; Yang, G.; Wang, Z.; Ou, Y.; Huang, S.; Li, B.; Li, A.; Kan, J. Ultrasonic preparation of Tween-essential oil (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc) oil/water nanoemulsion: Improved stability and alleviation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm. **Ind. Crops Prod** v. 188, p. 115654, 2022.
 142. Nikezić, A. V. V.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M. Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures. **Eur. J. Pharm. Sci** v. 151, p. 105412, 2020.
 143. Schulte to Brinke, A.; Mehlich, A.; Doberenz, C.; Janssens-Böcker, C. Acidification of the Skin and Maintenance of the Physiological Skin pH Value by Buffered Skin Care Products Formulated around pH 4. **J. Cosmet. Dermatological Sci. Appl** v. 11, p. 44–57, 2021.
 144. Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **Int. J. Cosmet. Sci** v. 28, p. 359–370, 2006.
 145. Salentinig, S.; Sagalowicz, L.; Glatter, O. Self-assembled structures and pK a value of oleic acid in systems of biological relevance. **Langmuir** v. 26, p. 11670–11679, 2010.
 146. Wiley, J. W. & S. Spectrabase. Disponível em: <https://spectrabase.com/spectrum/maQGnVQ8dN>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2023.
 147. Klymchenko, A. S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. **Acc. Chem. Res** v. 50, p. 366–375, 2017.
 148. Rodembusch, F. S.; Leusin, F. P.; Campo, L. F.; Stefani, V. Excited state intramolecular proton transfer in amino 2-(2'-hydroxyphenyl) benzazole derivatives: Effects of the solvent and the amino group position. **J. Lumin** v. 126, p. 728–734, 2007.
 149. Banerjee, C.; Ghosh, S.; Mandal, S.; Kuchlyan, J.; Kundu, N.; Sarkar, N. Exploring the photophysics of curcumin in zwitterionic micellar system: An approach to control ESIPT process in the presence of room temperature ionic liquids (RTILs) and anionic surfactant. **J. Phys. Chem. B** v. 118, p. 3669–3681, 2014.
 150. Manna, A.; Sayed, M.; Kumar, A.; Pal, H. Atypical energetic and kinetic course of Excited-State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) in room-temperature protic ionic liquids. **J. Phys. Chem. B** v. 118, p. 2487–2498, 2014.
 151. Pandey, S.; Baker, S. N.; Pandey, S.; Baker, G. A. Fluorescent probe studies of polarity and solvation within room temperature ionic liquids: A review. **J. Fluoresc** v. 22, p. 1313–1343, 2012.
 152. Das, P.; Chakrabarty, A.; Haldar, B.; Mallick, A.; Chattopadhyay, N. Effect of cyclodextrin nanocavity confinement on the photophysics of a β -carboline analogue: A spectroscopic study. **J. Phys. Chem. B** v. 111, p. 7401–7408, 2007.
 153. Suda, K.; Terazima, M.; Sato, H.; Kimura, Y. Excitation wavelength dependence of excited state intramolecular proton transfer reaction of 4'- N,N-diethylamino-3-

- hydroxyflavone in room temperature ionic liquids studied by optical kerr gate fluorescence measurement. **J. Phys. Chem. B.** v. 117, p. 12567–12582, 2013.
154. Cota, I.; Gonzalez-Olmos, R.; Iglesias, M.; Medina, F. New short aliphatic chain ionic liquids: Synthesis, physical properties, and catalytic activity in aldol condensations. **J. Phys. Chem. B.** v. 111, p. 12468–12477, 2007.
 155. Gill, P.; Moghadam, T. T.; Ranjbar, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **J. Biomol. Tech.** v. 21, p. 167–193, 2010.
 156. Earle, M. J.; Esperança, J. M. S. S.; Gilea, M. A.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N.; Magee, J. W.; Seddon, K. R.; Widegren, J. A. The distillation and volatility of ionic liquids. **Nature.** v. 439, p. 831–834, 2006.
 157. Venkatraman, V.; Evjen, S.; Lethesh, K. C. The ionic liquid property explorer: An extensive library of task-specific solvents. **Data.** v. 4, p. 88, 2019.
 158. Pinkert, A.; Ang, K. L.; Marsh, K. N.; Pang, S. Density, viscosity and electrical conductivity of protic alkanolammonium ionic liquids. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 13, p. 5136–5143, 2011.
 159. Komesu, A.; Martins Martinez, P. F.; Lunelli, B. H.; Oliveira, J.; Wolf MacIel, M. R.; MacIel Filho, R. Study of lactic acid thermal behavior using thermoanalytical techniques. **J. Chem.** v. 2017, p. 1-7, 2017.
 160. Marques, C.; Sotiles, A. R.; Farias, F. O.; Oliveira, G.; Mitterer-Daltoé, M. L.; Masson, M. L. Full physicochemical characterization of malic acid: Emphasis in the potential as food ingredient and application in pectin gels. **Arab. J. Chem.** v. 13, p. 9118–9129, 2020.
 161. Abbas, A.; Hussain, M. A.; Amin, M.; Tahir, M. N.; Jantan, I.; Hameed, A.; Bukhari, S. N. A. Multiple cross-linked hydroxypropylcellulose-succinate-salicylate: Prodrug design, characterization, stimuli responsive swelling-deswelling and sustained drug release. **RSC Adv.** v. 5, p. 43440–43448, 2015.
 162. Elnaggar, Y. S. R.; Omran, S.; Hazzah, H. A.; Abdallah, O. Y. Anionic versus cationic bilosomes as oral nanocarriers for enhanced delivery of the hydrophilic drug risedronate. **Int. J. Pharm.** v. 564, p. 410–425, 2019.
 163. Caschera, F.; Stano, P.; Luisi, P. L. Reactivity and fusion between cationic vesicles and fatty acid anionic vesicles. **J. Colloid Interface Sci.** v. 345, p. 561–565, 2010.
 164. Kanicky, J. R.; Shah, D. O. Effect of Premicellar Aggregation on the pKa of Fatty Acid Soap Solutions. **Am. Chem. Soc.** v. 19, p. 2034–2038, 2003.
 165. Ribas, A. D.; Del Ponte, E. M.; Dalbem, A. M.; Dalla-Lana, D.; Bündchen, C.; Donato, R. K.; Schrekker, H. S.; Fuentefria, A. M. Imidazolium salts with antifungal potential for the control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. **J. Appl. Microbiol.** v. 121, p. 445–452, 2016.
 166. Bergamo, V. Z.; Donato, R. K.; Nemitz, M. C.; Acasigua, G. A. X.; Selukar, B. S.; Lopes, W.; Dalla Lana, D. F.; Teixeira, M. L.; Teixeira, H. F.; Schrekker, H. S.; Fuentefria, A. M. Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. **J. Appl. Microbiol.** v. 121, p. 1558–1567, 2016.
 167. Bergamo, V. Z.; Donato, R. K.; Dalla Lana, D. F.; Donato, K. J. Z.; Ortega, G. G.; Schrekker, H. S.; Fuentefria, A. M. Imidazolium salts as antifungal agents: Strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 60, p. 66–71, 2015.
 168. Moghimi, R.; Aliahmadi, A.; Rafati, H.; Abtahi, H. R.; Amini, S.; Feizabadi, M. M. Antibacterial and anti-biofilm activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* oil against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **J. Mol. Liq.** v. 265, p. 765–770, 2018.
 169. Marena, G. D.; Ramos, M. A. dos S.; Carvalho, G. C.; de Lima, L. C.; Nascimento, A. L. C. S. do; Sábio, R. M.; Rodero, C. F.; Spósito, L.; Bauab, T. M.; Chorilli, M. Development and characterization of an amphotericin B - loaded nanoemulsion applied to *Candida auris*

- biofilms control. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v. 74, p. 103566, 2022.
170. Ramalingam, K.; Amaechi, B. T.; Ralph, R. H.; Lee, V. A. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms. **Arch. Oral Biol.** v. 57, p. 15–22, 2012.
171. Chinnaiyan, S. K.; Pandiyan, R.; Natesan, S.; Chindam, S.; Gouti, A. K.; Sugumaran, A. Fabrication of basil oil Nanoemulsion loaded gellan gum hydrogel—evaluation of its antibacterial and anti-biofilm potential. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v. 68, p. 103129, 2022.

9.INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

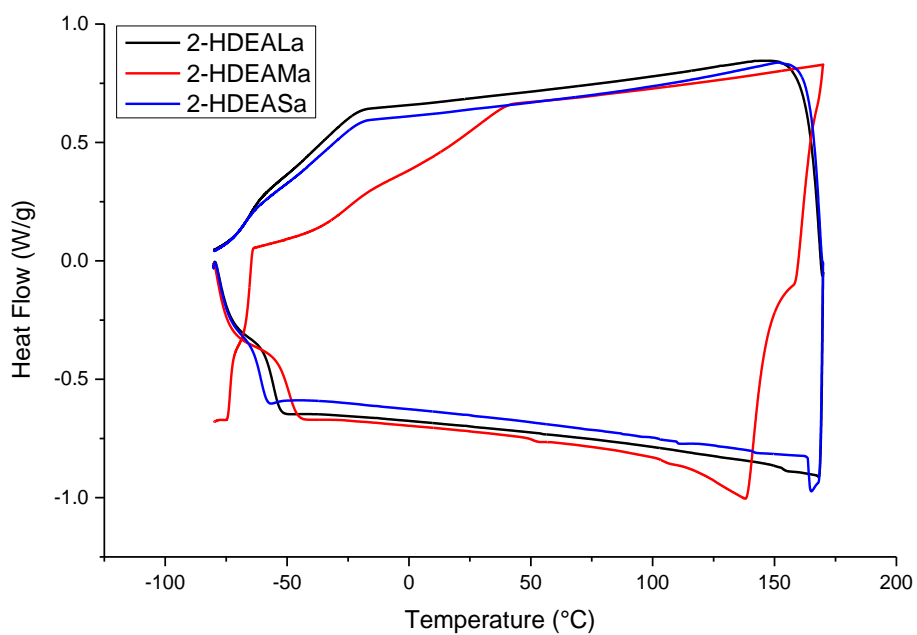


Figura S1: termograma DSC dos líquidos iônicos próticos 2-HDEALa, 2-HDEAMa, 2-HDEASa (puros).

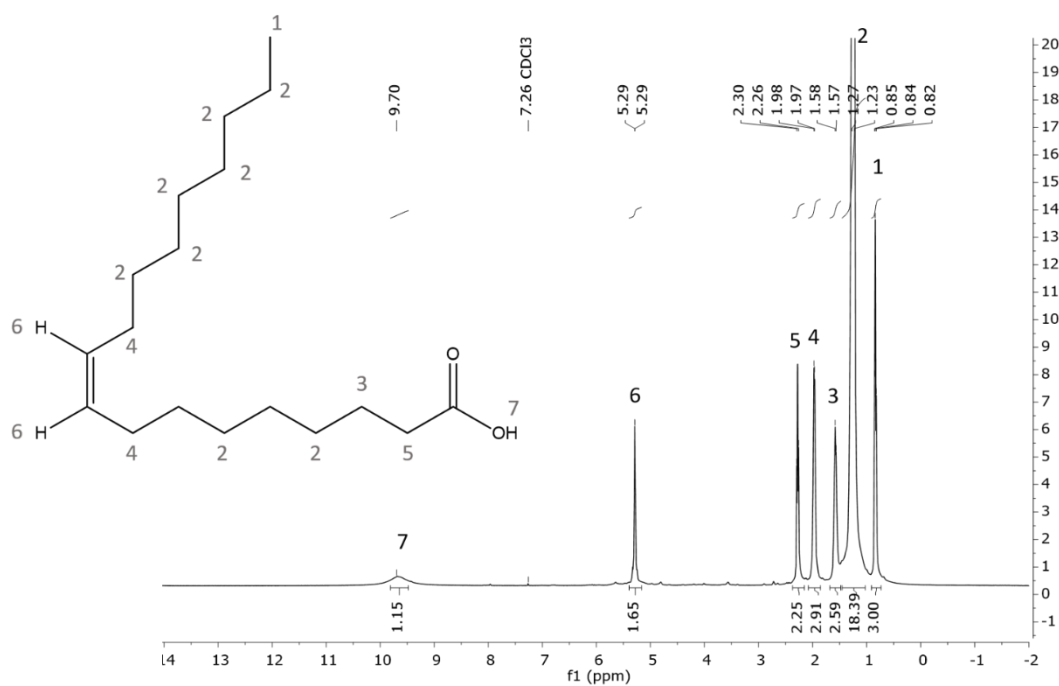


Figura S2: espectro RMN ¹H do ácido oleico.

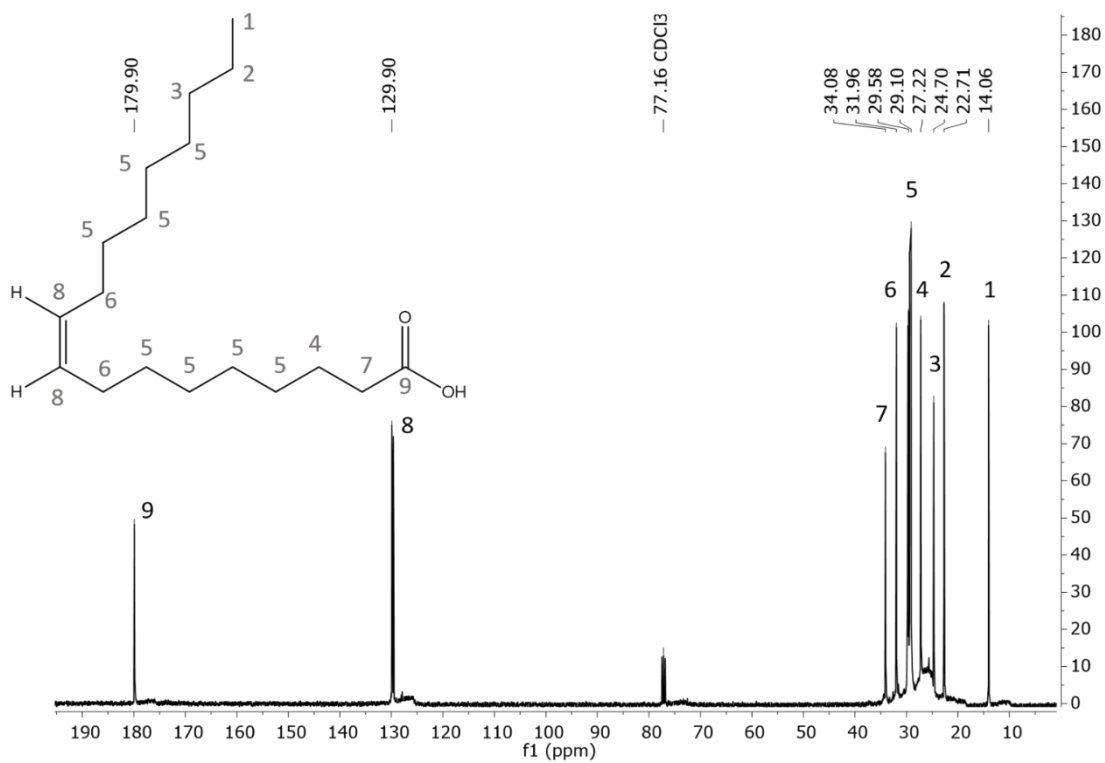


Figura S3: espectro RMN ¹³C do ácido oleico.

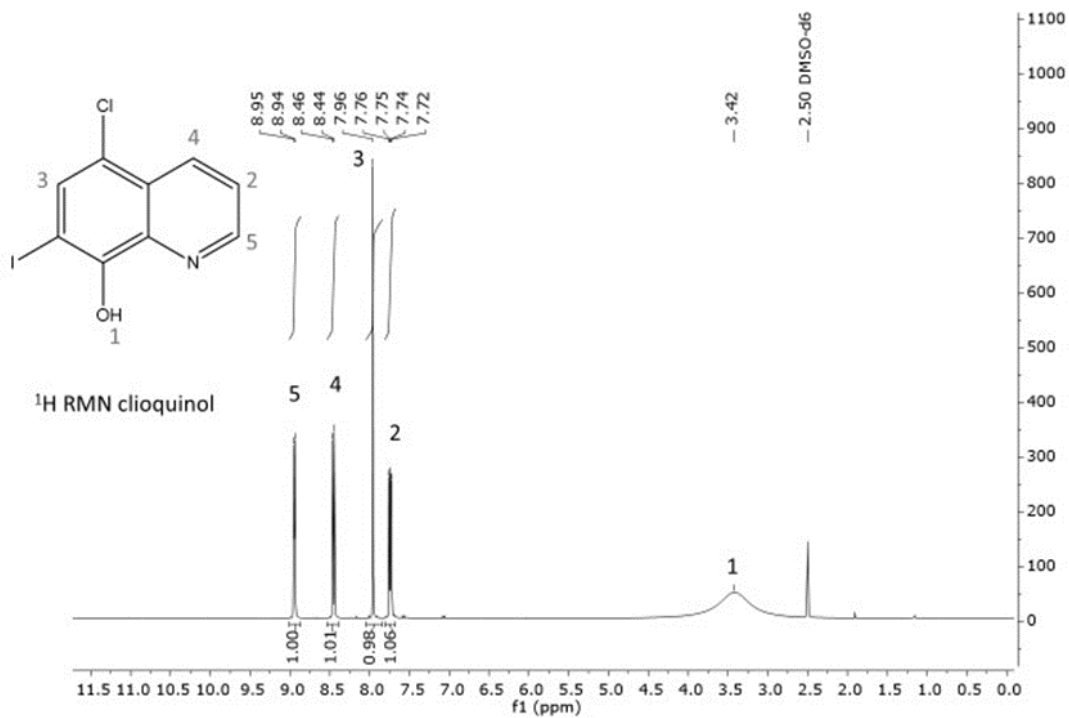


Figura S4. espectro RMN ¹H do clioquinol

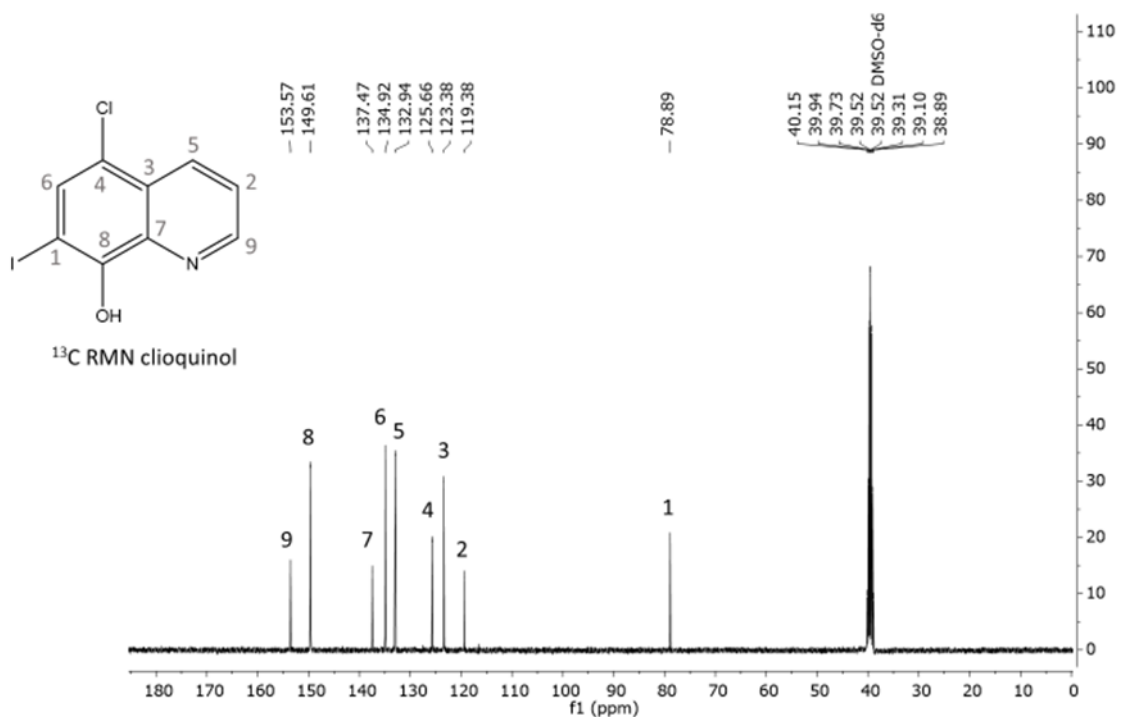


Figura S5. espectro RMN ¹³C do clioquinol

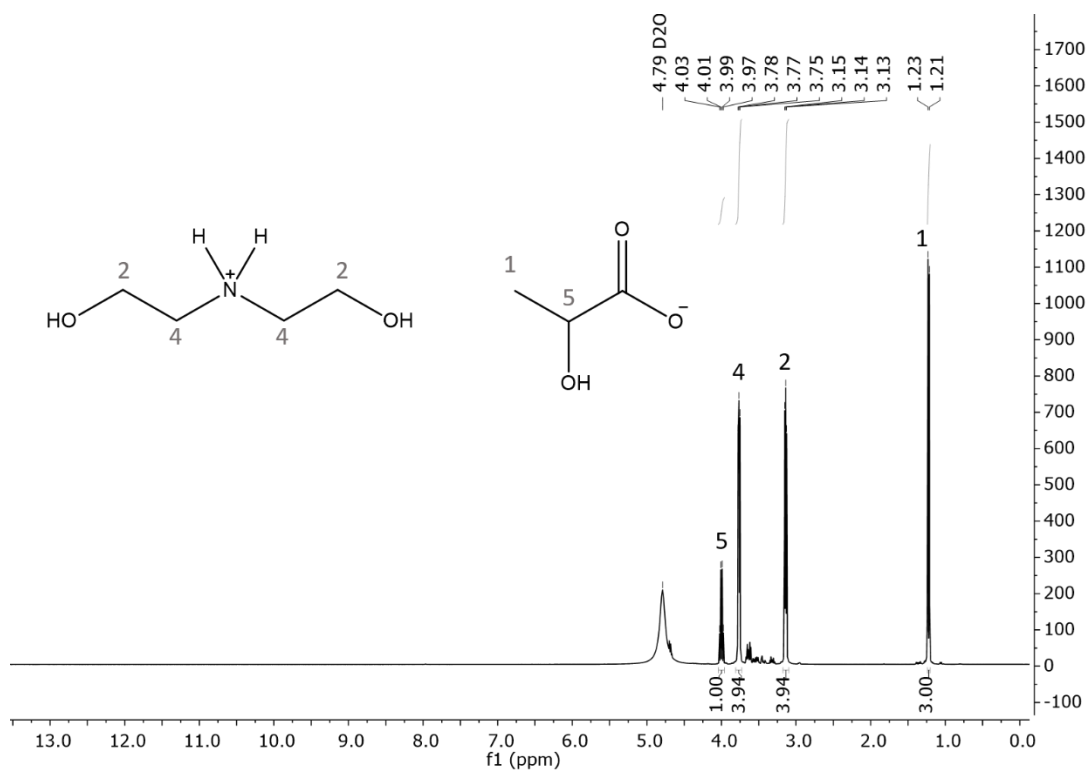


Figura S6: espectro RMN ¹H do líquido iônico prótico 2-HDEALa em DMSO.

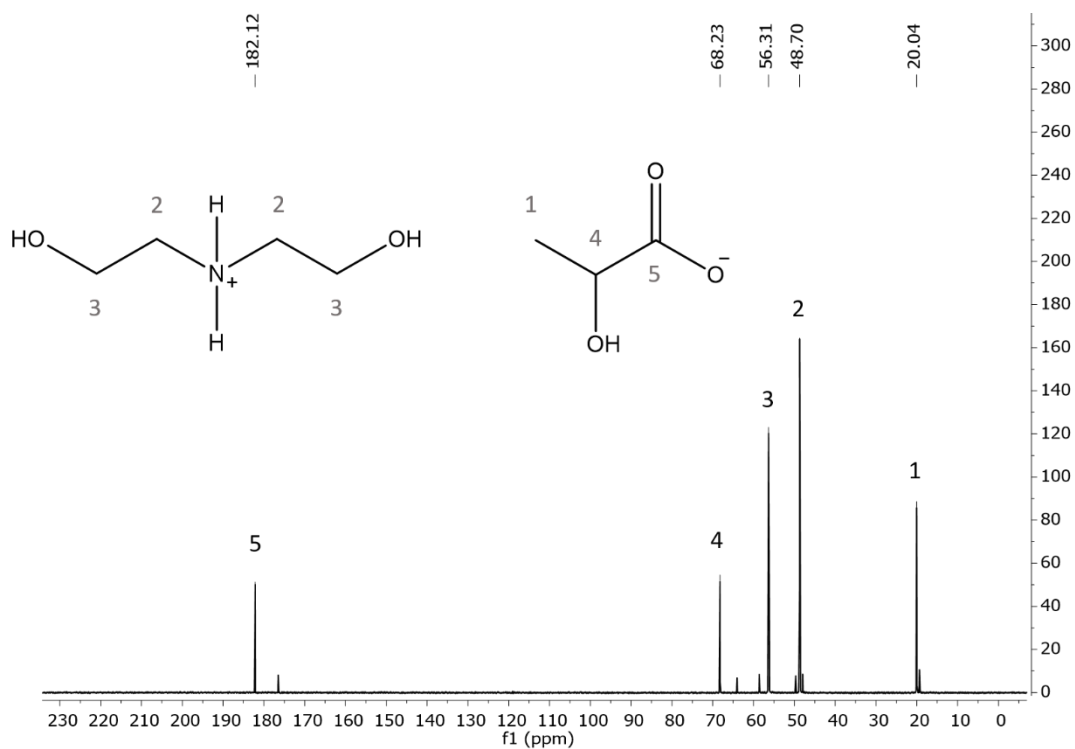


Figura S7: espectro RMN ^{13}C do líquido iônico prótico 2-HDEALa.

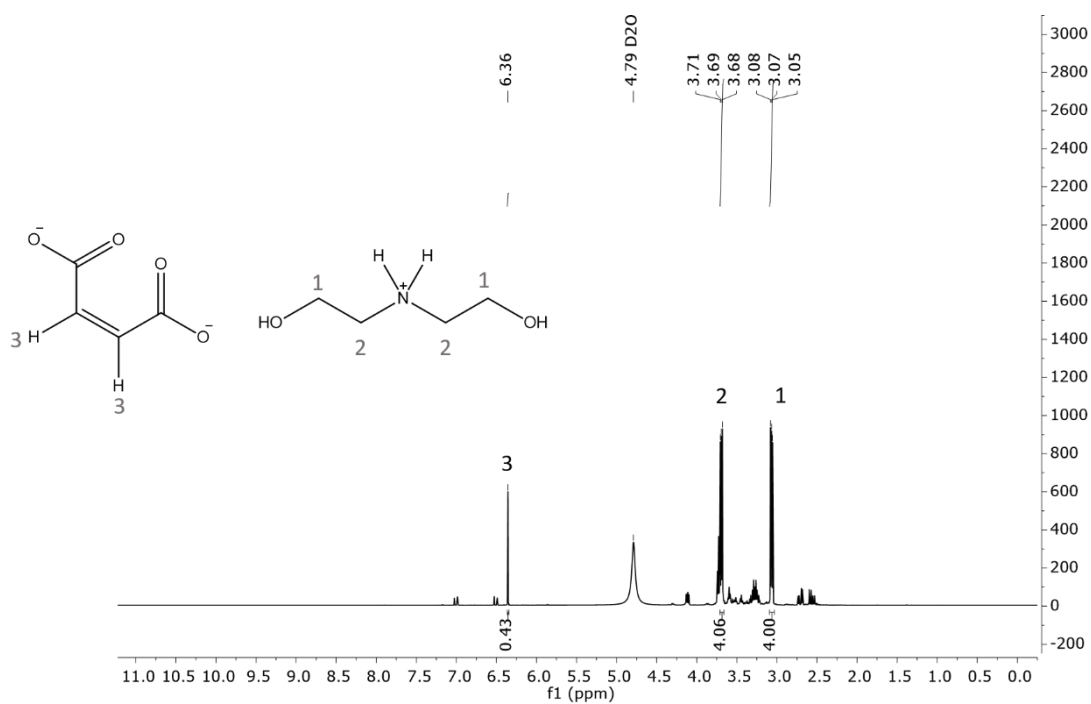


Figura S8: espectro RMN ^1H do líquido iônico prótico 2-HDEAMa em DMSO.

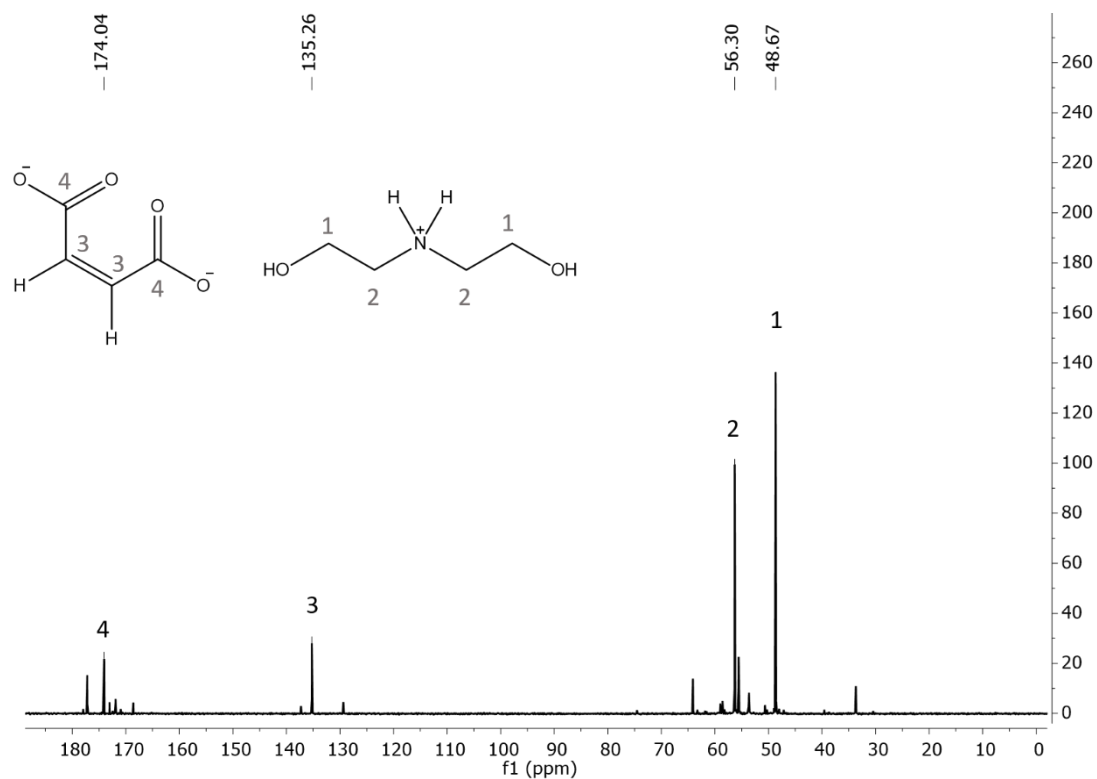


Figura S9: espectro RMN ^{13}C do líquido iônico prótico 2-HDEAMA.

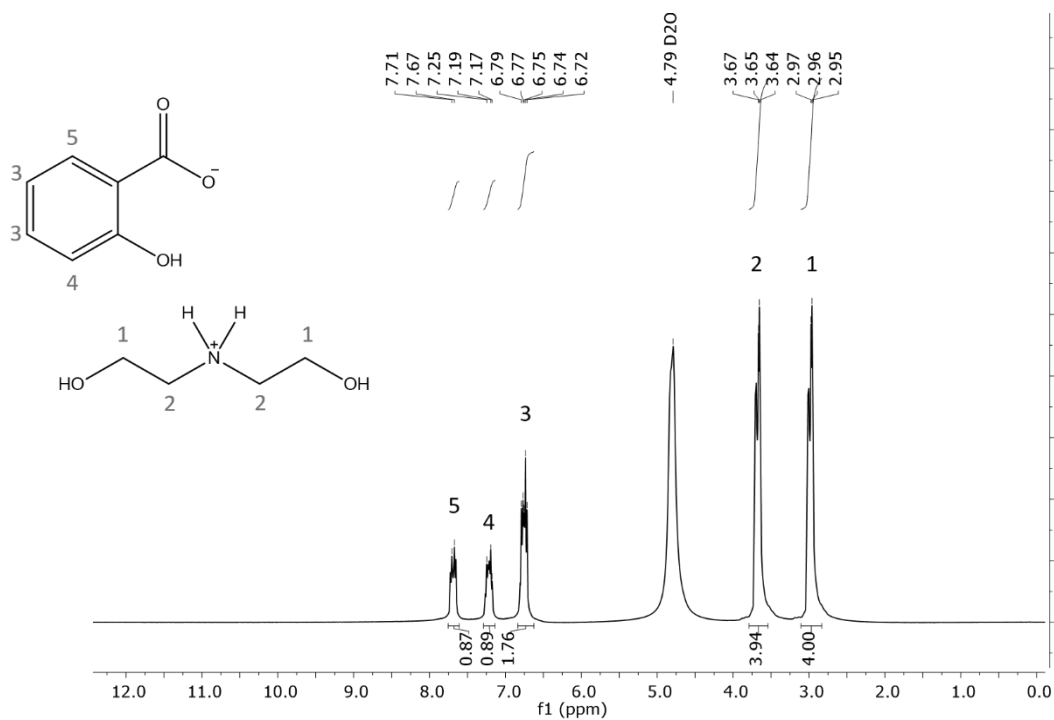


Figura S10: espectro RMN ^1H do líquido iônico prótico 2-HDEASa em DMSO.

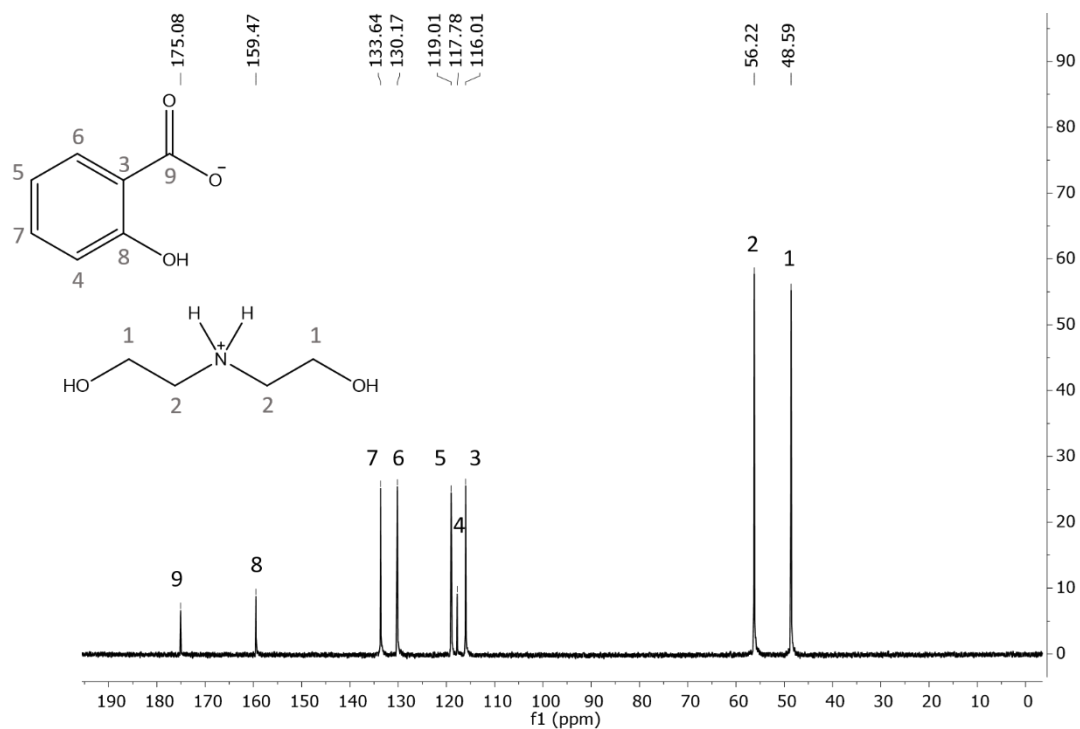


Figura S11: espectro RMN ^{13}C do líquido iônico prótico 2-HDEASa.

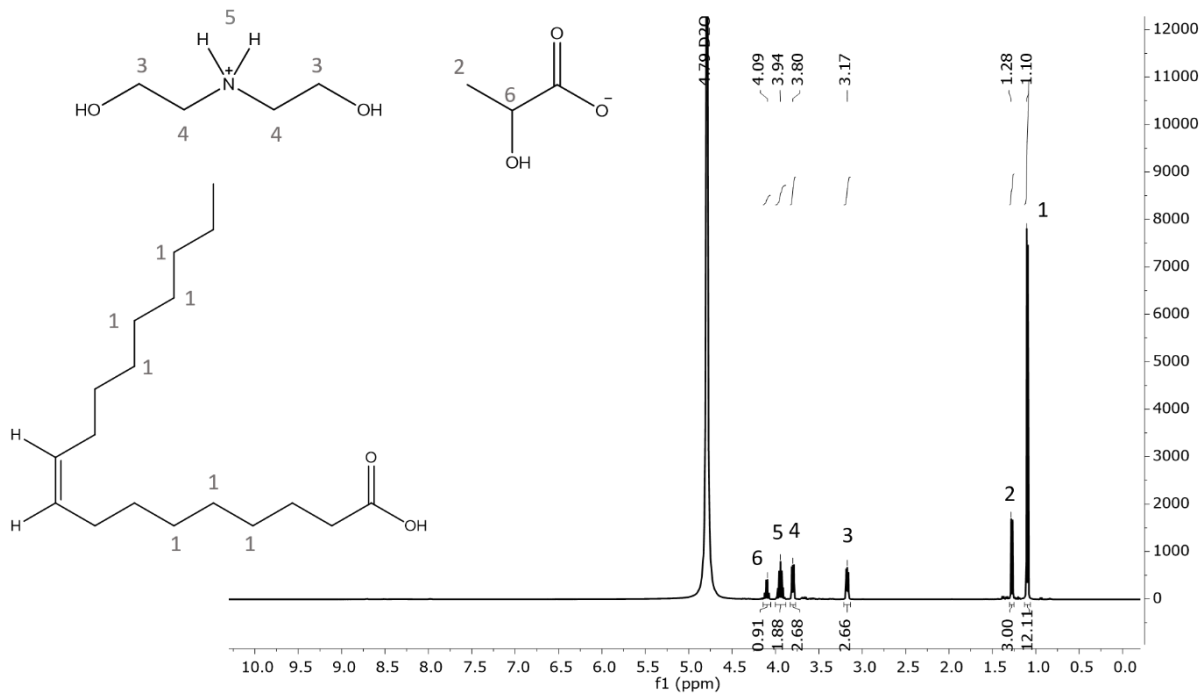


Figura S12. espectro RMN ^1H (400 MHz) da miniemulsão com o LIP2-HDEALa em D_2O

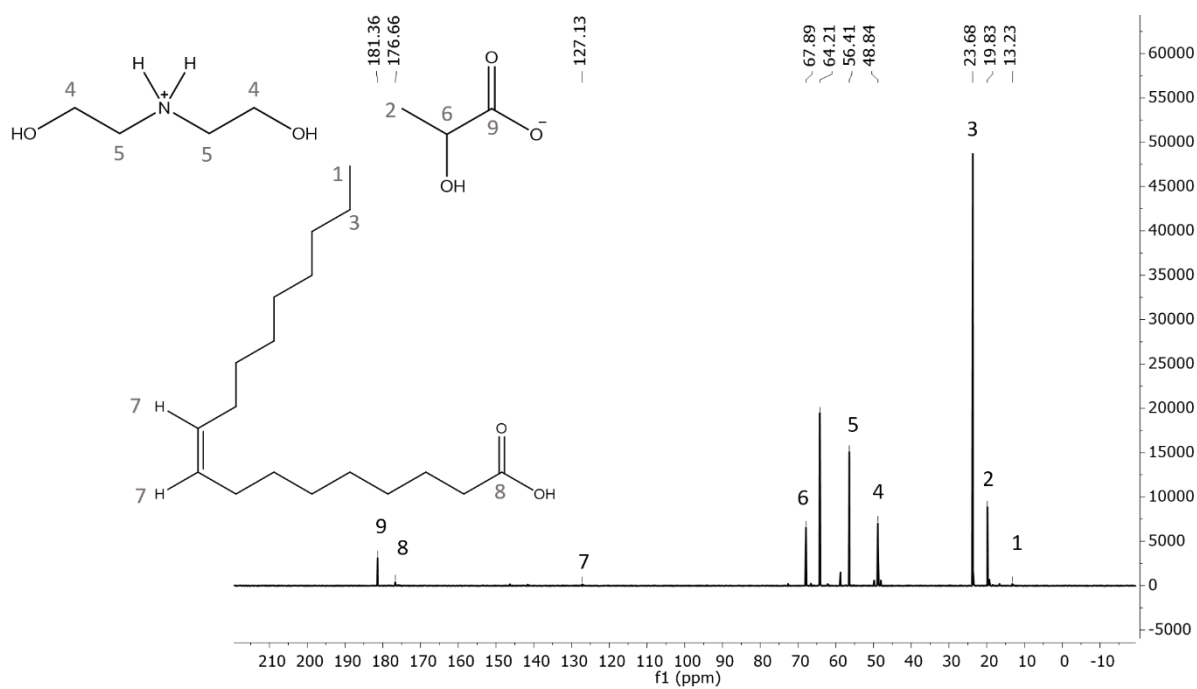


Figura S13. espectro RMN ^{13}C (100 MHz) da miniemulsão com o LIP2-HDEALa em D_2O

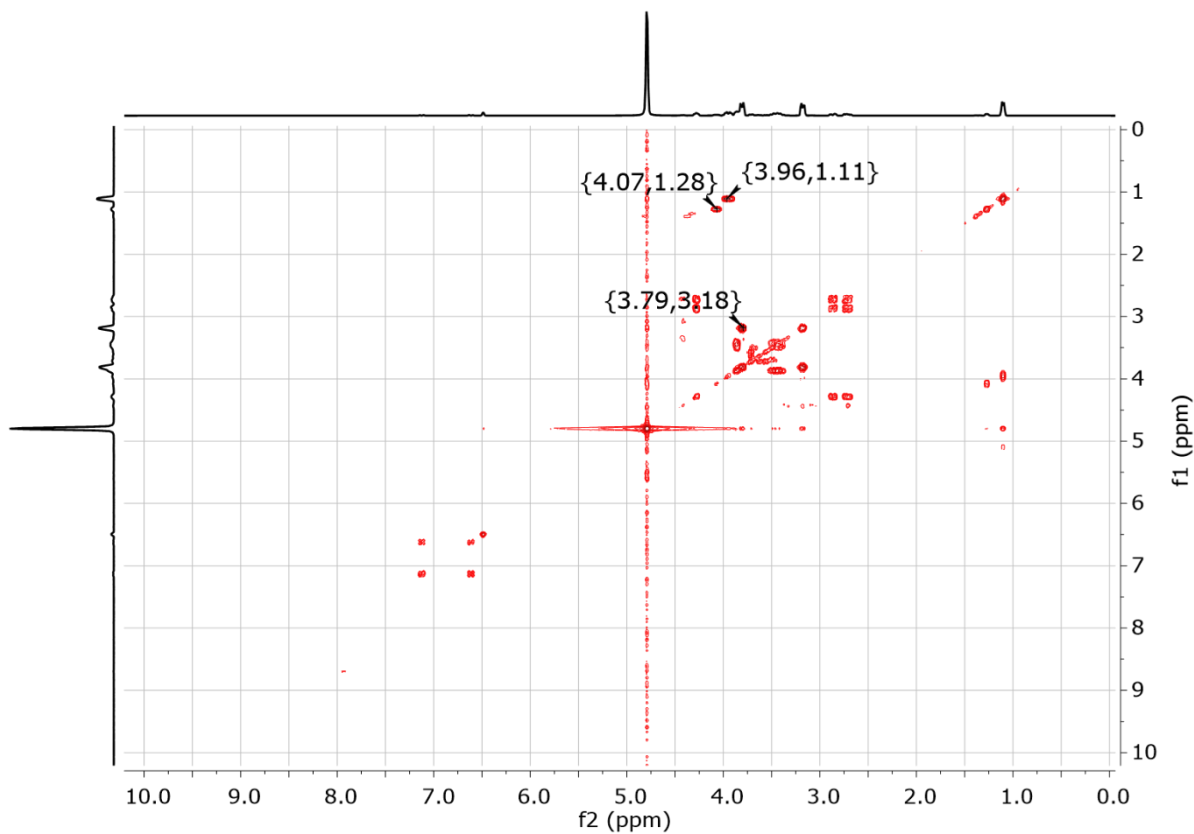


Figura S14. ^1H - ^1H COSY mapa de contorno da miniemulsão com o LIP 2-HDEALa em D_2O

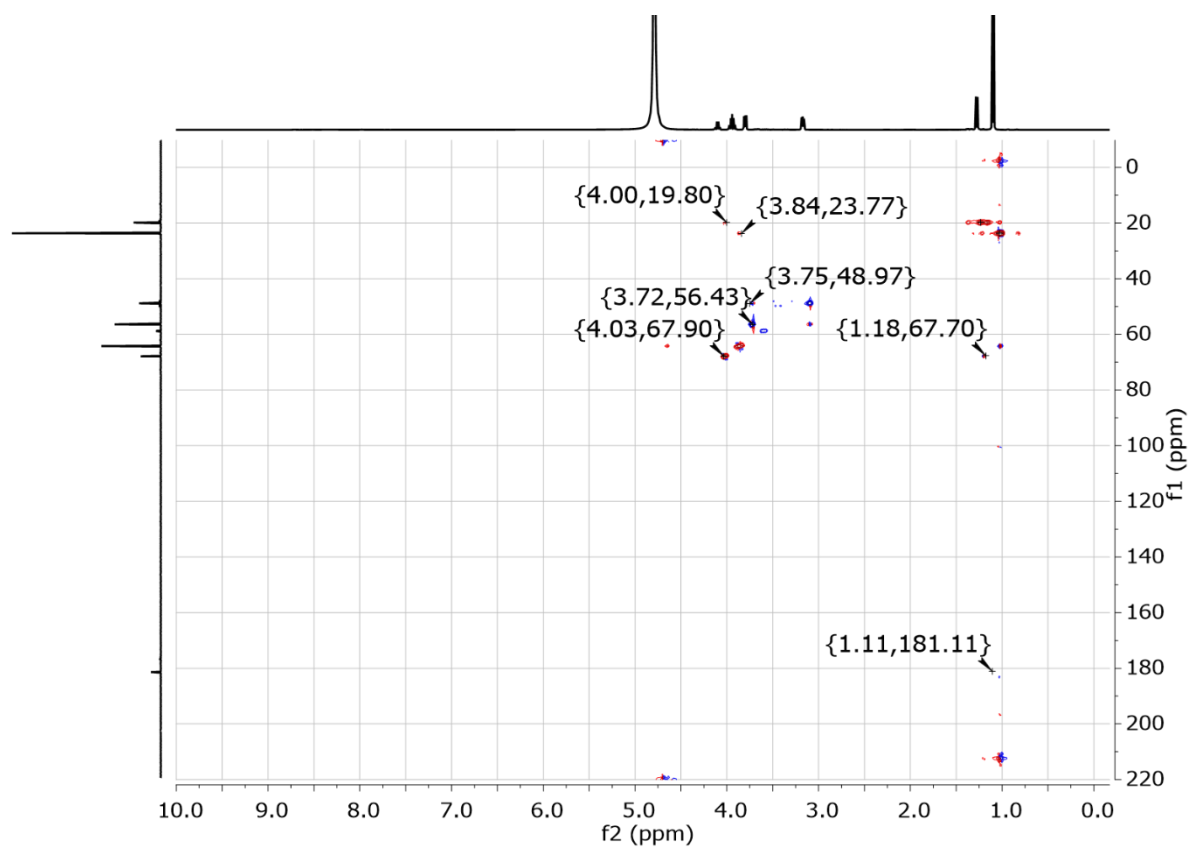


Figura S15. ^1H - ^{13}C HSQC mapa de contorno da miniemulsão com o LIP 2-HDEALa em D_2O

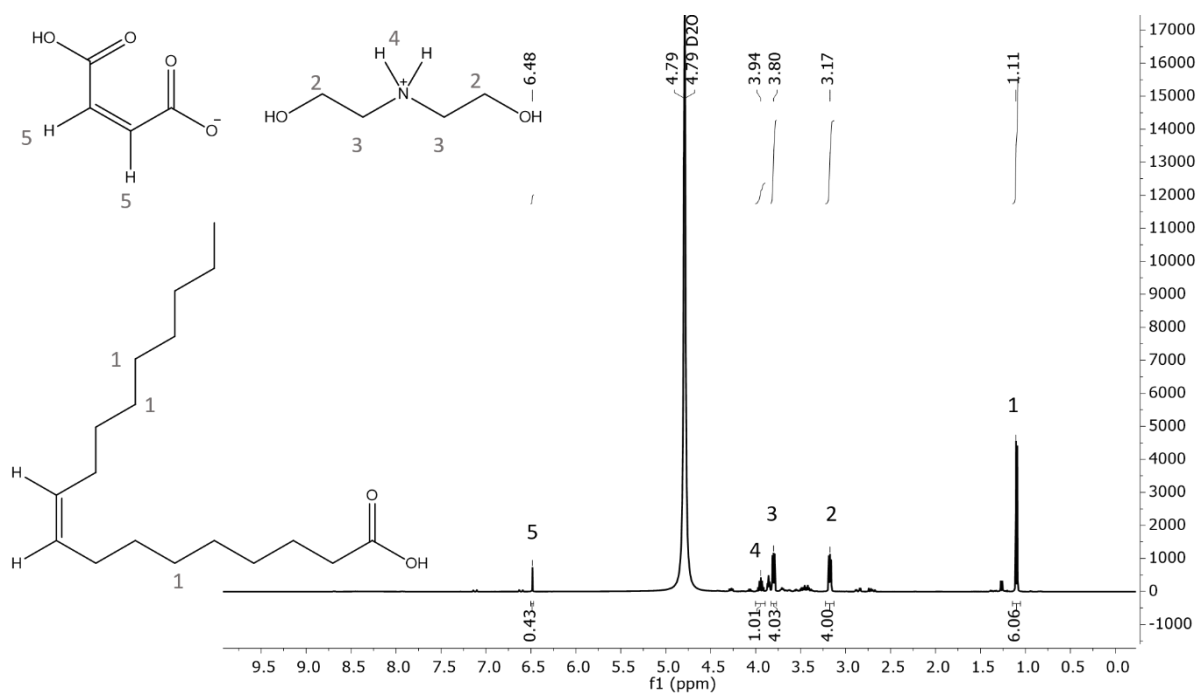


Figura S16. espectro RMN ^1H (400 MHz) da miniemulsão com o LIP2-HDEAMa em D_2O

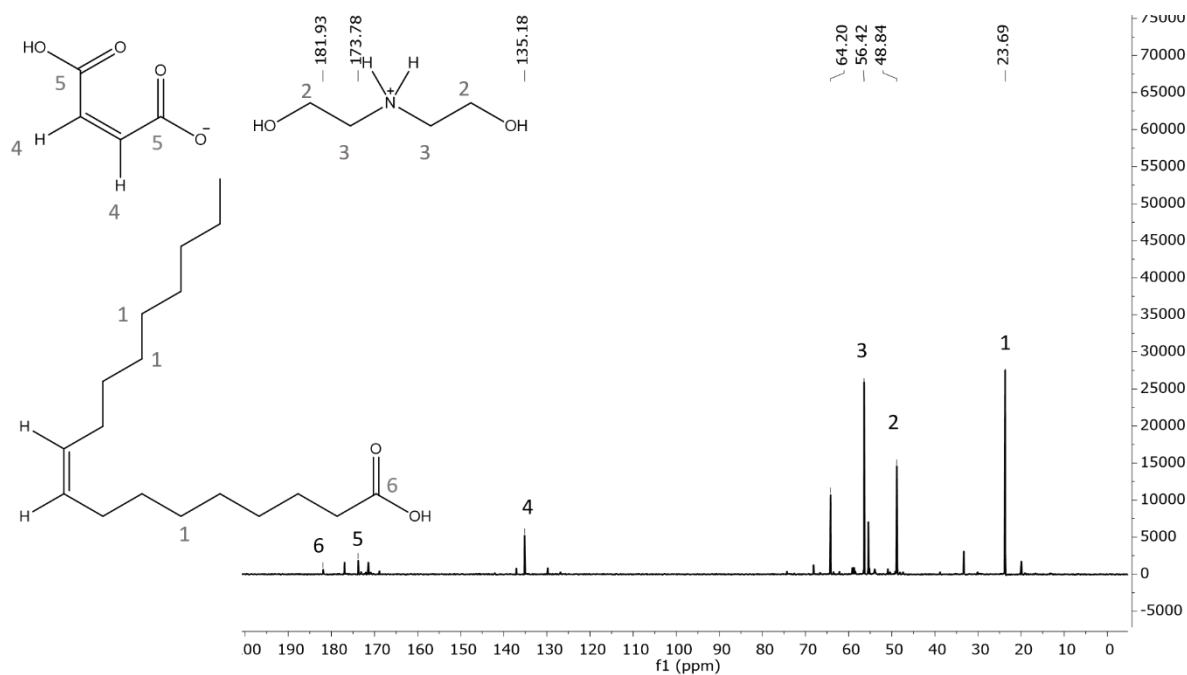


Figura S17. espectro RMN ^{13}C (100 MHz) espectro da miniemulsão com o LIP2-HDEAMa em D_2O

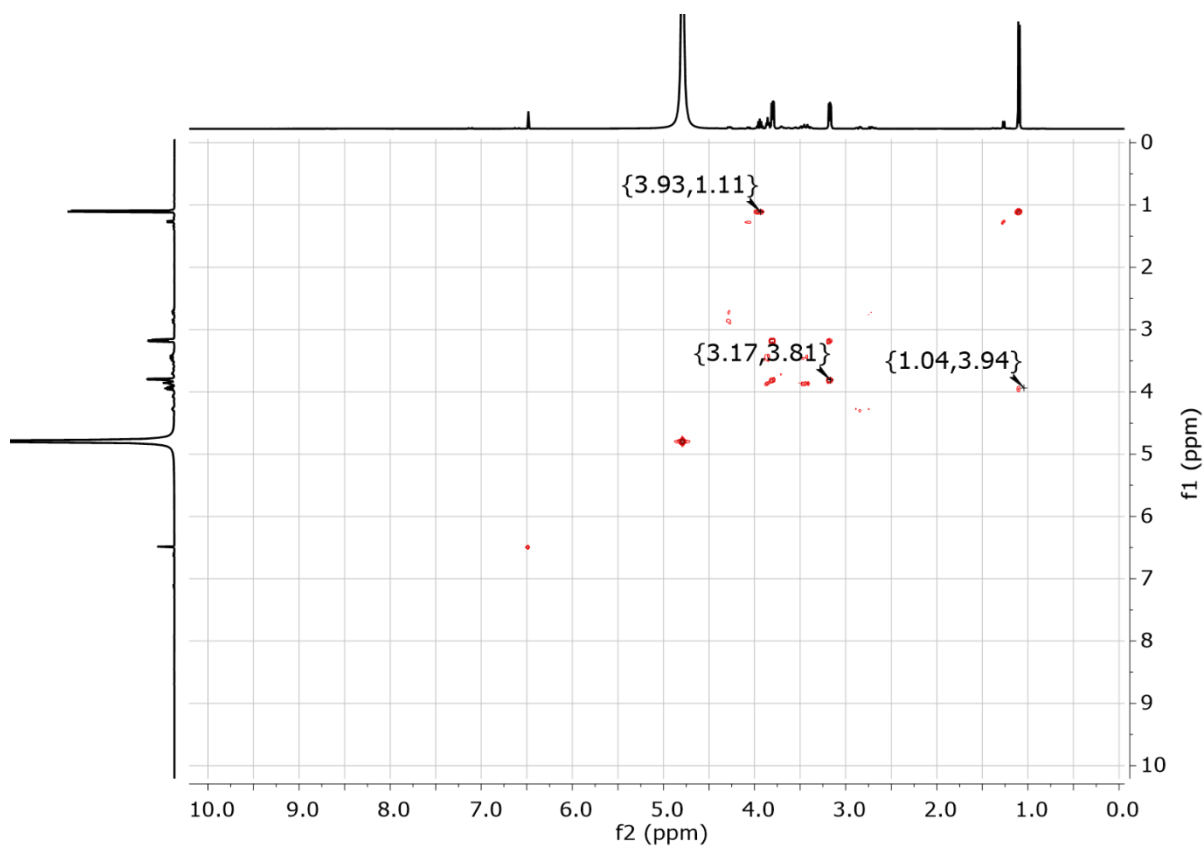


Figura S18. ^1H - ^1H COSY mapa de contorno da miniemulsão com o LIP 2-HDEAMa em D_2O

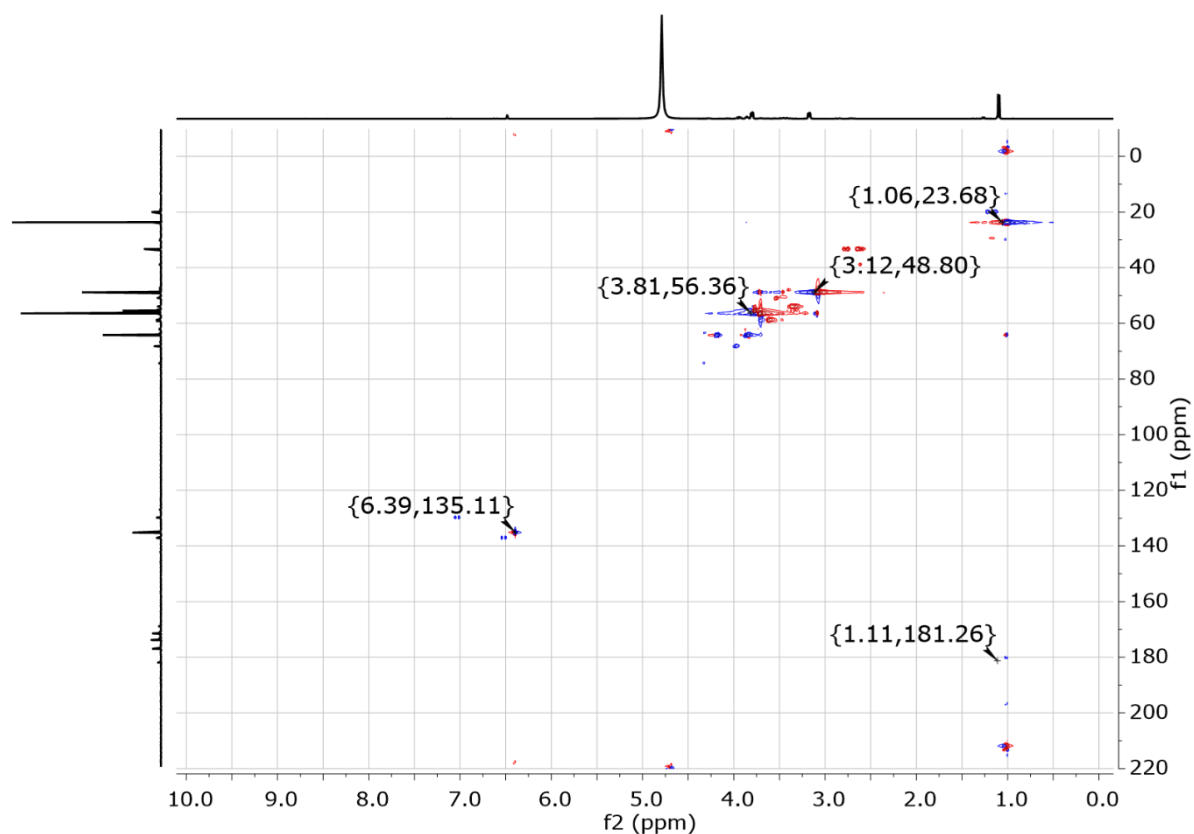


Figura S19. ^1H - ^{13}C HSQC mapa de contorno da miniemulsão com o LIP 2-HDEAMa em D_2O

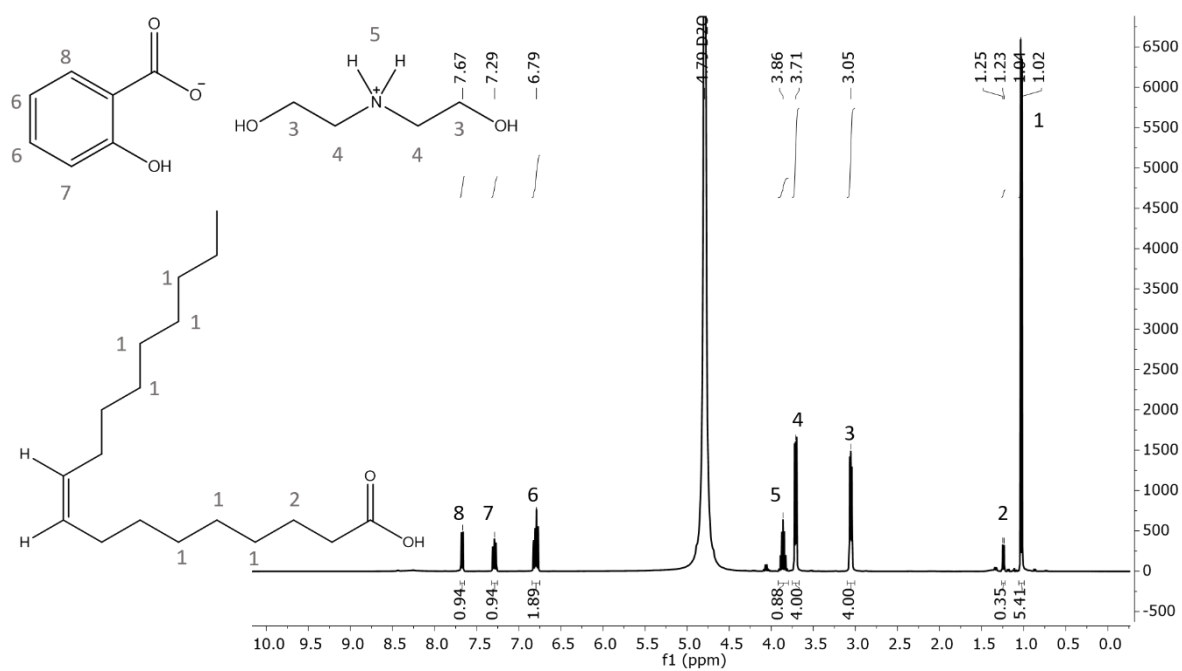


Figura S20. espectro RMN ^1H (400 MHz) da miniemulsão com o LIP2-HDEASa em D_2O

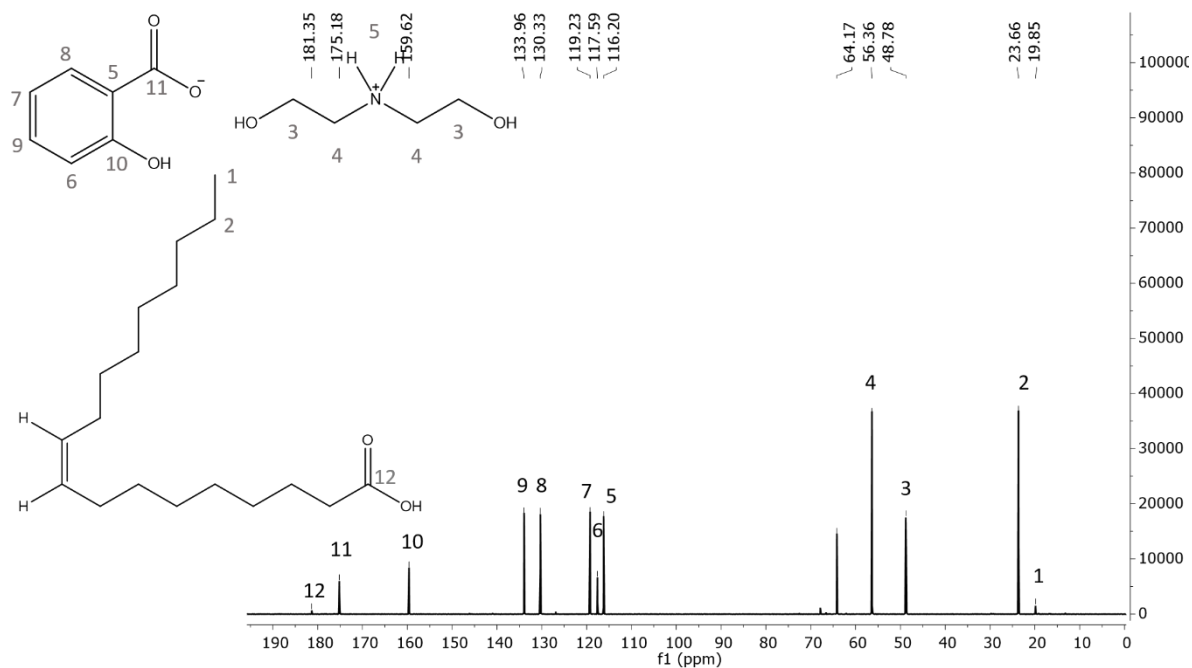


Figura S21. espectro RMN ^{13}C (100 MHz) espectro da miniemulsão com o LIP2-HDEASa em D_2O

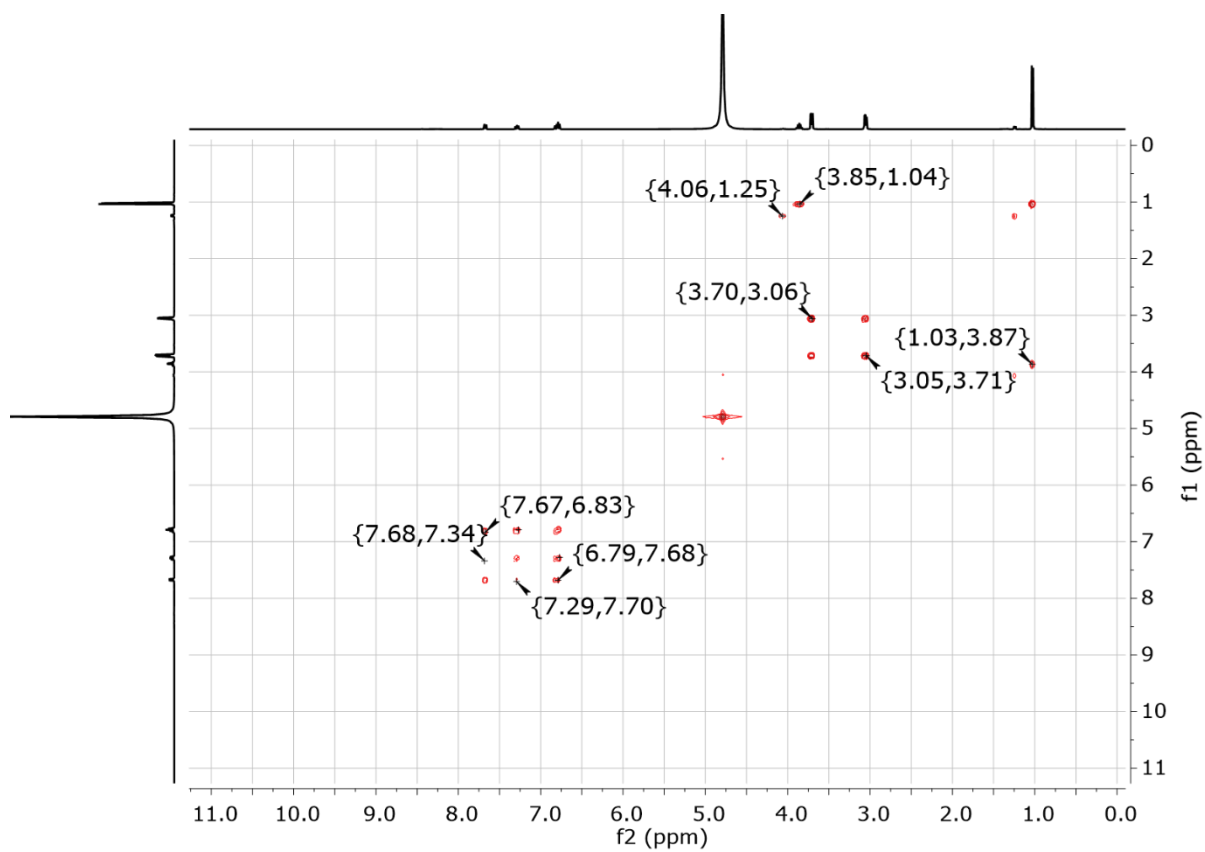


Figura S22. ^1H - ^1H COSY mapa de contorno da miniemulsão com o LIP 2-HDEASa em D_2O

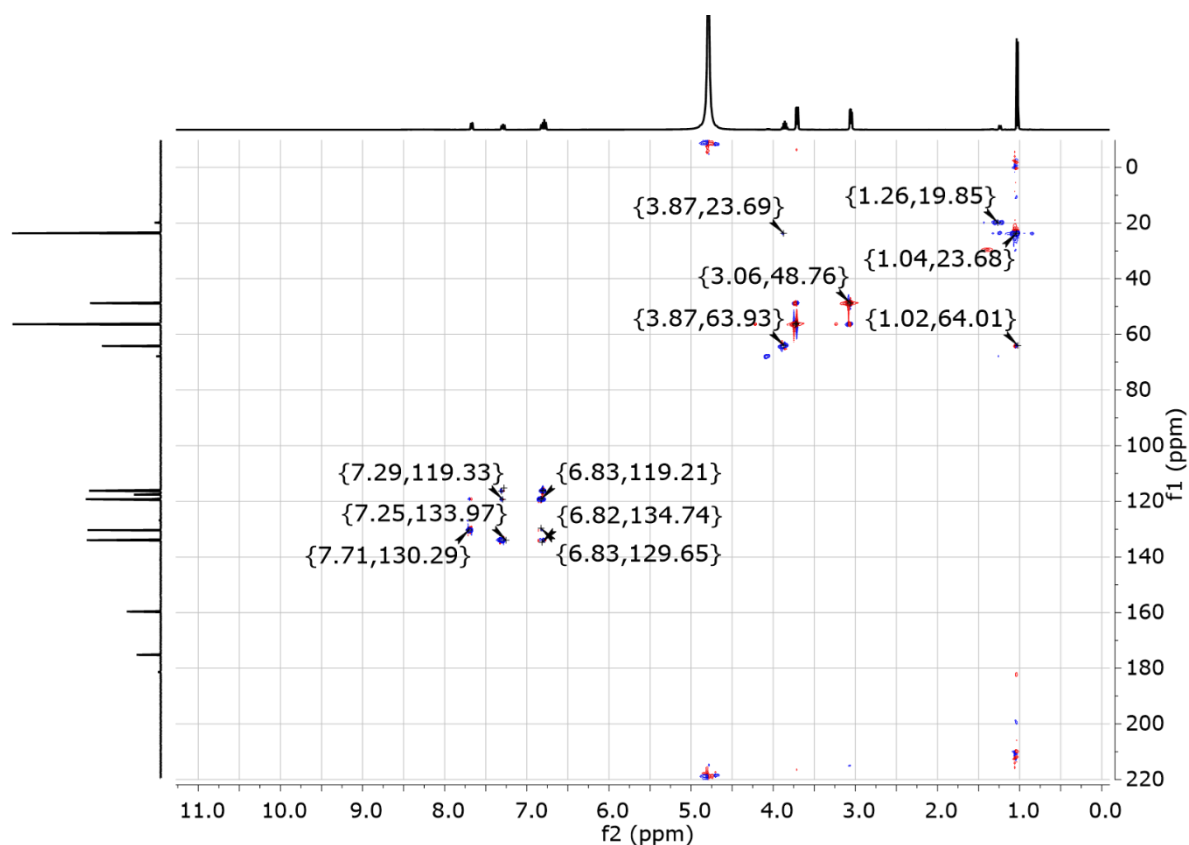


Figura S23. ^1H - ^{13}C HSQC mapa de contorno da miniemulsão com o LIP 2-HDEASa em D_2O .

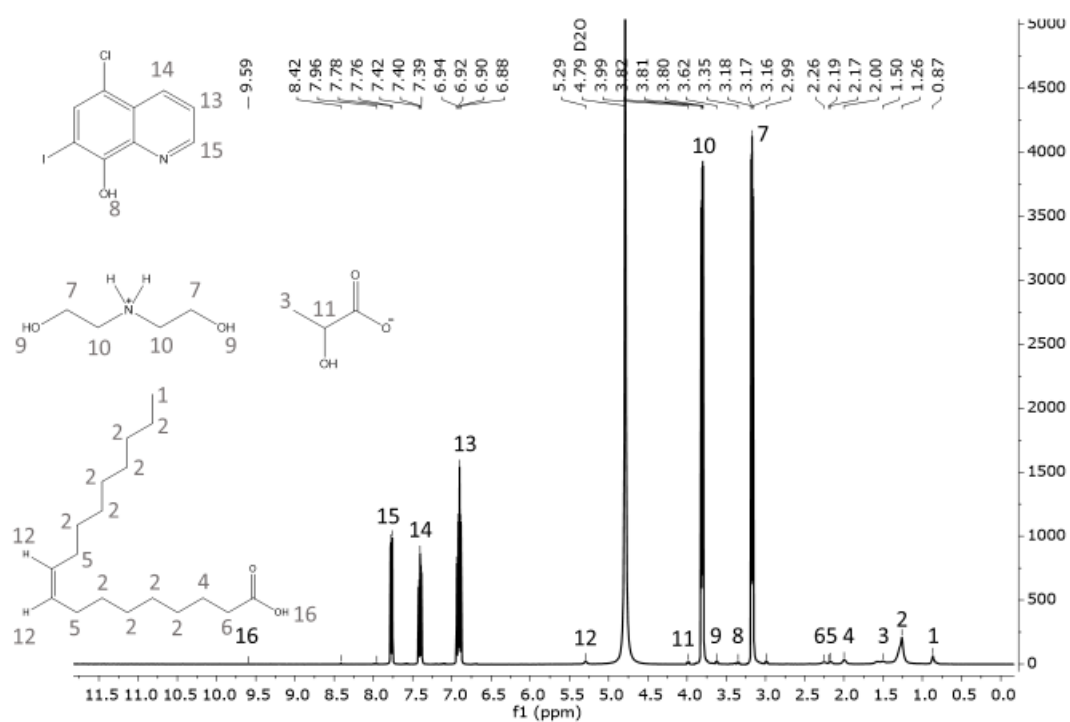


Figura S24. espectro RMN ^1H da miniemulsão 2-HDEALa com cloquinoxaline.

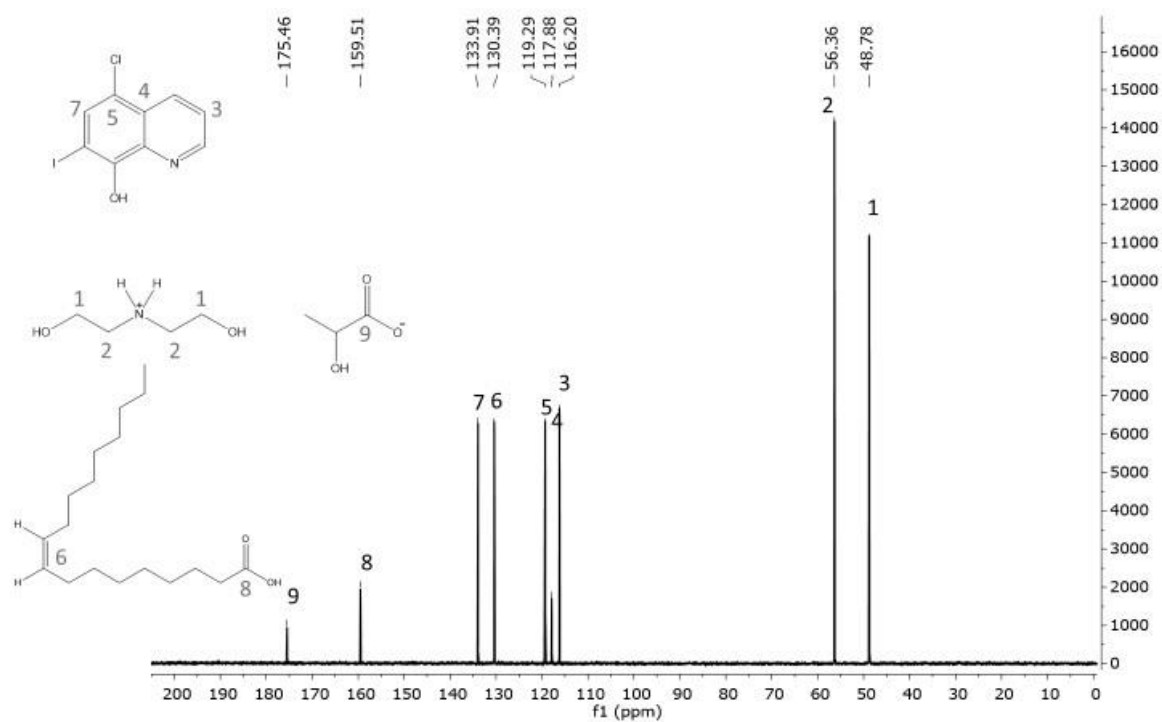


Figura S25. espectro RMN ^{13}C da miniemulsão 2-HDEALa com cloquinoxol.

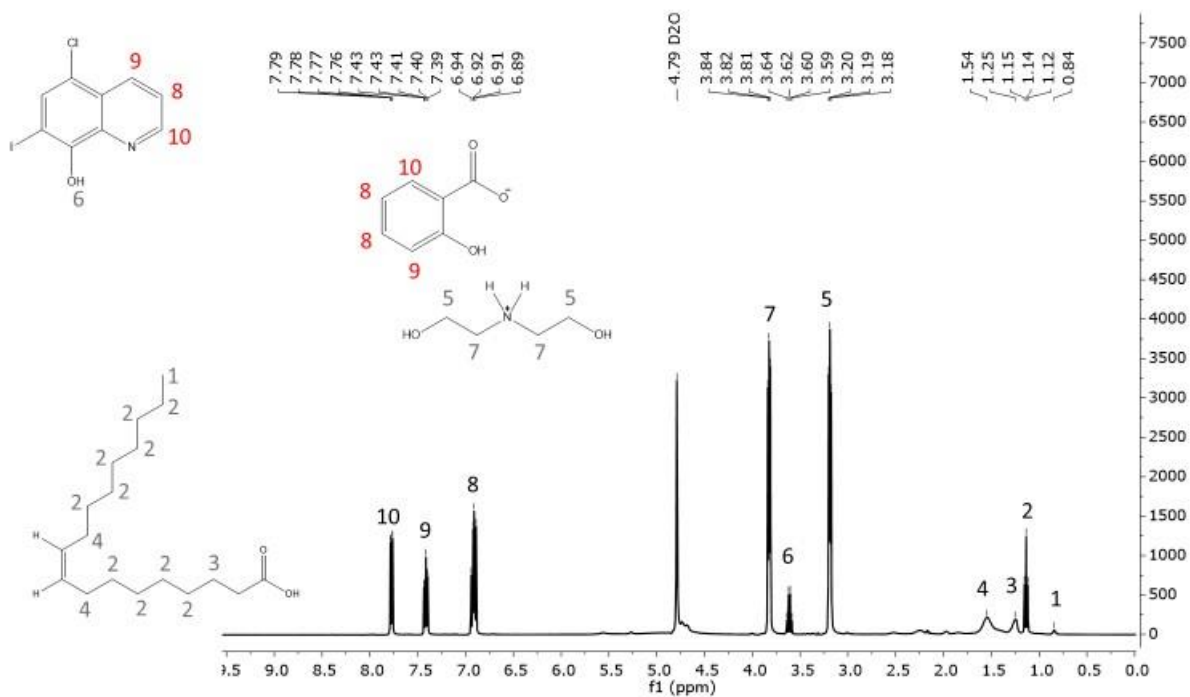


Figura S26. espectro RMN ^1H (400 MHz) da miniemulsão 2-HDEASa com cloquinoxol.

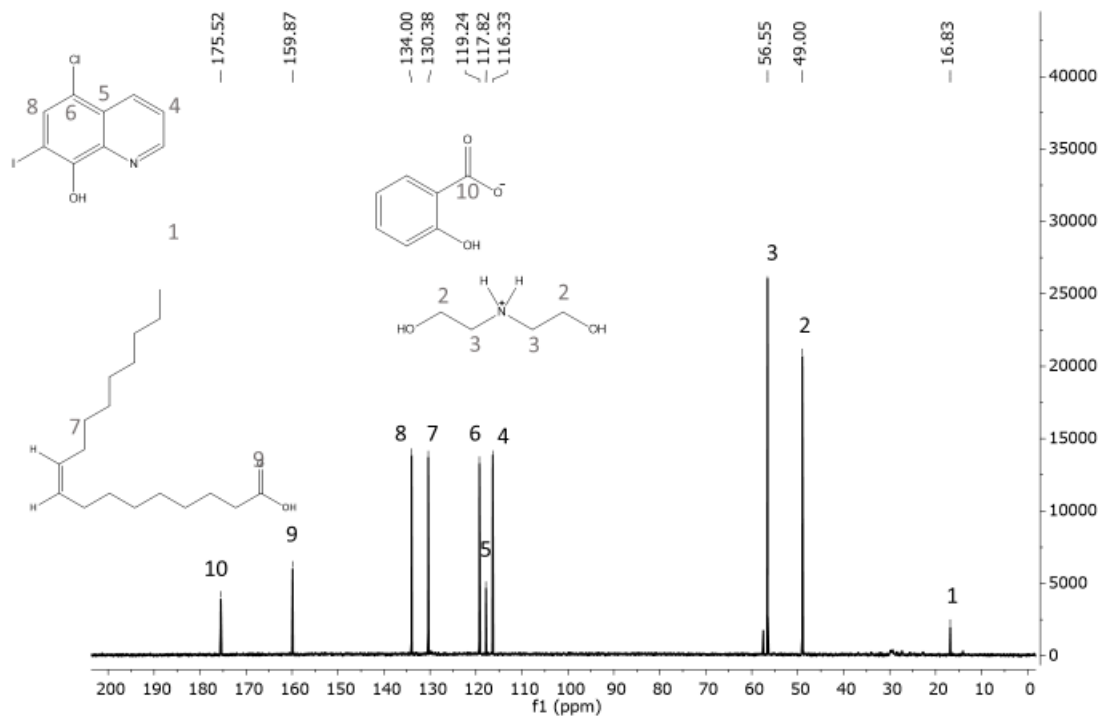


Figura S27. espectro RMN ^{13}C da miniemulsão 2-HDEASa com cloquinoxaline.