

MAIANE SILVA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DO TIMOL EM DISPOSITIVO
DOMISSANITÁRIO INOVADOR PARA O COMBATE DE MICRORGANISMOS
PATÓGENOS**

BRASÍLIA, 2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAIANE SILVA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DO TIMOL EM DISPOSITIVO
DOMISSANITÁRIO INOVADOR PARA O COMBATE DE MICRORGANISMOS
PATÓGENOS**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto

BRASÍLIA

2023

MAIANE SILVA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DO TIMOL EM DISPOSITIVO
DOMISSANITÁRIO INOVADOR PARA O COMBATE DE MICRORGANISMOS
PATÓGENOS**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto – (presidente)
Universidade de Brasília

Dra. Talita Faraj Faria
Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Nunes
Instituto de Educação Superior de Brasília

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, aos meus filhos e aos meus amigos
que sempre motivaram e incentivaram a busca dos meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me fortalecido e me guiado para que tudo isso fosse concretizado. Agradeço pelas portas abertas e por ter colocado as pessoas exatas no meu caminho. Obrigada por sua infinita misericórdia e proteção divina durante toda essa trajetória.

Aos meus pais, Vera Souza e Carlos Lemos, e aos meus irmãos, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Aos meus filhos, Anna Elisa, Victor Gabriel e Marcus Vinicius, pela compreensão, por não me deixarem eu desistir. Nós sabemos o quanto foi árdua essa longa caminhada. Sem o apoio de vocês nada disso teria se concretizado, a vitória também é de vocês.

À minha orientadora Profa. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto, pela paciência e por ter me dado essa oportunidade e ter acreditado que eu era capaz, me fazendo crescer cada dia mais.

À Dra. Natane Duarte Castelo Branco, por ter sido uma irmã para mim durante esses anos do curso de mestrado. Obrigada pela ajuda, incentivo e disponibilização nos inúmeros momentos difíceis.

À Lorena Aparecida, amiga sempre presente. Obrigada por partilhar seus conhecimentos.

Aos meus amigos, Me. Jessika Layane da Cruz Rocha, Evalina Costa de Sousa, Evilásio Marinho e Jean Soares, pela paciência, apoio e disposição nessa missão que parecia interminável.

Por fim, agradeço as instituições que fomentaram o trabalho: Universidade de Brasília - UnB, pelo suporte financeiro através do Edital COPEI-DPI/DEX 01/2021, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela bolsa de mestrado e Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal – FAP-DF, pelo apoio e parceria.

“As espécies que sobrevivem não são as espécies mais fortes, nem as mais inteligentes, e sim aquelas que se adaptam melhor as mudanças.”

(Charles Darwin)

RESUMO

A pandemia advinda do novo coronavírus (COVID-19) tornou-se um dos grandes desafios do século XXI. Devido ao seu alto poder de transmissão, a COVID-19 promoveu o desenvolvimento de pesquisas científicas visando estratégias eficientes contra o agente viral, SARS-CoV-2. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a aplicação de terpenoide em sistema microemulsionado inserido em dispositivo sanitizante inovador contra microrganismos patógenos. A metodologia se deu através da obtenção de microemulsão do ativo, óleo vegetal e surfactantes não iônicos, e inserção deste sistema em base saponéica, obtida por reação de saponificação de óleo alimentício, soda caustica e álcool etílico hidratado, incorporados a formulação de dispositivo efervescente elaborado por modelagem. A interação dos componentes foi avaliada por DSC. A estabilidade da microemulsão desenvolvida foi avaliada em 3 diferentes condições climáticas, 4°, 25° e 40° ± 2 °C. A microemulsão e o dispositivo sanitizante desenvolvidos foram submetidos as avaliações de qualidade físico-químicas e eficiência microbiológica. As interações observadas na análise térmica, assim como as alterações de estabilidade verificadas na microemulsão exposta a 40° ± 2 °C, não provocaram alteração da aplicação final do produto. A microemulsão apresentou eficácia bacteriostática, mas não bactericida. Entretanto, o dispositivo sanitizante contendo a microemulsão apresentou efeito bacteriostático e bactericida, indicando sinergismo da ação antimicrobiana. Desta forma, os resultados permitem indicar o uso do produto final como Equipamento de Proteção Individual (EPI) e/ou coletiva (EPC), para o uso doméstico e profissional.

Palavras-chave: SARS-CoV2. Saneante. Timol. Microemulsões.

ABSTRACT

The pandemic from the new coronavirus (COVID-19) has become one of the great challenges of the 21st century. Due to its high transmission power, COVID-19 promoted the development of scientific research aimed at efficient strategies against the viral agent, SARS-CoV-2. In this sense, the present study aimed to evaluate the application of terpenoid in a microemulsified system inserted in an innovative sanitizing device against pathogenic microorganisms. The methodology was carried out by obtaining a microemulsion of the active ingredient, vegetable oil and non-ionic surfactants, and inserting this system in a saponic base, obtained by the saponification reaction of food oil, sodium hydroxide and ethyl alcohol 92° p/p, incorporated into the formulation of an effervescent device developed by modeling. Component interaction was evaluated by DSC. The stability of the developed microemulsion was evaluated in 3 different climatic conditions, 4°, 25° and 40° ± 2 °C. The developed microemulsion and sanitizing device were submitted to physical-chemical quality and microbiological efficiency evaluations. The interactions observed in the thermal analysis, as well as the changes in stability observed in the microemulsion exposed to 40° ± 2 °C, did not change the final application of the product. The microemulsion showed bacteriostatic, but not bactericidal, efficacy. However, the sanitizing device containing the microemulsion had a bacteriostatic and bactericidal effect, indicating synergistic antimicrobial action. In this way, the results allow indicating the use of the final product as Personal Protective Equipment (PPE) and/or Collective Protection Equipment (EPC), for domestic and professional use.

Keywords: SARS-CoV-2.Sanitizing. Thymol. Microemulsions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE SABÃO.....	20
FIGURA 2: MICELA FORMADA EM TORNO DA SUJEIRA DE UM UTENSÍLIO	21
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TRÊS MICROESTRUTURAS DE MICROEMULSÕES MAIS COMUMENTE ENCONTRADAS: (A) ME ÓLEO EM ÁGUA (O/A) E (B) ME ÁGUA EM ÓLEO (A/O), EMPREGANDO SURFACTANTE ANIÔNICO E ÁLCOOL DE CADEIA MÉDIA, E (C) ME BICONTÍNUA.....	24
FIGURA 4: FÓRMULA GERAL DO RENEX	26
FIGURA 5: FÓRMULA GERAL DA AMIDA 60.....	26
FIGURA 6: ORIGEM METABÓLICA DO TIMOL	29
FIGURA 7: DESENVOLVIMENTO DO DIAGRAMA DE FASES	35
FIGURA 8: FOTOGRAFIAS ILUSTRATIVAS DO TESTE DE UMIDADE DA BASE SAPONEICA	41
FIGURA 9: ILUSTRAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS UTILIZADOS NO ESTUDO MICROBIOLÓGICO (CIM E CBM).	48
FIGURA 10: ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE CIM UTILIZANDO A RESAZURINA COMO INDICADOR DE VIABILIDADE CELULAR	49
FIGURA 11: REDUÇÃO DA RESAZURINA EM RESORUFINA PELAS ENZIMAS ÓXIDO-REDUTASES PRESENTES NAS CÉLULAS VIVAS	49
FIGURA 12: FORMAÇÃO DA MICROEMULSÃO	51
FIGURA 13: MICROSCOPIA ÓPTICA DA MICROEMULSÃO DESENVOLVIDA CONTENDO 30MG/ML DE TIMOL	52
FIGURA 14: MICROEMULSÃO APÓS OS 90 DIAS DE ARMAZENAMENTO	55
FIGURA 15: DISPOSITIVO EFERVESCENTE DISPOSTA EM MEIO LÍQUIDO	59
FIGURA 16: PRODUÇÃO DO LOTE DE DISPOSITIVO	59
FIGURA 17: DETERMINAÇÃO DE PESO MÉDIO DO LOTE DO DISPOSITIVO SANITIZANTE	60
FIGURA 18: PLACAS COM MICRORGANISMOS NOS TESTES MICROBIOLÓGICOS DA MICROEMULSÃO	61
FIGURA 19: OS MICRORGANISMOS NOS TESTES MICROBIOLÓGICOS DA MICROEMULSÃO EM 10 MINUTOS	62
FIGURA 20: TESTES MICROBIOLÓGICOS PARA CBM	63
FIGURA 21: TESTES MICROBIOLÓGICOS PARA CIM	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPONENTES UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DA MICROEMULSÃO	36
TABELA 2: INSUMOS UTILIZADOS NA SAPONIFICAÇÃO E SUAS FUNÇÕES	39
TABELA 3: FORMULAÇÕES DE SABÕES EM DIFERENTES PROPORÇÕES TESTADAS	40
TABELA 4: MISTURAS FÍSICAS ANALISADAS NO ESTUDO DE DSC	43
TABELA 5: INSUMOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DA DISPOSITIVO EFERVESCENTE	43
TABELA 6: OBTENÇÃO DE ME/TML COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ...	51
TABELA 7: RESULTADO DOS TESTES DE FORMULAÇÃO DO SABÃO EM DIFERENTES PROPORÇÕES	56
TABELA 8: INSUMOS DA MELHOR COMPOSIÇÃO PARA PRODUÇÃO DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE	58
TABELA 9: CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DO DISPOSITIVO PRODUZIDO	60
TABELA 10: TESTES MICROBIOLÓGICOS DA MICROEMULSÃO EM DIFERENTES TEMPOS TESTADOS	61
TABELA 11: TESTE MICROBIOLÓGICO DO DISPOSITIVO CONTENDO TIMOL	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: ELABORAÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTÉRNARIO	50
GRÁFICO 2: ILUSTRAÇÃO GRÁFICA DO POTENCIAL ZETA DA MICROEMULSÃO DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA NA TEMPERATURA AMBIENTE, GELADEIRA E ESTUFA.....	53
GRÁFICO 3. ILUSTRAÇÃO GRÁFICA DO PDI DA MICROEMULSÃO DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA NA TEMPERATURA AMBIENTE, GELADEIRA E ESTUFA	53
GRÁFICO 4. ILUSTRAÇÃO GRÁFICA DO TAMANHO (NM) DA MICROEMULSÃO DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA NA TEMPERATURA AMBIENTE, GELADEIRA E ESTUFA	54
GRÁFICO 5: RESULTADOS DO TEOR DE TIMOL NA MICROEMULSÃO DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA NOS PERÍODOS DE 0, 7, 15, 30, 60 E 90 DIAS	54
GRÁFICO 6. CURVA DE DSC DAS MISTURAS BINÁRIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COVID-19	Doença causada pelo vírus corona, iniciada em 2019
CoVs	Coronavírus
d.C.	Depois de Cristo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HLB	Equilíbrio hidrófilo/lipofílico
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INF	Intervenções não farmacêuticas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ME	Microemulsão
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
SARS-COV2	Novo coronavírus
TML	Timol
UFC	Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 SABÃO RECICLADO	18
1.1.1 SAPONIFICAÇÃO	19
1.1.2 ANVISA – LEGISLAÇÃO	21
1.2 TECNOLOGIA DE MICROEMULSIFICAÇÃO	22
1.2.1 USO DE TENSOATIVOS	24
1.2.2 NONILFENOL ETOXILADO RENEX 95	25
1.2.3 DIETANOLAMINA DE ÁCIDO GRAXO DE COCO AMIDA 60	26
1.3 MECANISMO DE EFERVESCÊNCIA NA DESINTEGRAÇÃO.....	27
1.4 INSUMO DE INTERESSE INDUSTRIAL TIMOL	27
1.5 MICROORGANISMOS DE INTERESSE.....	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MÉTODOS	34
3.1 MATERIAIS	34
3.2 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO	34
3.2.1 TECNOLOGIA DE MICROEMULCIFICAÇÃO	35
3.3 OBTENÇÃO DE ME/TML COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	36
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA MICROEMULSÃO.....	36
3.4.1 DIAMETRO HIDRODINÂMICO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (PDI)	37
3.4.1.1 POTENCIAL ZETA	37
3.4.1.2 MENSURAÇÃO DO PH.....	37
3.4.1.3 TEOR	37
3.4.1.4 ANÁLISE DA ME/TML POR MICROSCOPIA OPTICA.....	38
3.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ME/TML	38
3.6 ESCOLHA DA BASE SAPONEICA.....	39
3.6.1 CARACTERIZAÇÃO DA BASE SAPONEICA	41
3.6.1.1 PH	41
3.6.1.2 UMIDADE	41
3.6.1.3 TESTE DE ESPUMA.....	42
3.6.1.4 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	42
3.7 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DA ME/TML E DO DISPOSITIVO SANITIZANTE POR COLORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL.....	42
3.8 ELABORAÇÃO DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE.....	43

3.8.1 PROCESSO DE MOLDAGEM E SECAGEM DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE	44
3.8.1.1 PRODUÇÃO DO LOTE DO DISPOSITIVO	44
3.9 CARACTERIZAÇÃO DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE	44
3.9.1 PESO MÉDIO	45
3.9.1.1 FRIABILIDADE	45
3.9.1.2 UMIDADE	45
3.9.1.3 TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO	46
3.9.1.4 TEOR	46
3.10 TESTE COM MICROORGANISMOS DA MICROEMULSÃO E DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE	46
3.10.1 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR ENSAIO DE DISCO DIFUSÃO	46
3.10.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO	47
4 RESULTADOS E DISCURSÃO	50
4.1 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO	50
4.2 ANÁLISE DA ME/TML 30MG/ML DE TML POR MICROSCOPIA ÓPTICA	52
4.3 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ME/TML	52
4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA MICROEMULSÃO EM 90 DIAS	55
4.5 ESCOLHA DE BASE SAPONEICA	55
4.6 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO ENTRE COMPONENTES DA ME/TML E DO DISPOSITIVO SANITIZANTE POR CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC)	57
4.7 FORMULAÇÃO DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE	58
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO	61
4.8.1 MICROBIOLOGIA DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE E MICROEMULSÃO	61
4.8.1.1 EFICÁCIA MICROBIOLÓGICA E FUNGICIDA DA MICROEMULSÃO E DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE	61
4.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO	62
5 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

A pandemia causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), iniciada em 2019, a COVID-19, compreendeu um dos maiores desafios do século XXI enfrentados pela humanidade, com impactos inestimáveis, interferindo direta e indiretamente na saúde e na economia da população mundial.

O vírus corona (CoV) foi isolado pela primeira vez em 1937, e tornou-se amplamente conhecido em 2002 por causar a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em humanos. Esta infecção afeta gravemente o sistema respiratório inferior, acompanhada de febre e, muitas vezes, insuficiência respiratória (FUNG et al., 2020). No entanto, o SARS-CoV foi rapidamente controlado e apenas alguns países como China, Canadá e Estados Unidos foram afetados (SCHWARTZ, 2020).

Dezoito anos após, em 2020, o SARS-CoV-2, foi rapidamente disseminado em todo planeta. Apesar de ser uma variante menos letal entre os outros membros da família Coronaviridae, como o SARS-CoV e o MERS-CoV, este último corresponde ao vírus causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio, o novo coronavírus teve maior potencial de transmissão (FAUCI; GATES, 2020).

A China foi o primeiro país a relatar a doença em 2019 e, em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a doença como pandemia. Até o início de 2023, foram confirmados mais de 750 milhões de caso da COVID-19, com cerca de 6 milhões de mortes em todo o planeta (WHO, 2023)

O primeiro caso da doença foi descrito como pneumonia oriunda por patógeno desconhecido, e foi relatado às autoridades de saúde, na cidade de Wuhan, na China, em 2019 (WHO, 2019). Logo após, os casos começaram a se espalhar rapidamente por todo o mundo, com início na Ásia continental. A partir de então, houve a disseminação para outros continentes (GISAID, 2020). No Brasil, o primeiro caso de COVID-19 foi registrado em fevereiro de 2020, em São Paulo (MALTA et al., 2020).

Com o desconhecimento de medidas específicas de prevenção ou tratamento, bem como conter a rápida disseminação da doença, a OMS recomendou a adoção de intervenções não farmacêuticas (INF), como a lavagem das mãos, o uso de máscaras faciais, restrições sociais, e a intensificação de limpeza de rotina dos ambientes e superfícies (MALTA et al., 2020).

Estados e Municípios adotaram o fechamento de instituições de ensino e empresas fornecedoras de serviços não essenciais, e fecharam seus limites e fronteiras. Muitos trabalhadores foram instruídos a realizar suas atividades laborais em casa (*home office*). As autoridades públicas ordenaram penalidades para instituições e indivíduos que não cumprissem as restrições impostas pela situação sanitária (FUNG; MALTA; 2020).

Estas medidas resultaram as mais amplamente adotadas e as mais eficazes para evitar a propagação da doença. Em geral, os efeitos clínicos e comportamentais desta obrigação implicaram em mudanças no estilo de vida e afetaram a saúde mental dos cidadãos (FAUCI, 2020).

Devido à falta de terapias específicas para a COVID-19, o tratamento foi inicialmente baseado no controle sintomático e no fornecimento de suporte ventilatório (ZHANG et al., 2020). A busca por antivirais impulsionou a comunidade científica a encontrar tratamentos curativos através de fármacos já conhecidos, com a geração de inúmeros trabalhos científicos, muitas vezes questionáveis (ZHANG et al., 2020).

A situação imposta pela COVID-19, elevou a relevância pela busca de eficiência ao combate aos agentes microbianos transmissivos, e possibilitou à comunidade científica desenvolver sistemas inovadores, incluindo sistemas microtecnológicos com aplicação na área farmacêutica e afins, para aumentar a biodisponibilidade e estabilidade de moléculas terapêuticas, favorecendo a interação e potencialização biológicas (FAUCI, 2020).

Tendo em vista a relevância diante a funcionalidade das microemulsões perante o cenário de transmissibilidade da COVID-19, o presente trabalho visou avaliar a viabilidade de aplicação do timol em dispositivo domissanitário inovador, de base saponéica e mecanismo de desintegração efervescente, para o combate de microrganismos patógenos em toaletes.

1.1 SABÃO RECICLADO

Na antiga Babilônia, foram encontrados resíduos com suspeita de ser um produto saponáceo, com várias misturas de argilas, gordura animal e cinzas de madeira, mas não se sabe até hoje, se realmente se tratava do sabão propriamente

dito. Após esse período, no século IV, os povos celtas descobriram o verdadeiro sabão ilustrado na bibliografia, onde se tratava de uma mistura de gordura animal, cinzas e plantas. Era um produto considerado estranho, onde se utilizava somente para a lavagem dos cabelos (OLIVEIRA *et al.*, 2021), sendo muito utilizado no Império Romano (UCHIMURA, 2021).

A partir do segundo século depois de Cristo (d.C.), o sabão teve sua importância reconhecida como um produto de limpeza, que também servia para higienização do corpo, após mencionado pelo médico grego Galeno. Sendo assim, o sabão ganhou grande espaço, onde teve o marco da descoberta da troca do uso das cinzas por soda cáustica (Hidróxido de sódio - NaOH), dando início a modernização e industrialização para sua obtenção e popularização (OLIVEIRA *et al.*, 2021; ALBERECI, PONTES, 2004).

Dessa forma, a produção do sabão aumentou consideravelmente, sendo passada para as gerações subsequentes, e utilizado cada vez mais na rotina diária da população. Hoje o sabão é conhecido como um produto tecnológico, com grandes possibilidades de inovação, que viabiliza a incorporação de aditivos para melhorar sua eficiência e ampliar sua utilização (OLIVEIRA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2016; JR. MARTINEZ *et al.*, 2015; PEREIRA, 2007).

O sabão também é considerado sustentável e ecológico, pois é obtido através da reciclagem de óleos e gorduras alimentícias. Proporciona, assim, vários benefícios, com a preservação do meio ambiente, visto que o óleo descartado pode consistir em alimentos de roedores, pode impermeabilizar o solo impedindo o crescimento e desenvolvimento de plantas e pode afetar a vida aquática, impedindo a oxigenação. Além disso, é ferramenta de economia doméstica, de baixo custo e fácil acesso (LOPES *et al.*, 2021).

Apesar da facilidade de obtenção, o uso da soda cáustica na obtenção do sabão, implica em cuidados. O NaOH é corrosivo e não é completamente consumido na reação de saponificação. Sendo assim, seu excesso permanece no produto final, sabão, em concentrações elevadas pode provocar lesões na pele humana (NETO *et al.*, 1997).

1.1.1 Saponificação

Há mais de 2 mil anos o sabão é produzido pela reação química de saponificação. Esta reação consiste na hidrólise alcalina de triglicerídeos (presentes em gorduras ou óleos de animais ou vegetais) na presença de uma substância alcalina (ex. NaOH), resultando na formação de sais de ácidos graxos correspondentes (sabão) e glicerina (álcool glicerol) (OLIVEIRA *et al.*, 2021; MARTINEZ JR *et al.*, 2015). Em geral, os ácidos graxos são ácidos de cadeia longa, compostas por 12 átomos de carbono ou mais (FOGAÇA, 2021).

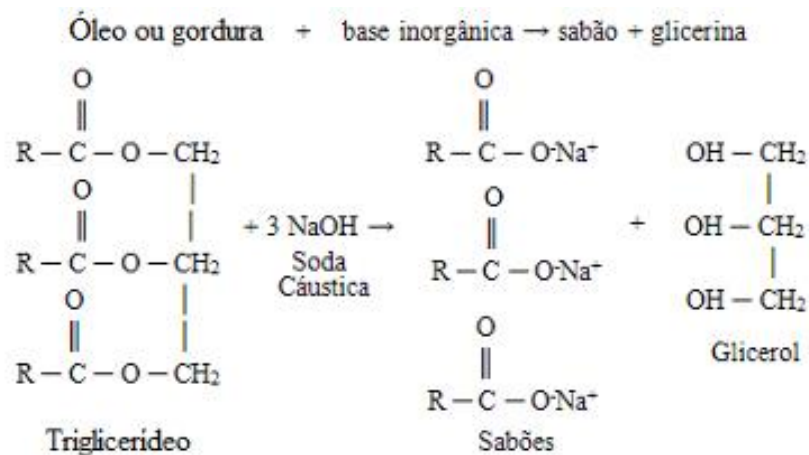


Figura 1. Reação de saponificação para produção de sabão.
Fonte: Fogaça, 2021.

De acordo com Oxford Languages (2022), quimicamente, o sabão compreende em uma substância detergente, um material originado através da mistura de sais de sódio e de potássio juntamente com ácidos graxos. Cotidianamente, o sabão é utilizado com água para lavagem e higienização de mãos, bem como locais e objetos em geral. Os produtos utilizados na fabricação do sabão comum são soda caustica, álcool, além de óleos ou gorduras animais e vegetais. A fabricação da obtenção do sabão é muito simples. A reação química de saponificação ocorre entre um éster e uma base, essa reação ocorre em meio aquoso e é favorecida pelo aquecimento, resultando em glicerina e o sabão bruto.

Conforme enaltecem os autores Malesczyk e Polanczky (2017), a utilização somente da água, não possibilita a correta higienização e remoção adequada de alguns tipos de sujeira, como, por exemplo, a gordura, uma vez que as moléculas de água têm afinidade pela área polar, sendo que o óleo tem mais afinidade pela área

apolar. Portanto, o sabão sendo produzido com a própria gordura garante uma dupla personalidade com relação à polaridade.

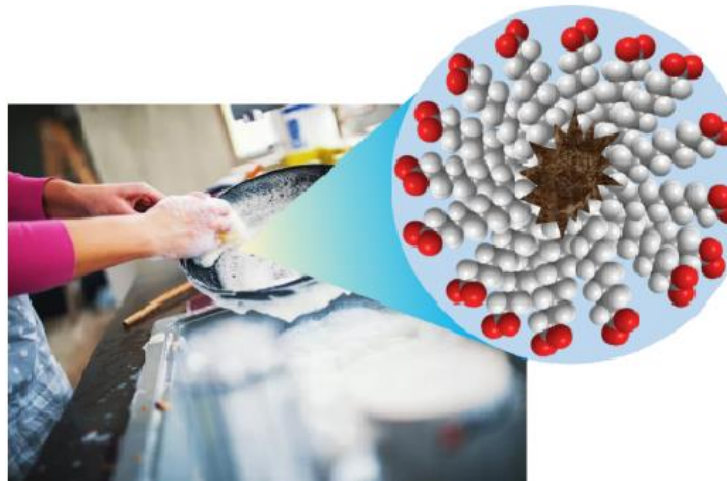


Figura 2 Micela formada em torno da sujeira de um utensílio
Fonte: Oliveira *et al.*, 2021.

Os sabões continuam em características polares e apolares, onde estas moléculas quando entram em contato com substâncias líquidas polares ou apolares se dissolve e interagem com essas substâncias líquidas ocorrendo assim uma redução amplamente na tensão superficial, funcionando perfeitamente como um agente de limpeza (MALESCZYK E POLANCZKY, 2017).

1.1.2 ANVISA – Legislação

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976 e da Resolução nº 184 de 22 de outubro de 2001, regulamenta a fabricação e distribuição de produtos de limpeza, como o sabão (BRASIL, 1976; BRASIL, 2001).

Estes produtos saneantes domissanitários são destinados à higiene, desinfecção ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos e/ou públicos, em lugares de uso comum e no tratamento da água. Os produtos destinados a dissolver gorduras, à higiene de recipientes e vasilhas, e às aplicações de uso doméstico são classificados como detergentes (BRASIL, 1976).

Os saneantes são também classificados em razão do local, destino e/ou restrições de uso, como: de uso domiciliar; de uso institucional; de uso profissional e

de uso restrito a hospitais. Assim, para cada local, o produto recebe classificação de acordo com o seu grau de risco (Risco I e Risco II), conforme registro.

Os produtos de Risco I são os saneantes domissanitários e afins em geral, que não causam efeitos mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos em mamíferos, sua solução a 1% p/p apresenta valor de pH entre 2 e 11,5 (BRASIL, 2001). Enquanto os produtos de Risco II apresentam características cáusticas e corrosivas, pH menor que 2 ou maior que 11,5, e aqueles com atividade antimicrobiana (BRASIL, 2001)..

Os desinfetantes e os produtos biológicos à base de microrganismos, também são classificados como de Risco II, e devem apresentar o requisito de serem formulados com substâncias que não apresentem efeitos comprovadamente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos em mamíferos (BRASIL, 2001).

O sabão produzido com pH entre 8 e 10, se enquadra na classificação de Risco I, e tem sua aplicação de uso domiciliar para limpeza e desinfecção. Quando o mesmo se encaixa em Risco II, em razão de seu pH, geralmente, o seu uso é para profissionais habilitados, em locais que se façam necessários a sua aplicação, portanto, tendo o uso obrigatório de equipamentos de proteção individuais (EPI's) e cuidados no manuseio (BRASIL, 2001).

1.2 TECNOLOGIA DE MICROEMULSIFICAÇÃO

As emulsões podem ser classificadas como macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões, apresentando diferenciação nos materiais e metodologias aplicadas para sua obtenção. Pesquisas têm demonstrado um resultado de eficácia bem significativo das microemulsões contra uma gama de microrganismos, incluindo bactérias, vírus fungos e leveduras. Além disso, resultando na eficácia sobre a integridade estrutural da membrana plasmática, protegendo a substância ativa ou fármaco da luminosidade, umidade e calor (FARIA, 2023).

O termo microemulsão foi dado por Schulman, 1959 por inúmeras investigações sobre as emulsões transparentes e lípidas, esse termo é dado por constituir gotículas nanométricas dispersas. As microemulsões são dispersões coloidais elaboradas a partir de tensoativos, fase oleosa, além de serem constituídas por fase aquosa, muitas vezes com associação de co-tensoativo facilitando sua solubilidade ou diminuindo as combinações destes líquidos (SOARES, 2011).

Por serem sistemas termodinamicamente estáveis, são facilmente obtidos, com a formação espontânea, e sem fornecimento de qualquer energia externa ou força mecânica. A microemulsão é límpida e de baixa viscosidade, além, de conter na sua composição uma parte hidrofóbica (solúvel em óleo) e hidrofílica (solúvel em água), sendo difícil distinguir ou diferenciá-las pelo seu tamanho das gotículas da fase interna (ASSIS, 2014).

As microemulsões são aplicadas a esses sistemas devido ao baixo custo e por atuar como carreadores de substâncias ativas (fármacos), o qual aumenta a vida útil de interesse, potencializando a sua estabilidade, por manter maior estabilidade temporal e protegendo contra o meio (SOARES, 2011).

Existem vários métodos que podem ser empregados para a preparação destes sistemas, assim, podemos diferenciar os tipos de microgotas em emulsões múltiplas que são turvas e necessitam de energia na sua preparação, têm aplicação paralelamente a força de adesão a energia interfacial e são cineticamente instáveis e as microemulsões que apresentam cores claras e transparentes, se formando espontaneamente, tendo baixa energia interfacial e são termodinamicamente estáveis. As emulsões múltiplas são muito utilizadas em várias áreas das ciências cosmética e farmacêutica demonstrando cada vez mais um sistema mais complexo (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As emulsões em geral podem se diferenciar de uma formulação óleo em água (O/A), onde a textura é cremosa e geralmente apresenta condutividade elétrica muito mais elevada que emulsão e a formulação água em óleo (A/O), geralmente são mais gordurosas. As emulsões ainda podem apresentar a forma bicontínua pelas suas características (OLIVEIRA *et al.*, 2004). As estruturas estão representadas na Figura 3.

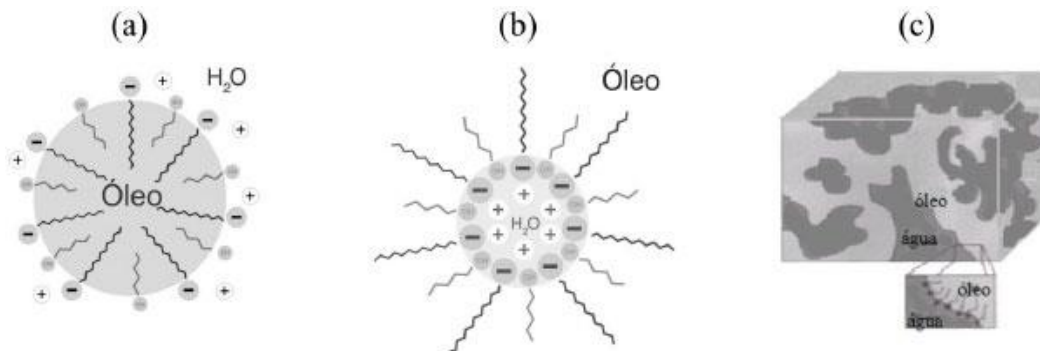


Figura 3. Representação esquemática das três microestruturas de microemulsões mais comumente encontradas: (a) ME óleo em água (O/A) e (b) ME água em óleo (A/O), empregando surfactante aniônico e álcool de cadeia média, e (c) ME bicontínua.

Fonte: Silva *et al.*, 2015.

Sendo assim, é importante ressaltar a grande importância em torno da microtecnologia nas áreas farmacêuticas, químicas e biológicas, sendo possível aumentar a biodisponibilidade de moléculas terapêuticas, favorecendo a interação e potencialização biológicas.

1.2.1 Uso de tensoativos

Os tensoativos são fundamentais na formação da microemulsão, pois promove a mistura dos líquidos imiscíveis através da redução da tensão superficial, possuindo caráter anfifílico, com afinidade tanto para a fase oleosa quanto para a aquosa. Os tensoativos ou surfactantes são produtos mais versáteis da indústria química, onde suas moléculas anfifílicas são utilizadas em todas as áreas industriais, desde detergentes domésticos a lamas de perfuração e produtos alimentares a produtos farmacêuticos (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Dessa forma, os tensoativos irão favorecer na formação das microemulsões usados para estabilizar tais sistemas sendo assim, eles classificados em tensoativos não iônicos, catiônicos, zwitteriônicos e aniônicos. As combinações de tensoativos iônicos e aniônicos são muito eficazes para aumentar a extensão da região da microemulsão (SÁ, 2020). Para a melhor escolha dos tensoativos leva-se em consideração a seleção do equilíbrio entre as fases de equilíbrio hidrofílico/lipofílico (HLB) - que é a contribuição relativa de fragmentos hidrofílicos e hidrofóbicos da molécula de surfactante, assim, surfactantes de baixo HLB (3-6) geralmente são favorecidos para a formação de microemulsões água-em-óleo (A/O), enquanto surfactantes com altos HLBs (8-18) são preferidos para a formação de sistemas de microemulsão óleo em água (O/A). A junção de dois tensoativos com diferentes valores de HLB proporciona sistemas com maior estabilidade, tornando-se essencial adição de tensoativos não iônicos para melhorar a estabilidade da formulação (ALBUQUERQUE, 2020).

Os tensoativos não iônicos são conhecidos pelo fato das suas moléculas em meio aquoso não se ionizarem, além de serem compatíveis quimicamente com quase

todos tensoativos e suas propriedades quase não são afetadas pelas variações do pH (ALBUQUERQUE, 2020). Dentre os tensoativos não iônicos utilizados pela indústria química e farmacêutica destacam-se os nonilfenol etoxilado (Renex 95) e dietanolamina de ácido graxo de coco (Amida 60).

1.2.2 Nonilfenol Etoxilado (Renex 95)

O nonilfenol etoxilado (RENEX 95) é um surfactante não iônico que funciona como eficiente surfactante de baixo valor econômico. Além da sua cadeia hidrofóbica, a qual é proveniente do grupo nonilfenol, sua parte hidrofílica (solúvel em água) encontra-se na cadeia de óxido de etileno. Quando mais etoxilado, maior será sua ação hidrofílica, o que resultará na alteração da sua solubilidade em água com o seu poder espumante, detergente e favorece seu uso como emulsionante, detergente, solubilizante, umectante e desengraxante. São utilizados há muitos anos, tanto na indústria, comércio, agricultura e aplicações domésticas, como em produtos de limpeza (RODRIGUES, 2019).

A fórmula do Renex atua reduzindo a tensão superficial facilitando sua interação com outras substâncias. A fórmula geral do Renex está ilustrada na Figura 4.

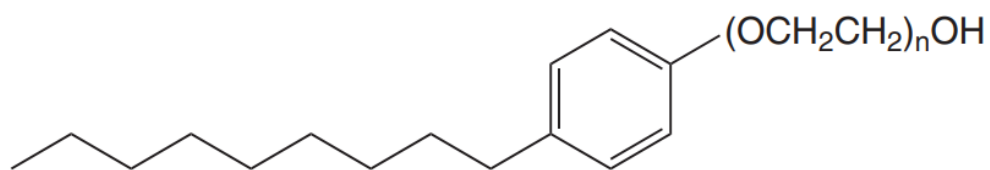


Figura 4 Representação da fórmula geral do Renex
Fonte: Campos *et al.*, 2012.

1.2.3 Dietanolamina de Ácido Graxo de Coco (Amida 60)

A amida 60, representada na Figura 5, é uma fórmula baseada em matérias primas naturais e biodegradáveis e tem a denominação comercial como dietanolamina de ácido graxo de coco, conhecida por ser um tensoativo não iônico. Uma das suas principais funções é o espessamento, além de ser um interessante estabilizante de espuma e agente emoliente. Aparentemente, é um líquido viscoso e de cor castanho amarelado. As suas aplicações são encontradas em formulações de produtos cosméticos, domissanitários e industriais. Além de sua ação tensoativa, apresentam benefícios como: aumento de viscosidade do produto, reduzindo a agressividade dos produtos químicos nas mãos, aumentando o poder de detergência e causando melhora na formação de espuma e por estabilidade (RODRIGUES, 2019).

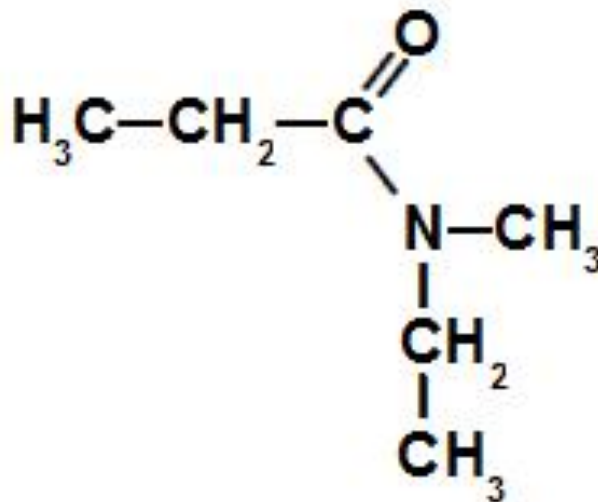


Figura 5 Fórmula geral da Amida 60
Fonte: Brasil Escola, 2023.

1.3 MECANISMO DE EFERVESCÊNCIA NA DESINTEGRAÇÃO

Os dispositivos efervescentes também usados como higienizadores existem no mercado há mais de 250 anos, o grande interesse por essa fórmula farmacêutica se deu pelo interesse devido a dois fatores: o modo de preparo, por serem formas de simples obtenção e administração, e no uso oral, visa mascarar sabores desagradáveis de alguns fármacos ou princípios ativos, devido à formação de gás carbônico (CO₂). Durante todo o século XX, as misturas efervescentes mantiveram

uma grande popularidade relativa, vindo a ganhar força cada vez mais em nível de indústria farmacêutica já no século XXI (PERACINI, 2008).

Segundo a Farmacopeia Europeia, a definição de pós efervescentes é aquela o qual os pós não são revestidos e geralmente contém ácidos e carbonatos, ou bicarbonatos e reagem de forma rápida em contato com água, resultando na liberação de CO₂ (SANTOS, 2011).

Para que se obtenha uma fórmula farmacêutica efervescente é necessário ter o controle não só das condições ambientais, mas também da melhor escolha da matéria prima a ser utilizada no processo de armazenamento, secagem e encapsulação. Vários métodos são utilizados na produção de efervescência, como a granulação por via úmida, fusão, granulação por leite fluidizado e compressão direta (DORDIO, 2012).

No processo de obtenção por via seca, o agente efetor é por pressão - representado pela resistência mecânica, nestas as forças podem ser ativas ajudando no processo de compactação ou residuais que atua após a força de compactação. Além de ter sua eficácia na remoção de biofilmes, tem ação satisfatória sobre objetos e superfícies, proporciona uma melhor eficiência na rapidez e dispersão de ativos (DORDIO, 2012).

1.4 INSUMO DE INTERESSE INDUSTRIAL (TIMOL)

As plantas são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas que apresentam papel no desenvolvimento de novos compostos com diferentes aplicações biológicas (ALMEIDA, 2015). Os óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis, odoríferos e imiscíveis, ou muito pouco miscíveis em água e atuam em funções biológicas como metabólitos secundários importantes à sobrevivência das plantas relacionadas aos mecanismos de defesa, microrganismos, insetos e animais (REIS, 2020).

Os óleos essenciais são formados principalmente por classes de ésteres de ácidos graxos, terpenoides como mono e sesquiterpenos, fenilpropanoides e álcoois aldeidados (ALMEIDA; GHERARDI, 2020). Os terpenoides constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados pelo número de

carbonos, em unidades teóricas de 5 carbonos, o isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura (ALMEIDA, 2015). Estes metabolitos são ativos contra vários microrganismos, devido ao caráter lipofílico, cuja atividade antimicrobiana ocorre por provocar alteração da permeabilidade da membrana (CASTRO, 2021).

O timol (2-isopropil-5-metil-fenol) é classificado como monoterpreno, volátil, com baixa solubilidade em água e baixa palatabilidade devido ao seu sabor e cheiro desagradáveis, com densidade de 0,96 g/cm³ a 25°C e ponto de fusão entre 49°C e 51°C, além de ser um principal constituinte de vários óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (OLIVEIRA, 2016; SILVA, 2018). Encontrado em várias espécies de plantas da família *Lamiaceae* (*Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* e *Monardagêneros*) e outras plantas, dando destaque à *Thymus vulgaris*.

Sua biossíntese (Figura 6) deve-se à aromatização do γ -terpineno em *p*-cimeno, seguido pelo processo de hidroxilação desse composto I, por meio de uma rota alternativa do tipo triose fosfato/piruvato, diferente da via mevalônica, comum à maioria dos monoterprenos aromáticos oriundos dos vegetais (OLIVEIRA, 2016).

O gênero *Thymus* tem sido tradicionalmente usado por sua potente atividade bactericida, fungicida e virucida (SILVA, 2018). O timol é reconhecido por ter um número de propriedades farmacológicas, incluindo a atividade antimicrobiana e antifúngica, o que pode envolver efeitos sobre a membrana celular (CASTRO, 2021).

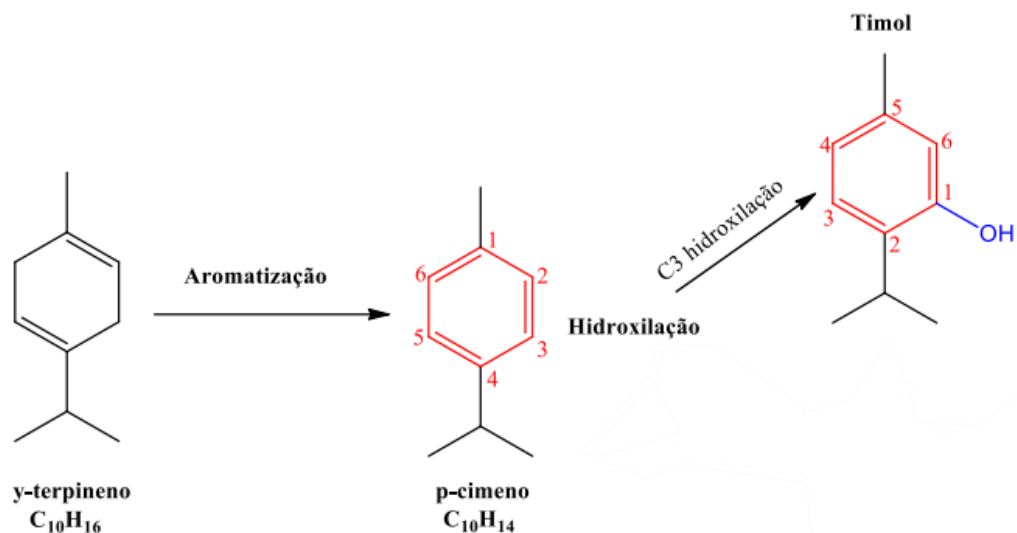


Figura 6. Origem metabólica do timol.
Fonte: Adaptado de Silva, 2018.

Vários estudos validam os efeitos do timol e do óleo essencial de *T. vulgaris* em cepas bacterianas típicas, como *S. aureus* resistente. Com o crescente problema

de multirresistência aos patógenos, o interesse pelos metabólitos secundários foi intensificado (SAKKAS *et al.*, 2016).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais geralmente está associada a compostos como eugenol, alicina, timol e carvacrol e a substâncias como o linalol, sabineno, mentol, mirceno e camphene. Eles agem como agentes fenólicos, perturbando a força de prótons, o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular (REIS, 2020; MATOS, 2021).

O timol atua principalmente contra bactérias *Gram*-positivas, *Gram*-negativas e leveduras. O seu mecanismo de ação compreende na ruptura da membrana citoplasmática dos microrganismos, aumentando a permeabilidade celular, causando extravasamento do material celular e a desregulação da sua função (MICHALSKA-SIONKOWSKA *et al.*, 2017).

A Fundação espanhola Eroski apontou que o timol pode ser empregado na indústria alimentícia como antibacteriano e antioxidante, semelhante ao 2,6-Bis-(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) – BHA e ao ((1,1-dimetiletil)-4-metoxifenol) – BHT, dois potentes antioxidantes sintéticos usados na alimentação (SILVA, 2018).

1.5 MICRORGANISMOS DE INTERESSE

O surto de doenças contagiosas oriundas de microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas amedronta a população e se alastra de forma rápida. Destacando a higienização das mãos como a forma mais eficaz para a prevenção e propagação de doenças infecto contagiosas (ZHU *et al.*, 2019).

A pele das mãos é o maior reservatório de diversos microrganismos, que são transferidos de um local para outro direta ou indiretamente. Sendo assim, a lavagem das mãos, com água e sabão, dificulta a propagação destes contaminantes (MALTA *et al.*, 2020).

A pandemia da COVID-19 foi um dos maiores desafios vivenciados pela humanidade durante o século XXI, ceifando mais de 6 milhões de vidas humanas em todo o planeta, em um curto espaço de tempo, e com um poder de transmissibilidade assustador. A COVID-19, doença causada pelo SARS-CoV-2, se propaga através de

gotículas no ar, por meio de tosse, espirros e até mesmo da fala, causando infecções do trato respiratório e síndromes gripais (ZHU *et al*, 2019).

Segundo a OMS, protocolos de tratamentos eficazes foram criados para proteger a saúde da população. Entre as principais medidas regulamentadas pela OMS, passo primordial para evitar a contaminação por SARS-CoV-2, compreendeu o ato de lavar adequadamente as mãos com a utilização água e sabão ou higienizador à base de álcool para eliminar vírus e eventuais microrganismos nocivos à saúde humana (WHO, 2019).

A ação destes produtos no vírus se baseia na desnaturação de glicoproteínas presentes em sua camada mais externa, envelope viral. A desnaturação impede o agente patógeno de exercer suas funções biológicas, químicas e físicas. Embora o sabão tenha sido considerado o agente mais eficiente para a inativação do SARS-CoV-2, o uso de desinfetantes, géis, cremes, toalhetes e líquidos contendo mínimo de 60% p/p de álcool, foram muito úteis. Os álcoois mais utilizados foram o etanol, o propanol e o isopropanol (RAMOS; FERNANDES, 2020).

Além da grande preocupação na emergência sanitária em destaque, existiu também a preocupação da infecção transmitida por dejetos, transmissão entérica. Durante o surto mundial da COVID-19, estudos relataram a elevada transmissão em um edifício e em um voo, devido ao uso comum do toalete, que proporcionou a transmissão fecal-oral. Esta conclusão foi baseada na observação da presença de ácido ribonucleicos do SARS-CoV-2 em águas residuais (RAMOS; FERNANDES, 2020).

Portanto, microrganismos como as bactérias *Gram-positivas*, *Gram-negativas*, parasitas, vírus e fungos, mesmo após horas, dias e até meses, apresentam altos índices de contaminação de forma direta ou indireta, favorecendo maior capacidade em colonizar superfícies, ambientes e materiais (SANTOS *et al.*, 2022).

Em uma pesquisa desenvolvida pelos autores Santos *et al.* (2022), adotando como modelo a Universidade Federal de Sergipe (UFS), no campus universitário localizado na cidade de Itabaiana, foi desenvolvido um mapa de risco no qual foram adicionados os graus de risco de baixo, médio e alta intensidade de contaminação por vírus.

O mapa apresentou as salas de aula, banheiros, laboratórios e auditório como as áreas de maior risco de contaminação. Estes locais são caracterizados pela alta circulação de pessoas ao longo do dia, com contato direto em maçanetas, corrimão,

vidraças, bancadas, além de serem espaços com pouca circulação de ar. Nos locais com pouca ventilação, o vírus permanece altamente contagioso, e pode permanecer de 6 a 7 dias. (WHO, 2019; TRIGGLE *et al.*, 2021; SANTOS, 2022).

Além da disseminação da COVID-19, através do contato com as mãos, outros microrganismos patogênicos e foco do estudo em tela, também são originados via enterica e podem ser transmitidos pelo contato das mãos e disseminados nos ambientes, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida krusei* (DENAMUR *et al.*, 2021; CHEUNG, BAE, OTTO, 2021; SOUZA, 2022).

Escherichia coli é um membro comensal da microbiota intestinal de vertebrados, bem como um patógeno oportunista de mamíferos e aves. Em humanos, sua prevalência é superior a 90% com concentração por grama de fezes de 10^7 a 10^9 unidades formadoras de colônias. Cepas de *E. coli* podem causar patologias extra intestinais (infecções do trato urinário (ITUs), diversas infecções intra-abdominais, pulmonares, cutâneas e de tecidos moles, meningite neonatal (NBM) e bacteremia) quanto patologias intestinais (DENAMUR et al, 2021).

Staphylococcus aureus é uma das causas mundiais mais frequentes de morbidade e mortalidade devido a um agente infeccioso. Este patógeno pode causar uma ampla variedade de doenças, variando de infecções de pele moderadamente graves a pneumonia fatal e sepse (CHEUNG, BAE, OTTO, 2021).

Candida krusei é uma espécie que vem ganhando destaque no cenário clínico de infecções oportunistas causadas por leveduras devido ao aumento do seu isolamento em pacientes com candidemia, principalmente, em pacientes com doenças neoplásicas hematológicas, neutropênicos, transplantados e em uso de terapia profilática com fluconazol e antimicrobianos de amplo espectro. Além disso, há relatos na literatura do isolamento desta espécie de algumas doenças, como a candidíase oral e vulvovaginal, onicomicose, endocardite, osteomelite e pneumonia (SOUZA, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar eficácia microbiológica do Timol microemulsionado inserido em dispositivo sanitizante efervescente inovador.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e caracterizar microemulsão contendo timol e surfactantes de uso domissanitário (ME/TML);
- Avaliar a estabilidade físico-química da ME/TML;
- Determinar concentrações bacteriostática e bactericida da ME/TML e do dispositivo sanitizante contendo ME/TML.

3 MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Timol 99-101% (Sigma Aldrich, Alemanha e Dinâmica, Brasil). Solventes orgânicos para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE (J.T.Backer, México e Dinâmica, Brasil). Tensoativos não iônicos nonilfenol etoxilado - Renex 95 e dietanolamina de ácido graxo de coco - Amida 60 (Peter Paiva, Brasil). O óleo de girassol (Salada, Brasil). Água ultrapurificada obtida através do sistema Milli-Q® (Merck Group, Alemanha). Sabouraud dextrose broth (Kasvi®), ágar Sabouraud dextrose (Merck®, USA), caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi®), ágar BHI (Kasvi®), resazurina (Sigma®, Alemanha) e placa de microdiluição em caldo tipo “U”, 96 poços.

3.2 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO

A realização do diagrama de fases pseudoternário (Figura 7) foi realizada para conhecer as proporções de cada componente para obtenção de microemulsão com melhores características de estabilidade.

A construção do diagrama de fases foi realizada através dos vértices de fase oleosa (óleo de girassol), fase aquosa (água) e mistura dos tensoativos (Renex 95 e Amida 60, na proporção de 3:1 p/p, respectivamente), representando os componentes puros sem adição de ativo.

O preparo das misturas de tensoativos, ocorreu sob agitação magnética a 300 rotações por minuto até obtenção de aspecto homogêneo. Esta mistura permaneceu durante um período de 24 horas. Foram testadas proporções de 1/9 a 9/1 (p/p).

Após este período, o óleo de girassol foi incorporado a mistura de tensoativos, com manutenção da agitação. Em seguida, água ultrapurificada foi adicionada à mistura de óleo e tensoativos. A adição de água ocorreu de 1 em 1 mL, com auxílio de uma micropipeta, até 20 mL, e de 10 em 10 mL, até 100 mL. Após cada adição, as misturas foram mantidas em repouso por 60 segundos e analisadas visualmente quanto ao aspecto de uma microemulsão: presença de efeito Tyndall e aspecto límpido, transparente, sem formação de grumos e separação de fases.

A partir das proporções obtidas dos componentes tensoativos, fase oleosa e fase aquosa, foram plotados os dados com o diagrama de fases pseudoternário. O gráfico foi construído com o auxílio do *software* Origin.



Figura 7. Fotografias ilustrando os equipamentos e utensílios para o desenvolvimento do diagrama de fases pseudoternário.
Fonte: Autora, 2023.

3.2.1 Tecnologia de Microemulsificação

O princípio ativo foi incorporado na fase oleosa em diferentes proporções na microemulsão, em função da solubilidade no óleo de girassol, previamente verificada. Após total solubilização, foi adicionada a mistura de tensoativos (Renex 95 e Amida 60, 3/1 p/p, respectivamente). Posteriormente, na fase aquosa, foi utilizada a água ultrapura. As amostras foram preparadas com mínimo de 15 dias de antecedência à realização dos testes.

3.3 OBTENÇÃO DE ME/TML COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Vários testes foram realizados a fim de determinar diferentes concentrações para a preparação da microemulsão, as quais foram colocadas em agitação magnética, proporcionando maior afinidade entre os insumos. Os testes foram realizados nessa seguinte ordem: Em um béquer de 50 mL foram adicionados 3 mL de óleo de girassol e o timol. Estes foram mantidos em agitação mecânica para que ocorresse a solubilização do ativo no óleo fixo vegetal. Em outro béquer foram adicionados 7 mL da mistura de tensoativos (Renex e Amida 60, 3/1 p/p, respectivamente), e mantidos sob agitação constante. Após a solubilização dos tensoativos, o óleo de girassol foi vertido no béquer que continha os tensoativos já solubilizados sob agitação. Em seguida, adicionou-se 3 mL de água ultrapura (fase aquosa), com a obtenção instantânea de microemulsão com características previamente descritas: efeito Tyndal presente, limpidez, transparência e ausência de grumos e ausência de separação de fases.

A Tabela 1 apresenta os insumos utilizados na produção da microemulsão, bem como suas respectivas funções.

Tabela 1. Componentes utilizados para produção da microemulsão.

INSUMOS	FUNÇÃO
Timol	Princípio ativo
Renex 95	Tensoativo/Surfactantes
Amida 60	Tensoativo/Surfactantes
Óleo de girassol	Fase oleosa
Água ultrapura	Fase aquosa

Fonte: Autora, 2023.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA MICROEMULSÃO

A microemulsão foi caracterizada considerando-se os parâmetros: tamanho médio da gotícula da fase interna, índice de polidispersividade (PDI), potencial Zeta, pH, teor e análises morfológicas por microscopia.

3.4.1 Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade (PDI)

O diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas e o PDI foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico, em equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, EUA), com diluição aquosa da amostra, na proporção de 1:100 (p/v).

3.4.1.1 Potencial Zeta

O potencial zeta foi analisado pela determinação da mobilidade eletroforética das gotículas da fase interna. As análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, EUA), com diluição aquosa da amostra, na proporção de 1:100 (p/v).

3.4.1.2 Mensuração do potencial hidrogeniônico (pH)

O pH da microemulsão desenvolvida foi mensurado pela inserção direta do eletrodo próprio para amostras semissólidas acoplado ao potenciômetro digital (Digimed, modelo DM-22), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,00 e 7,00, à temperatura de 25°C.

3.4.1.3 Teor

As amostras foram diluídas em metanol e filtradas em seringas acopladas a membranas de porosidade de 0,45 µm. Posteriormente, o ativo foi quantificado por CLAE-UV, seguindo o método previamente validado.

A fase móvel foi uma mistura de água acidificada com ácido fosfórico a 0,01 M e acetonitrila 73:27 (v/v), vazão de 1 mL/min, temperatura do forno a 50°C e volume de injeção de 30 µL. A fase estacionária foi a coluna C18 (5 µm -15 cm x 4.6 mm). O

comprimento de onda utilizado foi de 278 nm. O ensaio foi realizado com duração total de 23 minutos.

A validação do método analítico foi realizada com soluções de timol na faixa de concentração entre 6 µg/mL a 20 µg/mL. O coeficiente de correlação linear (R^2), encontrado após o cálculo da regressão linear, foi de 0,991 e a Equação da reta: $y = 21857x - 25418$.

Alto coeficiente de correlação significa que os dados se ajustam bem à regressão linear. Para métodos cromatográficos, a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) um valor acima de 0,90. M.Ribani, C. Grespan Bottoli, C.Collins et al.

3.4.1.4 Análise morfológica da ME/TML por microscopia óptica

Foram analisadas as imagens obtidas em microscopia óptica através de um microscópio Biológico Binocular FLW – 1000 (FELDMANN WILD LEITZ), com amostras previamente coradas com solução azul de metileno (IMPEX).

3.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ME/TML

O estudo de estabilidade da microemulsão foi conduzido conforme preconizado pelas diretrizes do ICH (ICH, 2003), RDC 01/2005 ANVISA e Guia para a realização de estudos de estabilidade (ANVISA, 2005).

A microemulsão desenvolvida foi exposta em diferentes condições de temperatura, ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), geladeira ($4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) e estufa ($40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), por 90 dias. As análises físico-químicas ocorreram nos dias 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º, após exposição. Foram avaliados o diâmetro hidrodinâmico medio, PDI, potencial Zeta, pH e teor.

3.6 ESCOLHA DA BASE SAPONEICA

Para a elaboração da base saponificada, foram elaboradas várias formulações, para obtenção de sabão sólido com pH recomendado para produtos domissanitários, com classificação de Risco I, segundo a RDC nº 184/2001 da ANVISA, a fim de proporcionar a higienização, desinfecção e desinfestação em ambientes coletivos ou públicos (ANVISA, 2010).

A Tabela 2 apresenta os insumos utilizados nos testes de saponificação para obtenção da base saponificada, assim como as respectivas funções destes compostos.

Tabela 2. Insumos utilizados na obtenção das bases saponificadas e suas funções

INSUMOS	FUNÇÃO
Soda cáustica	Base forte, reagente alcalino
Ácido sulfônico	Detergente, agente corretivo de pH
Álcool etílico hidratado 92° INPM	Solvente orgânico, dissolução do óleo fixo vegetal
Óleo de girassol	Óleo fixo vegetal reciclado, reagente
Água purificada	Diluyente da soda cáustica

Fonte: Autora, 2023.

A base saponificada utilizada no estudo em tela foi obtida através reação de saponificação, do óleo fixo vegetal reciclado e solução aquosa de hidróxido de sódio 50% p/v, proporcionando a formação de glicerina (álcool solúvel em água) e sais de ácidos graxos (sabão bruto). Entretanto, os insumos ácido sulfônico ou álcool etílico hidratado foram adicionados ao processo de obtenção da base saponificada (Tabela 3), afim de verificar benefícios no produto obtido na reação de saponificação.

Para obtenção da base saponificada, inicialmente a água foi aquecida a ± 30 °C e adicionada aos poucos sobre escamas de soda cáustica, com agitação manual com auxílio de bastão de vidro. Em seguida, a solução alcalina obtida foi vertida, paulatinamente sobre o óleo de girassol, previamente aquecido a ± 40 °C. Esta mistura permaneceu sob agitação mecânica por cerca de 30 minutos, até obtenção de mistura homogênea.

Quando estipulado, foi adicionado ácido sulfônico para ajuste do pH ou álcool hidratado, com função dissolver o óleo e agilizar a obtenção da base saponificada. Em seguida, o produto da reação de saponificação permaneceu em repouso, por 45 dias

(tempo de cura). Após tempo de curado, foi selecionada a base saponificada com aspecto físico sólido e pH entre 8 e 10.

Tabela 3. Formulações de sabões em diferentes proporções testadas.

ÓLEO DE GIRASSOL	SODA CÁUSTICA	ÁCIDO SULFÔNICO	ÁLCOOL	ÁGUA
200 ml	40 ml	7 ml	-	40 ml
200 ml	40 ml	13 ml	-	40 ml
200 ml	40 ml	20 ml	-	40 ml
200 ml	40 ml	100 ml	-	40 ml
200 ml	40 ml	110 ml	-	40 ml
200 ml	50 ml	-	-	50 ml
200 ml	50 ml	100 ml	-	50 ml
200 ml	30 ml	-	-	30 ml
200 ml	28 ml	-	-	28 ml
200 ml	28 ml	-	10 ml	28 ml
200 ml	28 ml	-	5 ml	28 ml

Fonte: Autora, 2023.

3.6.1 Caracterização da base saponéica

Para caracterização da base saponéica foram realizados os testes de pH, teor de umidade, teste de espuma e características organolépticas.

3.6.1.1 pH

O pH da base saponéica foi determinado em triplicata, com fita de medição de pH (Merck), sobre a base previamente umectada com água purificada.

3.6.1.2 Umidade

O teor de umidade da amostra (5g de base saponéica) foi analisado em triplicata a 105 °C, em estufa, em intervalos de 1 hora até manutenção de peso constante (Figura 8).



Figura 8. Fotografias ilustrativas do teste de umidade da base saponéica.
Fonte: Autora, 2023.

3.6.1.3 Teste de espuma

No teste de espuma analisou-se a variação da altura da espuma conforme o tempo. O teste, em triplicata, foi realizado em proveta com solução obtida a partir de 1 g da base saponosa dissolvida em 100 mL de água purificada aquecida. Após arrefecimento da amostra, a proveta foi agitada por 10 segundos e o volume de espuma aferido.

3.6.1.4 Características organolépticas

As características organolépticas analisadas para a base saponosa foram aspecto, cor e odor.

3.7 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DA ME/TML E DO DISPOSITIVO SANITIZANTE POR CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC)

O estudo de compatibilidade dos insumos foi realizado através da calorimetria de varredura diferencial (DSC) (MALVERN, 2023). Sob a atmosfera de nitrogênio e vazão de 50 mL/min, as amostras utilizadas passaram por um processo de aquecimento de cerca de 10° C por minuto, até que aquelas compostas por timol atingissem a temperatura de 80° C. Foram pesadas 5 mg de amostra em cadinhos de platina realizando corridas das misturas.

A Tabela 4 apresenta as misturas analisadas, bem como as proporções utilizadas de cada uma no presente estudo.

Tabela 4. Misturas físicas analisadas no estudo de DSC.

MISTURAS	PROPORÇÃO p/p
TIMOL + ACIDO CITRICO	1/1
TIMOL + AMIDA 60	1/1
TIMOL + CARBONATO DE SÓDIO	1/1
TIMOL + OLEO DE GIRASSOL	1/1
TIMOL + RENEX	1/1

Fonte: Autora, 2023.

3.8 ELABORAÇÃO DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE

O dispositivo contendo diferentes bases, percarbonato de sódio, bicarbonato de sódio ou carbonato de sódio, foram formuladas e testadas em diferentes proporções das bases, bem como de ácido cítrico, sabão granulado e de microemulsão, para definição da formulação.

Com o objetivo de melhorar a potencialização da efervescência do dispositivo, o presente trabalho abordou três pós, sendo eles: Percarbonato de sódio (PSD), bicarbonato de sódio (BSD) e carbonato de sódio (CSD). Destes três pós, foram desenvolvidas sete formulações que posteriormente foram classificadas conforme as caracterizações em torno do aspecto quebradiço do dispositivo, excesso de oleosidade, desintegração e evolução das bolhas durante a efervescência.

A Tabela 5 apresenta os insumos utilizados na produção do referido dispositivo efervescente, bem como a função de cada um na formulação estudada.

Tabela 5. Insumos utilizados para produção do dispositivo efervescente

INSUMOS	FUNÇÃO NA FORMULAÇÃO
Percarbonato de sódio	Oxidante
Bicarbonato de sódio	Neutralizante
Carbonato de sódio	Agente tamponante
Ácido cítrico	Efervescente
Sabão granulado	Base saponeica
Timol	Ativo
Microemulsão	Sistema encapsulado

Fonte: Autora, 2023.

Três pós foram pesquisados, percarbonato de sódio (PSD), bicarbonato de sódio (BSD) e carbonato de sódio (CSD), bem como o ácido cítrico (ACT).

3.8.1 Processo de moldagem e secagem do dispositivo efervescente

Os sistemas multiparticulados foram moldados por metodologia simplificada utilizando fôrmas de silicone e dispositivo para moldagem fabricado por impressora 3D (Voolt3D). Foram utilizados filamentos comerciais de impressão FDM (conforme Figura 17), com 1,75 mm, ou seja, Poliláctico (PLA) (lote 217.187.012) fornecido pela 3D Fila (Belo Horizonte, Brasil). O processo de secagem foi em ambiente com temperatura controlada, com umidade na faixa de 25 % e temperatura em torno de 20 °C, por 3 dias. As condições ambientais foram aferidas por termohigrômetro (UNITY).

3.8.1.1 Produção do lote

Após a escolha da melhor execução da formulação, foi produzido um lote de 36 unidades. Foram obtidos dispositivos com 18,12 g, de maneira a possibilitar a inserção de 4,12 g de microemulsão, valor calculado considerando a dissolução do dispositivo em 100 mL de água.

3.9 CARACTERIZAÇÃO DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE

O dispositivo efervescente foi avaliado visualmente quanto ao aspecto após a secagem. Para avaliação da efervescência e da desintegração, o dispositivo foi colocado em um cálice contendo 125 mL de água destilada a 25 °C. O dispositivo

efervescente foi caracterizado conforme os parâmetros farmacotécnicos sendo eles: peso médio, friabilidade, umidade, teor e tempo de desintegração.

3.9.1 Peso médio

A determinação de peso foi realizada conforme descrição para produtos em dose unitária. Inicialmente foi determinado o peso médio de 20 unidades do lote, e então pesadas individualmente 20 dispositivos em balança de precisão analítica (Shimadzu).

3.9.1.1 Friabilidade

A determinação de resistência mecânica foi realizada pelo teste de friabilidade. Pesou-se 10 dispositivos com exatidão em balança de precisão analítica, e estas foram submetidas à ação do aparelho friabilômetro (LABOR), em que foram efetuadas 100 rotações girando em torno de seu eixo a uma velocidade de 25 ± 1 rotações por minuto.

3.9.1.2 Umidade

Analisou-se o teor de umidade das amostras em triplicata conforme o item 3.6.1.2.

3.9.1.3 Tempo de desintegração

O teste de desintegração foi simulado conforme aplicação final do produto. O dispositivo foi dissolvido em 100 mL de água destilada, e o tempo de desintegração foi determinado por um cronômetro. O experimento foi realizado em triplicata.

3.9.1.4 Teor

O teor de timol foi obtido a partir da dissolução do dispositivo em 100 mL de água destilada, e após a completa desintegração. A suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro. Alíquotas de 100 μ L foram coletadas e diluídas novamente em metanol em balão de 10 mL. As amostras foram filtradas em seringas acopladas a membranas de porosidade de 0,45 μ m. Posteriormente, o ativo foi quantificado por CLAE-UV, seguindo o método previamente validado.

3.10 TESTES COM MICRORGANISMOS DA MICROEMULSÃO E DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE

3.10.1 Estudo da Atividade Antimicrobiana por Ensaio de Disco-difusão

O método de ensaio de disco-difusão foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) com os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Cândida krusei*. Para realizar o ensaio de disco-difusão, com o auxílio de swab estéril, o inóculo já com microrganismo (100 μ L ou 0,1 mL) foi semeado na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton, até a obtenção de um esfregaço uniforme.

Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 20 μ L dos produtos. Os testes foram realizados

em triplicata, com controle positivo e negativo e as leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro.

3.10.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de diluição em caldo

O método de diluição em caldo foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) com os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida krusei*. Foram realizadas diluições em caldo LB dos inóculos microbianos na concentração de 0,5 na escala de *McFarland* na ordem de 1:150 (100 µL ou 0,1 mL dos inóculos em 15 mL de caldo LB), resultando em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL.

Os produtos a serem testados foram diluídos em caldo LB em diferentes concentrações. Então, adicionou-se em *Eppendorffs* 100 µL ou 0,1 mL do inóculo na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 100 µL ou 0,1 mL das diferentes concentrações dos produtos a serem testados, resultando em uma concentração final de bactérias de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 100 µL ou 0,1 mL do inóculo na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 100 µL ou 0,1 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 100 µL ou 0,1 mL de caldo LB e 100 µL ou 0,1 mL do produto a ser testado.

Os testes foram realizados em triplicata. Os *Eppendorffs* foram incubados a 36,5°C por 18 horas e então as diluições foram semeadas em placas contendo ágar Padrão para Contagem (ágar PCA) e incubadas a 36,5°C por 18-24 horas (Figura 9). A CBM foi determinada na menor concentração dos produtos a serem testados onde foram observadas colônias nas placas.



Figura 9. Ilustração dos equipamentos e utensílios utilizados no estudo microbiológico (CIM e CBM).
Fonte: Autora, 2023.

De acordo com a CLSI (2015), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo determinado por turbidez em testes de sensibilidade por diluição em caldo. No caso dos produtos a serem testados, o contato destes com o caldo LB deixou a solução diluída com aspecto leitoso e, portanto, com elevada turbidez. Assim o método convencional de leitura da turbidez a 625 nm, após incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo foi inviabilizada nos testes.

Então, a metodologia para a determinação da CIM foi modificada de acordo com Ristivojević *et al.* (2016). Após o período de incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo, o método colorimétrico da resazurina sódica 0,01% (p/v) foi utilizado, aplicando-se 20 μ L da solução de resazurina em 100 μ L das diluições, para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa o crescimento das bactérias (Figura 10). Portanto a CIM foi definida como a menor concentração dos produtos a serem testados que

inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina (Figura 11).

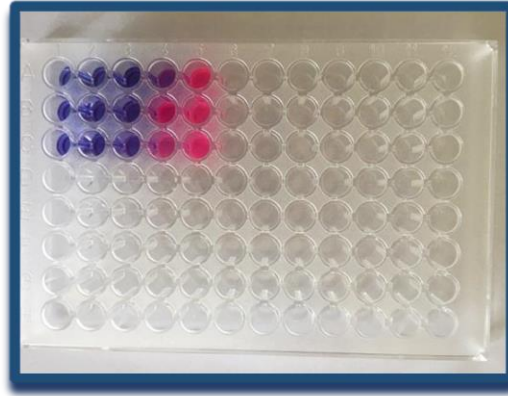


Figura 10. Ensaio de determinação de CIM utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular.

Fonte: Autora, 2023.

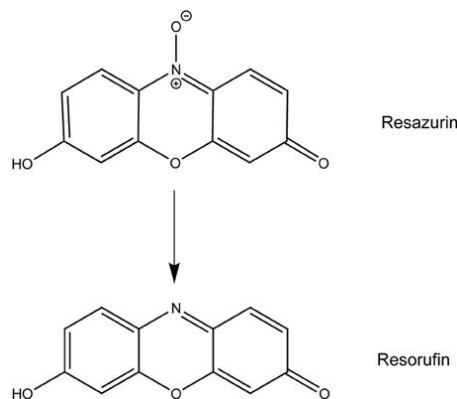


Figura 11. Redução da resazurina em resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas.

Fonte: SCHMITT *et al.*, 2013.

Os microrganismos testados no estudo compreenderam em *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida krusei*. O primeiro trata-se de uma bactéria gram-negativa, geralmente encontrada no trato gastrointestinal inferior dos organismos de sangue quente. O segundo trata-se de uma bactéria gram-positiva, normalmente encontrada na pele e nas fossas nasais, podendo gerar infecções graves, já o terceiro compreende em um fungo, encontrado em m imunocomprometidos e naqueles com malignidades hematológicas (CHIPINGA, 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO

O diagrama de fases pseudoternário possibilita a identificação das regiões geradoras de microemulsões com análise à presença de seus componentes e níveis de estabilidade. Na construção dos diagramas sobre os pontos geradores das emulsões, forma-se um triângulo equilátero, na qual são apresentados os locais de formação das microemulsões (MENDONÇA, 2005).

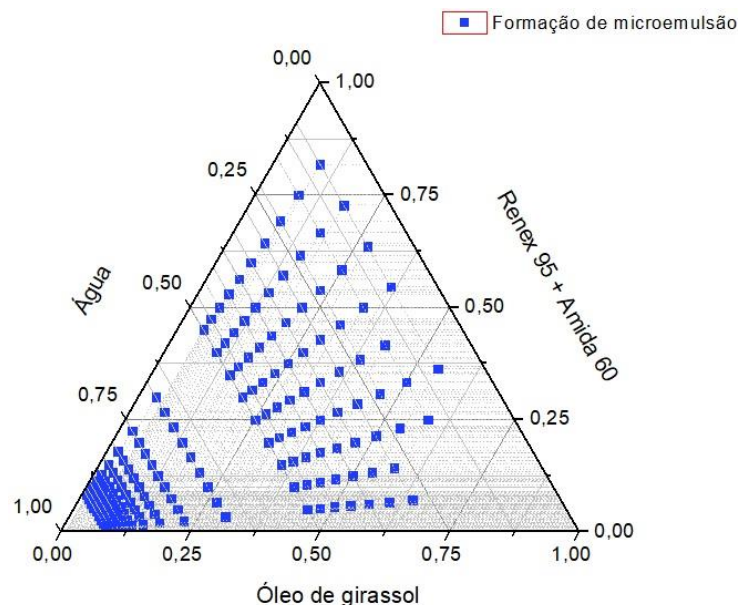


Gráfico 1. Elaboração do diagrama de fases pseudoternário.
Fonte: Autora, 2023.

Com análise aos dados apresentados no Gráfico 1 do diagrama de fase pseudoternário, contendo tensoativo (Renex + Amida 60) a zona de formação da microemulsão selecionada para estudo compreendeu na que demonstrou 21,43 % de óleo de girassol, 50 % de tensoativos (Renex 95 e Amida 60 - 3/1 p/p), e 28,57% de água, uma vez que a região é propícia para a formação da microemulsão, previamente podemos classificar a microemulsão formada em O/A. O diagrama de fases foi preparado a partir de nove ensaios, nas seguintes proporções: 1:9 até 9:1, sendo formado de maneira espontânea. No processo de formulação foi observado um

aspecto límpido e sistemas transparentes, o diagrama permitiu encontrar a região de obtenção da ME com maior estabilidade: 21,43% de óleo de girassol, 50% da mistura de tensoativos (RENEX + AMIDA 60 3/1 p/p), e 28,57% de água.

Normalmente, os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas, uma vez que os demais sistemas apresentam como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já os sistemas microemulsionados líquidos são caracterizados como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes (FORMARIZ, 2004).



Figura 12. Formação da microemulsão.
Fonte: Autora, 2023.

Em análise ao percentual das fases de formulação, observaram-se semelhanças na fase aquosa e na oleosa, de tal maneira surgiu a necessidade da realização de um estudo morfológico com o objetivo de verificar qual a microemulsão originada.

Tabela 6. Obtenção de ME/TML com diferentes concentrações.

	Concentração timol mg/ml	Tamanho	PDI	ZETA	pH
M 1	1 mg/ml	379,7 ±277,7	0,164±0,0433	-37,83±0,125	10,81
M 5	5 mg/ml	543,5±12,08	0,32433±0,0598	-36,97±2,245	10,65
M 10	10 mg/ml	588,3 ±10,41	0,22633±0,0196	-31,23±0,531	10,55
M 15	15 mg/ml	599,4 ±12,52	0,19567±0,0255	-30,4±0,356	10,74
M 20	20 mg/ml	561,9±7,537	0,254±0,0637	-37,2±0,163	10,79
M 25	25 mg/ml	568,1±28,04	0,022567±0,0361	-29,47±0,386	10,51
M 30	30 mg/ml	567,9±8,113	0,239±0,0131	-29,63±0,205	10,57

Fonte: Autora, 2023.

A formulação M30 (Figura 12), com 30 mg/mL de timol, apresentou PDI próximo a zero ($0,239 \pm 0,0131$), indicando distribuição de tamanho homogênea e potencial

Zeta com carga negativa – $29,63 \pm 0,205$. O pH se manteve dentro dos parâmetros estabelecidos para domissanitários variando de 10,51 a 10,81. As características físico-químicas avaliadas nas ME/TML permitiram indicar a concentração máxima de TML (30mg/mL).

4.3 ANÁLISE DA ME/TML 30MG/ML DE TML POR MICROSCOPIA ÓPTICA

A microscopia óptica foi utilizada com um corante hidrofílico, no intuito de identificar as fases do sistema, para classificação do tipo de emulsão: óleo em água O/A ou água em óleo A/O. Na Figura 13, apesar da coloração azul observada em 13B não foi possível realizar classificação do tipo de emulsão, pois o próprio veículo do corante pode proporcionar alterações na estrutura do sistema. Entretanto, como o azul de metileno é um composto aromático heterocíclico solúvel em água e foram observadas gotículas sem coloração na fase interna (13B), os autores sugerem que a ME/TML 30mg/mL de TML seja classificada como O/A (PEREIRA, 2019).

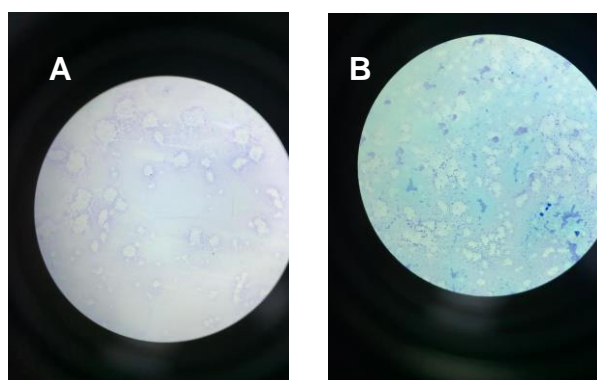


Figura 13. Microscopia óptica da microemulsão desenvolvida contendo 30mg/mL de timol. (A) sem corante azul de metileno; (B) com corante azul de metileno.

Fonte: Autora, 2023.

4.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ME/TML

Os estudos de estabilidade acelerada da microemulsão de timol foram realizados no período de 90 dias, e a microemulsão produzida sem os ativos também

foi submetida aos processos. As amostras foram caracterizadas logo após a produção (dia 0), e nos dias 7, 15, 30, 60 e 90, em triplicata e em três condições de armazenamento: temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), geladeira, ($4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) e estufa ($40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$). A estabilidade foi determinada pela avaliação das possíveis alterações dos parâmetros de tamanho, PDI, potencial Zeta, pH e teor, conforme as ilustrações gráficas a seguir.

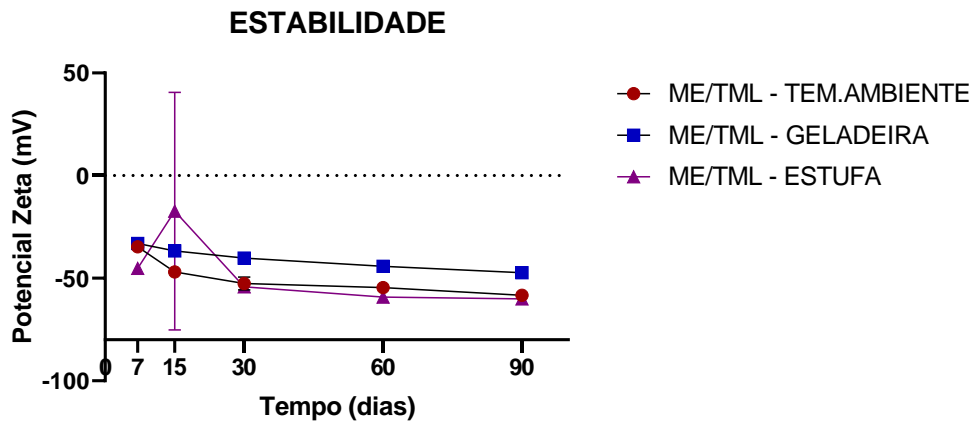


Gráfico 2. Ilustração gráfica do potencial Zeta da microemulsão durante o estudo de estabilidade acelerada na temperatura ambiente, geladeira e estufa
Fonte: Autora, 2023.

De acordo com o gráfico em questão observa-se a ME/TML apresentou potencial Zeta com carga negativa de $-45,2 \pm 1,762$.

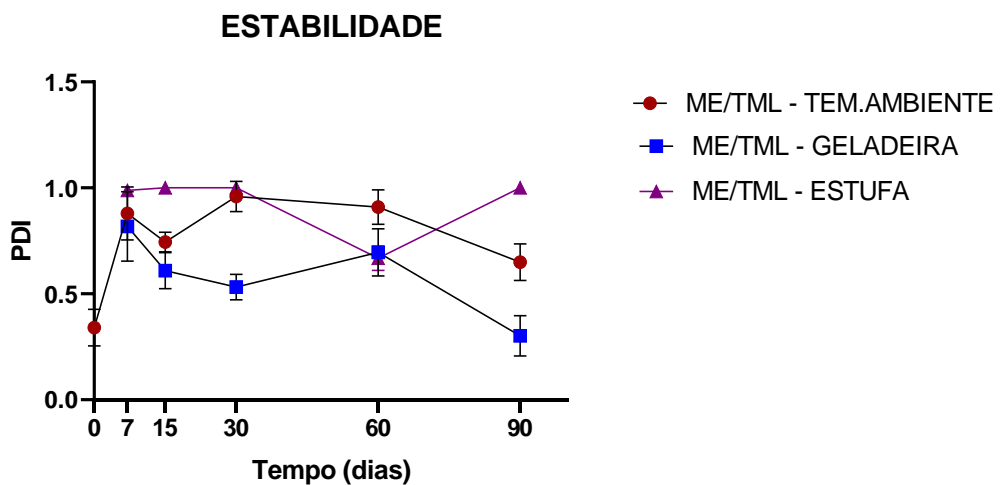


Gráfico 3. Ilustração gráfica do PDI da microemulsão durante o estudo de estabilidade acelerada na temperatura ambiente, geladeira e estufa.
Fonte: Autora, 2023.

Em análise ao gráfico a ME/TML apresentou PDI de $0,818 \pm 0,164$.

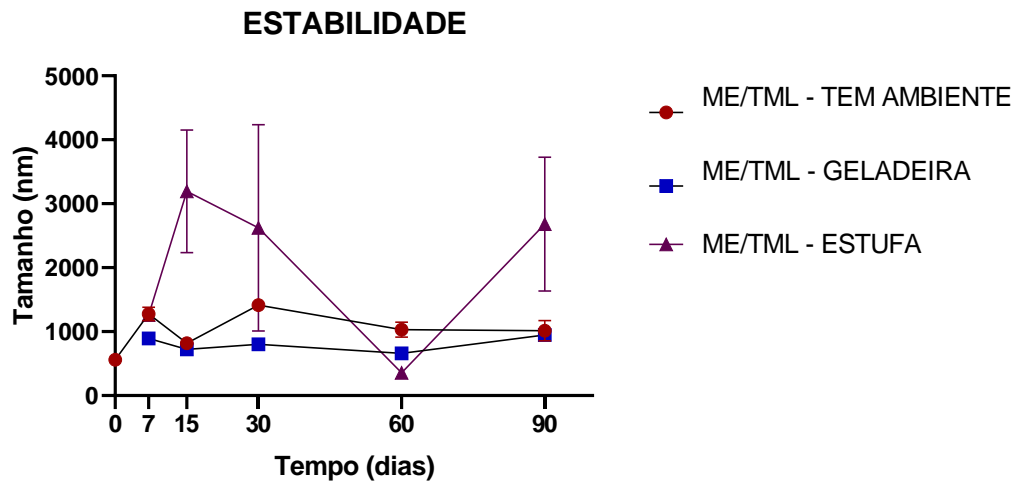


Gráfico 4. Ilustração gráfica do tamanho (nm) da microemulsão durante o estudo de estabilidade acelerada na temperatura ambiente, geladeira e estufa.
Fonte: Autora, 2023.

O Gráfico acima apresenta valores de tamanho de nanômetros, observa-se a ME/TML apresentou tamanho médio $561,93 \pm 6,2804$ nm

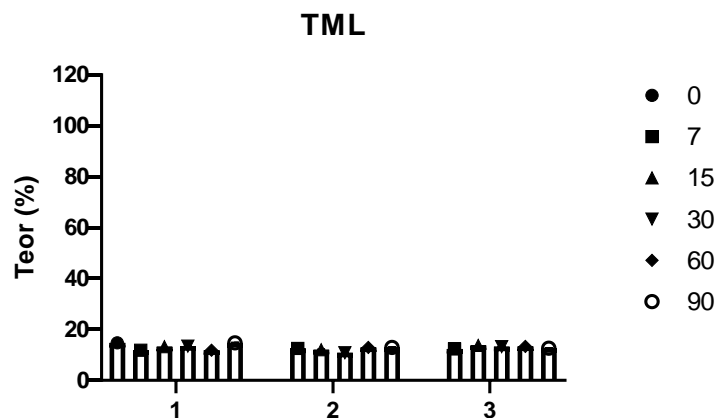


Gráfico 5. Resultados do teor de timol na microemulsão durante o estudo de estabilidade acelerada nos períodos de 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias.
Fonte: Autora, 2023.

Já o Gráfico 5 mostra o resultado do teor da microemulsão e demonstra que a concentração de timol permaneceu constante independente das condições na qual foram realizados os testes, seja ela geladeira, temperatura ambiente ou estufa.

4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA MICROEMULSÃO EM 90 DIAS

A Figura 14 demonstra o aspecto da microemulsão após os 90 dias de exposição em diferentes condições climáticas. O resultado demonstra que o armazenamento a $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ proporcionou uma melhor conservação das características físicas.



Figura 14. Microemulsão após os 90 dias de armazenamento.
Fonte: Autora, 2023.

A exposição à 40°C por 90 dias, provocou alterações da forma física (ME/TML líquida). Entretanto, o envase utilizado pode ter contribuído para a formação das alterações observadas, visto que não proporcionou fechamento hermético. As demais alterações foram aceitáveis para a aplicação final da ME/TML.

4.6 ESCOLHA DA BASE SAPONEICA

Através do processo de saponificação foram realizadas várias proporções a fim de se obter um sabão próximo a neutralidade no pH. Após várias tentativas para formulação de um sabão ideal, foram testadas várias proporções com insumos diferentes até que conseguisse chegar a uma base saponificada correspondente à preconização da RDC nº 184/2001 da ANVISA acerca dos domissanitários.

A base saponificada foi produzida através da reação de saponificação, onde se utilizam uma base forte e uma base fraca. Segundo o entendimento de Fernandes (2009), os sabões compreendem em sais de ácidos carboxílicos formados por cadeia

longa apolar com extremidade polar. Por meio de uma interação de meios polares e apolares, as micelas promovem a higienização. O processo de saponificação é formado por reações de neutralização entre óleos (RIBEIRO e SERAVALLI, 2001).

De acordo com Barata (2003), as bases utilizadas na reação de saponificação determinam se o sabão terá uma consistência mole ou dura.

Na formulação com a adição de 200 ml de óleo de girassol, 40 ml de soda cáustica, 7 ml de ácido sulfônico e 40 ml de água, o pH atingido foi de 12-14. Na formulação já na adição de 200 ml de óleo de girassol, 40 ml de soda cáustica, 13 ml de ácido sulfônico e 40 ml de água, o pH atingido também foi de 12-14. Os mesmos resultados foram constatados quando a quantidade de ácido sulfônico aumentou para 20 ml. Porém, na quantidade de 100 ml e de 110 ml de ácido sulfônico, o pH atingido foi de 7.

Na formulação com 200 ml de óleo de girassol, 50 ml de soda cáustica e 50 ml de água, o pH atingido foi de 14. Caso seja adicionado 100 ml de ácido sulfônico à mistura, o pH será de 12. Na diminuição da soda cáustica de 50 ml para 30 ml ou 28 ml e da água de 50 ml para também 30 ml ou 28 ml, sem a presença do ácido, o pH será de 9. Na formulação S4 adição de 200ml, com 28 ml de soda cáustica, 10 ml de álcool e 28 ml de água, não foi possível se constatar o pH da solução, já na redução da quantidade do álcool de 10 ml para 5 ml, o pH atingido é de 8, sendo está a formulação ideal.

O pH alcalino indica maior ação de limpeza porque as micelas apresentam maior afinidade como OH. Para fins dermatológicos o pH ideal deverá ser cerca de 5,5, próximo do pH da pele (ALBINO, 2016). Segundo a ANVISA, o pH de sabões para limpeza deve estar na faixa de 8,5 - 10,5. Assim, todos os sabões se apresentam de acordo com a legislação.

Tabela 7. Resultado dos testes de formulação do sabão em diferentes proporções.

ÓLEO DE GIRASSOL	SODA CÁUSTICA	ÁCIDO SULFÔNICO	ÁLCOOL	ÁGUA
200 ml	50 ml	100 ml	-	50 ml
200 ml	28 ml	-	10 ml	28 ml
200 ml	28 ml	-	5 ml	28 ml

Fonte: Autora, 2023.

Após selecionada a formulação que preconizava uma base saponifica consistente e com o Ph adequado foram realizados o teste de espuma e umidade, e

os resultados obtidos foram médias de 7,51 para umidade e 5,77 para índice de espuma. A base saponifica dispensa uso do ácido sulfônico para ajuste do pH e uso do álcool permite melhor forma física para a obtenção do dispositivo

4.7 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DA ME/TML E DO DISPOSITIVO SANITIZANTE POR CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas de DSC mostraram a possibilidade de identificação de prováveis incompatibilidades químicas entre o timol nas misturas binárias, podendo considerar seu pico de fusão.

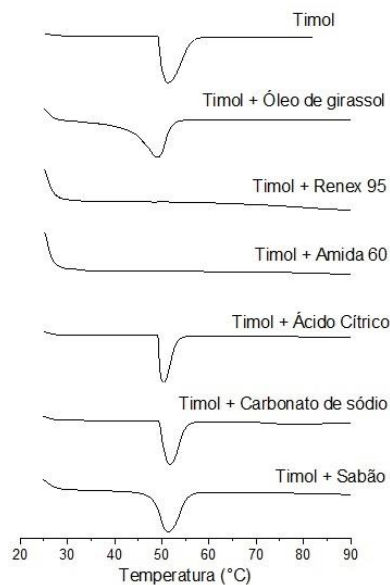


Gráfico 6. Curva de DSC das misturas binárias.
Fonte: Autora, 2023.

Em análise do Gráfico 6, é possível evidenciar que as misturas binárias permaneceram com o pico de fusão estável durante toda investigação de possíveis interações físicas, não causando interações entre os insumos, demonstrando resultado satisfatório nos componentes do dispositivo, sem deslocamento do pico de timol. Portanto, notou-se que as misturas do timol com os tensoativos não apresentaram

fusão no ativo na temperatura, o que pode ser considerado uma proteção a estes tensoativos com a fusão do timol na temperatura de 51,3 °C.

4.8 FORMULAÇÃO DO DISPOSITIVO EFERVESCENTE

Os dispositivos efervescentes compreendem em medicamentos não revestidos e geralmente compostas de carbonos, bicarbonatos e ácidos. No mercado podem ser encontradas em forma de tabletes ou pó e sua reação em contato com água é imediata. Quando são à base de peróxidos alcalinos, ao serem dissolvidas em água transformam-se em soluções alcalinas de peróxido de hidrogênio. Com a liberação de gás carbônico, são formadas bolhas que classifica sua efervescência (VASCONCELOS, 2017).

Com o objetivo de melhorar a potencialização o mecanismo de efervescência por desintegração do dispositivo, o presente trabalho utilizou sais básicos sendo 3 g de carbonato de sódio e ácidos fracos 3g de ácido cítrico destes, foram desenvolvidas sete formulações que posteriormente foram classificadas conforme as caracterizações em torno do aspecto quebradiço do dispositivo, excesso de oleosidade, desintegração e evolução das bolhas durante a efervescência.

Vários testes foram realizados para que pudéssemos chegar na melhor potencialização da efervescência.

Conforme a Tabela 8, os insumos utilizados foram o Carbonato de sódio, Ácido cítrico, sabão granulado e microemulsão, com a quantidade de 3 g, 3 g, 1 g e 2 g, respectivamente.

Tabela 8. Insumos da melhor composição produção do dispositivo efervescente

INSUMOS	QUANTIDADE
Carbonato de sódio	3 g
Ácido cítrico	3 g
Sabão granulado	1 g
Microemulsão	2 g

Fonte: Autora, 2023.

A formulação ideal para a preparação do dispositivo efervescente foi com adição de 3 g de carbonato de sódio, 3 g de ácido cítrico, com incorporação de 2 g da base soponeica e 2 g de microemulsão contendo timol. Com essa formulação chegou-se ao esperado - um mecanismo de efervescência para desintegração do dispositivo e com potencialidade perante a formulação desejada.

A Figura 15 representa o ensaio de desintegração do dispositivo efervescente, enquanto que a Figura 16 representa o processo de modelagem adotado.



Figura 15. Dispositivo efervescente disposta em meio líquido.
Fonte: Autora, 2023.

Na busca pela melhor forma de execução, foram produzidas 36 unidades, sendo cada uma com 18,12 g e que por fim possibilitasse a introdução de 4,12g de microemulsão. Devido a lacuna em torno de estudos que venham a abordar a produção de dispositivos efervescentes como as do presente trabalho, os testes seguiram as orientações da RDC nº 59/2010, na qual aborda acerca de procedimentos e requisitos para notificação e registro de produtos saneantes. Além do mais, foi também seguido a RDC nº 47/2013 relacionada a fabricação destes produtos, bem como as análises apresentadas pela Farmacopeia Brasileira 6ª Edição para os comprimidos.



Figura 16. Produção do lote do dispositivo.
Fonte: Autora, 2023.

Para caracterização do dispositivo efervescente, foram analisados peso médio, friabilidade, umidade, teor e tempo de desintegração do lote produzido. Os resultados estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9. Caracterização do dispositivo efervescente.

CARACTERIZAÇÃO DO LOTE PRODUZIDO					
PESO MÉDIO		UMIDADE (%)	FRIABILIDADE (%)	DESINTEGRAÇÃO (T)	PH
Média	CV (%)				
17,36±0,10	4,18	2,23±0,20	1,01	7 min	8,3±0,16

Fonte: Autora, 2023.

Em análise à Tabela 9, percebe-se que o peso médio do lote estudado foi de $17,36 \pm 0,10$, de tal maneira o coeficiente de variação 4,18% e o pH atingido foi de $8,3 \pm 0,16$.

Sobre a friabilidade, o lote obteve perda de 1,01% de peso (ANVISA, 2013). A desintegração completa foi atingida no período de sete minutos, restando apenas partículas de sabão no fundo do béquer. Sendo assim, a avaliação de peso médio e tempo de desintegração estão fora dos limites especificados e a friabilidade mesmo tendo ficado abaixo do limite de 1, % necessita de alterações da tecnologia de obtenção, como a alteração quantitativa e qualitativa de agente desintegrante e uso de compressora automática. A Figura 17 ilustra os equipamentos e utensílios usados na determinação do peso médio do lote de dispositivo sanitizante desenvolvido estudado.



Figura 17. Determinação de peso médio do lote do dispositivo sanitizante.
Fonte: Autora, 2023.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO

Na realização dos testes biológicos da microemulsão, foi possível constatar que o *Escherichia coli* (Figura 18A), que foi testado por 5 min, 10 min, 15 min e 20 min obteve efetividade, já o *Staphylococcus aureus* (Figura 18B), que foi testado pelo mesmo período de tempo, não obteve efetividade. Quanto ao fungo *Candida krusei* (Figura 18C), em análise ao mesmo período de tempo, também foi constatada efetividade, conforme a Tabela 10.

Tabela 10. Testes microbiológicos da microemulsão em diferentes tempos testados.

MICROORGANISMOS	TEMPOS TESTADOS	CONCLUSÃO
<i>Escherichia Coli</i> / bactéria gram negativa	5 min, 10 min, 15 min e 20 min	Ausência
<i>Staphylococcus Aureus</i> / bactéria gram positiva	5 min, 10 min, 15 min e 20 min	Presença
<i>Candida Krusei</i> / Fungo	5 min, 10 min, 15 min e 20 min	Ausência

Fonte: Autora, 2023.

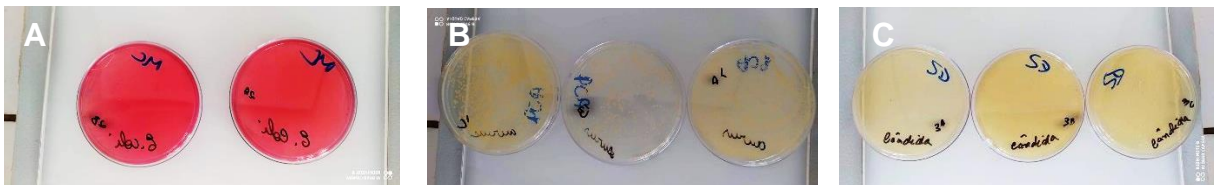


Figura 18. Placas dos testes microbiológicos para microemulsão desenvolvida. A- *Escherichia coli*; B- *Staphylococcus aureus*; C- *Candida krusei*.

Fonte: Autora, 2023.

4.9 1 Microbiologia do Dispositivo Efervescente e Microemulsão

4.9.1.1 Eficácia microbiológica e fungicida da microemulsão e do dispositivo efervescente

Nos testes microbianos da microemulsão e do dispositivo, especificamente no período de 10 minutos, os resultados permanecem os mesmos tanto para a *Escherichia coli* (Figura 19A), quanto para *Staphylococcus aureus* (Figura 19B) e

também *Candida krusei* (Figura 19C), demonstrando redução de colônias frente a *S. aureus* com efeito bacteriostático, de acordo com a Tabela 11.

Tabela 11. Testes microbiológicos do dispositivo contendo Timol.

MICROORGANISMOS	Tempos testados	Conclusão
<i>Escherichia coli</i> / bactéria gram negativa	10 min	Ausência
<i>Staphylococcus aureus</i> / bactéria gram positiva	10 min	Presença
<i>Candida krusei</i> / Fungo	10 min	Ausência

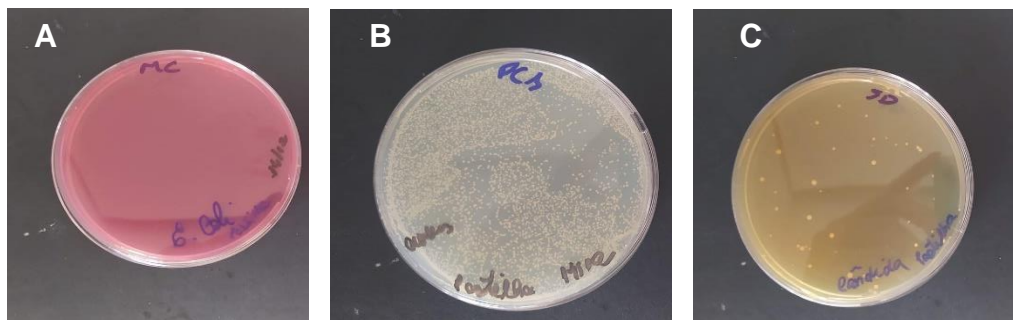


Figura 19. Os microrganismos nos testes microbiológicos após contato por 10 minutos com a microemulsão desenvolvida.

A- *Escherichia coli*; B- *Staphylococcus aureus*; C- *Candida krusei*.

Fonte: Autora, 2023.

4.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO

Mesmo o timol tendo seus efeitos comprovados e descritos na literatura científica, se observa no estudo que sua concentração tanto nos testes microbiológicos, fungicidas e bactericidas na microemulsão e no dispositivo um crescimento significativo frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. No entanto, frente à bactéria *Escherichia coli* gram-negativa e *Candida krusei* (fungo), houve inibição nas placas destas bactérias e fungos, comprovando sua ação bactericida e fungicida frente aos microrganismos testados, resultando em resultados satisfatórios ao nosso estudo: *S. aureus* = CBM de 30 mg/mL de timol ou 1,0 g/mL de composto; *Candida krusei* = CBM < 15 mg/mL de timol ou < 0,5 g/mL de composto; *E. coli* = CBM de 18 mg/mL de timol ou 0,6 g/mL de composto.

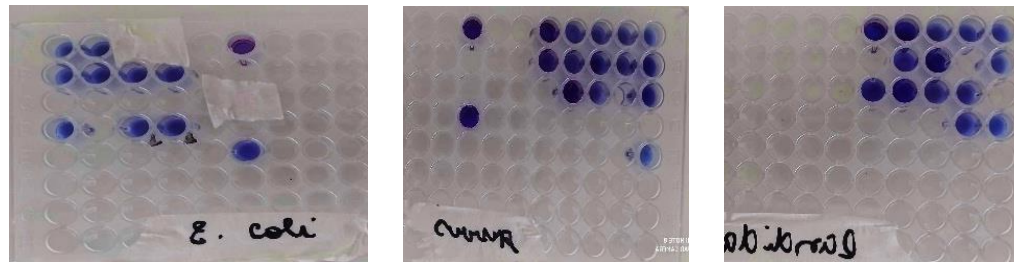


Figura 20. Testes microbiológicos para CBM.
Fonte: Autora, 2023.

Diante os primeiros testes realizados para CBM, foram utilizadas concentrações de timol na quantidade de 0,4 %. Porém, é possível observar que os poços após coloração com resazurina mantiveram-se com a cor azul após contato com os microrganismos, percebendo-se que houve concentração inibitória mínima (Figura 21).

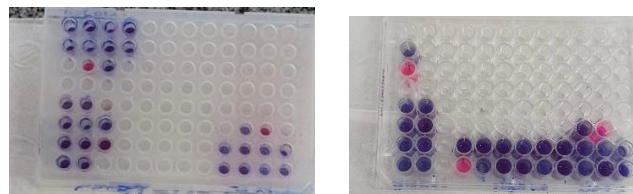


Figura 21. Testes microbiológicos para CBM.
Fonte: Autora, 2023.

Após várias tentativas em diferentes concentrações, observou-se que com concentrações 10x mais diluídas os resultados satisfatórios e efetivos frente a cada microrganismo testado, com efeito bacteriostático e bactericida os três microrganismos testados no nosso trabalho corroboram na preparação da nossa microemulsão, a qual tem a liberação acoplada ao princípio ativo.

5 CONCLUSÃO

O estudo permitiu a obtenção de base saponéica, atendendo as recomendações para produto saneante classificado com Risco I, conforme legislação sanitária vigente. A base saponéica permite o reaproveitamento do óleo alimentício, trazendo benefícios de forma sustentável ao meio ambiente, desperta interesse industrial, devido a facilidade de obtenção, e permite a incorporação de sistemas tecnológicos inovadores afim de ampliar sua aplicação na limpeza de ambientes e superfícies.

A análise térmica através de DSC, indicou interação entre componentes utilizados no estudo. Entretanto, a avaliação de estabilidade frente a diferentes condições de temperaturas por 3 meses não evidenciou alterações importantes. Apenas a forma física da ME/TML foi alterada a partir do 15º dia de exposição a 40 °C. Entretanto, o teor de TML e o tamanho característico de ME foram mantidos em todas as condições avaliadas. Estes resultados demonstram a manutenção da aplicação do produto final.

O dispositivo sanitizante elaborado por moldagem apresentou tempo de desintegração fora dos limites (7 minutos) estabelecidos em compendio oficiais (2 min) e elevado coeficiente de variação do peso. Sendo assim, melhorias da tecnologia de obtenção devem ser realizadas, como por exemplo, a inserção de maior proporção e/ou adição de outro agente desintegrante e obtenção do dispositivo por compressão automática.

A ME/TML apresentou eficácia bacteriostática, mas não bactericida. Entretanto, o dispositivo sanitizante contendo ME/TML apresentou efeito bacteriostático e bactericida, indicando sinergismo da ação antimicrobiana. Desta forma, os resultados permitem indicar o uso do produto final como Equipamento de Proteção Individual (EPI) e/ou coletiva (EPC), para o uso doméstico e profissional.

REFERÊNCIAS

Alberici RM, Pontes FFF. Reciclagem de óleo comestível usado através da fabricação de sabão. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. v. 1, n. 1, 2004.

Albuquerque MM. Desidratação do gás natural: formulação de líquido dessecante a base de tensoativo não iônico. 2020.

Almeida JC, Almeida PP, Gherardi SRM. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. *Nutr. Time*, v. 17, n. 01, p. 8623-8633, 2020.

Almeida RR. Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso. São João del-Rei: Universidade Federal de São João del-Rei, 2015.

Anvisa. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 59, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010. 2010. p. 13.

Anvisa. Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. 2003.

BIBLIOTECA VIRTUAL DA FAPESP. Incorporação da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfadilcolina de soja e estudo da atividade antitumoral através de células in vitro. Disponível em: <https://bvs.fapesp.br/pt/bolsas/83408/incorporacao-da-doxorrubicina-em-microemulsoes-estabilizadas-por-fosfadilcolina-de-soja-e-estudo-d/>. Acesso em: 30 nov. 2022.

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. RESOLUÇÃO - RDC Nº 184, DE 22 DE OUTUBRO DE 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001.

Brasil. Presidência da República. LEI No 6.360, DE 23 DE SETEMBRO DE 1976. - Brasília: Casa civil, 1976.

Brasil Escola. 2023. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/quimica/o-que-sao-amidas.htm>. Acesso em: 06 fev. 2023.

Campos DDPD et al. Avaliação por SAXS e DSC das interações entre H₂O e Renex-100. *Química Nova*, 35, 2012, 355-359.

Castro PSE. Avaliação in vitro da atividade de óleos essenciais sobre *Candida auris*. Tese de Doutorado. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. São Paulo, 2021.

Cheung GYC; Bae JS.; Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

Chipinga JV. Eficácia dos extratos brutos de *pterocarpus angolensis* contra *Candida krusei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*. *Malawi Medical Journal* , 2018, 30.4: 219-224.

Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S et al. A genética populacional de *Escherichia coli* patogênica . *Nat Rev Microbiol* 19 , 37–54, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>

Engel JB. Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2015.

Faria CDS. Estudo Bibliográfico da Termodinâmica de Microemulsões Cosméticas. Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia, Niterói, 2022.

Ferreira IDL. Atividade dos óleos essenciais carvacrol e timol no controle do biofilme dental e gengivite: uma revisão de literatura. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2022.

Fogaça JRV. Reação de saponificação. Manual da Química. 2021. Disponível em: <https://www.manualdaquimica.com/quimica-organica/reacao-saponificacao.htm>. Acessado em: 19 de janeiro de 2023.

ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). Int Conf Harmon Tech Requir Regist Pharm Hum USE. 2005.

Jr. Martinez AM *et al.* Estudo comparativo entre o sabão caseiro e o sabão industrial. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São Jose do Rio Preto. 2015.

Leite MF. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal. 2009. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.

Lin SC, Huang CF, Shen LJ, Wang HJ, Lin CY, Wu FLL. Formulation and stability of an extemporaneous 0.02% chlorhexidine digluconate ophthalmic solution. *J Formos Med Assoc.* 2015;114(12):1162–9.

Lopes FHB, Souza, ACSLM, Lopes, CB, Silva junior, GG. Produção e distribuição de sabão caseiro em comunidades carentes como ação de enfrentamento à COVID-19. *Revista Educação Pública*, v. 21, nº 11, 30 de março de 2021. Disponível em: <https://educacaopublica.cecierj.edu.br/artigos/21/11/producao-e-distribuicao-de-sabao-caseiro-em-comunidades-carentes-como-acao-de-enfrentamento-a-covid-19>

Macedo JAB de. O estado da arte: Dicloroisocianurato de sódio dispositivos x Dicloroisocianurato de sódio dispositivos efervescentes para desinfecção de água em caminhões tanques. *REVINTER* [Internet]. 12º de junho de 2017 [citado 12º de fevereiro de 2023];10(2). Disponível em: [http://autores.revistarevinter.com.br/index.php?journal=toxicologia&page=article&op=view&path\[\]=316](http://autores.revistarevinter.com.br/index.php?journal=toxicologia&page=article&op=view&path[]=316)

Malesczyk CR, Polanczky C. A reformulação da fabricação do sabão nas aulas de química orgânica. Universidade do Rio Grande – Curso de Química, Licenciatura. 2017.

Malta DC *et al.* A pandemia da COVID-19 e as mudanças no estilo de vida dos brasileiros adultos: um estudo transversal, 2020. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 29, n. 4, e2020407, set. 2020.

Matos AM *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* de uma combinação de óleos vegetais de caju e mamona e de óleos essenciais de cravo, eugenol, timol e vanilina contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas no rúmen de bovinos. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, p. e4210816900-e4210816900, 2021.

Mendonça CRB. Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos [Internet]. 2005. Available from: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/5316>

Michalska-Sionkowska *et al.* Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. *Polymer Testing*, v. 63, p. 360–366, 2017.

Mota CIP. PREPARAÇÕES SEMISSÓLIDAS CUTÂNEAS OBTIDAS A PARTIR DE MICROEMULSÕES CONTENDO HIDROQUINONA. Tese do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Tecnologia Farmacêutica. Universidade de Porto. 2018.

Neto OGZ, Del Pinto J C. *Trabalhando a química dos sabões e detergentes*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1997.

Oliveira AG de, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quím Nova* [Internet]. 2004Jan;27(Quím. Nova, 2004 27(1)). Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100023>

Oliveira AGD *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, 2004, 27: 131-138.

Oliveira AZM. Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, 100pp. 2009.

Oliveira AP. Nanoformulações à base de óleo essencial de *Lippia sidoides* e timol para o manejo de populações de *Sitophilus zeamais*. Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

Oliveira JJS, Silva MB, Souza VS. Uma proposta economicamente viável e ambientalmente amigável. Instituto Federal Baiano, Santa Inês, 2021.

Pereira MC. Tecnologia de sabonetes. Monografia (Graduação em Química) Departamento de Química, Universidade Estadual de Paraíba, Campina Grande, 2007.

Quintão W de SC. DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE NANOEMULSÕES O/A A PARTIR DE EXTRATOS DE BROSIMUM GAUDICHAUDII (MAMA-CADELA) COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE VITILIGO [Internet]. 2018. Available from: <http://www.fao.org/3/l8739EN/i8739en.pdf><http://dx.doi.org/10.1016/j.adolescence.2017.01.003><http://dx.doi.org/10.1016/j.childyouth.2011.10.007><https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23288604.2016.1224023><http://pdx.sagepub.com/lookup/doi/10>

Ramos M.J, Fernandes PA. O álcool contra a COVID-19, Rev. Ciência Elem., V8(02):018, 2020.

Reis JB et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. Brazilian Journal of Health Review, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020.

REPOSITORIO.UL.PT. Produção de sabão líquido a partir de óleo alimentar usado para utilização na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/25659/1/ulfc120699_tm_C%c3%a1tia_Albino.pdf. Acesso em: 1 out. 2022.

REPOSITORIO.UNESP.BR. Preparo e caracterização de emulsões e microcápsulas de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) utilizando isolado proteico de soja e pectina de alta metoxilação como estabilizantes. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/153622/freitas_mlf_dr_sjrp_int.pdf?sequence=4&isAllowed=y. Acesso em: 15 nov. 2022.

Rodrigues VL. Remoção do corante marrom (castanho solophenyl rln), utilizando misturas de tensoativo. 2019.

ROSARIO.UFMA.BR. Elaboração de microemulsão de grau alimentício utilizando óleo de coco babaçu SPAN80/TWEEN80 e água. Disponível em: <https://rosario.ufma.br/jspui/bitstream/123456789/4342/1/ISABELLE-PEREIRA.pdf>. Acesso em: 30 out. 2022.

Sá CSDA. Obtenção de sistemas nanométricos do tipo O/A de óleos *Cymbopogon Winterianus* Jowitt e *Azadirachta Indica* A. Juss para aplicações em materiais têxteis na área da saúde. 2020. 145f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

Sakkas H et al. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, v. 5, p. 212–218, 2016.

Santos B et al. MAPA DE RISCO DE CONTAMINAÇÃO A SARS-COV-2 E VIRUS DA GRIPE: UM MODELO A SER SEGUIDO PELAS INSTITUIÇÕES EDUCACIONAIS. *Revista Nova Paideia-Revista Interdisciplinar em Educação e Pesquisa*, 2022, 4.3: 15-24.

Santos CSFD. Medicamentos manipulados pediátricos: Desenvolvimento de formulações de ranitidina e clindamicina. 2011. PhD Thesis. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).

Schwartz DA, Graham AL. Potential maternal and infant outcomes from (Wuhan) coronavirus 2019-nCoV infecting pregnant women: lessons from SARS, MERS, and other human coronavirus infections. *Viruses*. 2020;12(2):1-16.

SCIENTIFIC ELECTRONIC LIBRARY ONLINE. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/bq5SjVnnKptZkf8NnK6kqRc/>. Acesso em: 1 fev. 2023.

Silva CS *et al.* Oficina de produção de sabão com óleo usado de cozinha: conscientização ambiental no interior de Goiás. *Revista TECNIA – Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFG*. v. 1, n. 1, 2016.

Silva GAT *et al.* Síntese, caracterização e avaliação antimicrobiana de novos derivados do timol e carvacrol. Dissertação (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, 2018.

Silva JDFD *et al.* Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Química Nova*, 38, 2015, 1196-1206.

Soares DGDM. Leite MF. PRODUÇÃO DE MICROEMULSÃO PARA INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL. Fundação Educacional do Município de Assis, 2011.

Souza MKF. *Candida krusei*: aspectos atuais sobre epidemiologia, fatores de virulência e resistência antifúngica. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2022.

Teixeira APC et al. Antifungal activity study of the monoterpene thymol against *Cryptococcus neoformans*. *Natural Product Research*, 2018.

Uchimura MS. Dossiê Técnico Sabão. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, 2021.

Vasconcelos GLL. Efeito de dispositivos higienizadoras efervescentes nos componentes da prótese parcial removível. 2017. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.

Vineyard PM, Freitas, PAM. Estudo e caracterização do processo de fabricação de sabão utilizando diferentes óleos vegetais. 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2014.

World Health Organization – WHO. Coronavirus disease 2019 (Covid-19) situation report 92. Geneva: World Health Organization; 2020. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200421-sitrep-92-covid-19.pdf?sfvrsn=38e6b06d_4. Acesso em: 01 fev. 2023.

World Health Organization – WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Geneva: World Health Organization; 2023. <https://covid19.who.int>. Acesso em: 01 fev. 2023

Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-33.