

MIGUEL MOREIRA CARDOSO RAPOSO

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÓNICOS EM IMPLANTES
LIPÍDICOS CONTENDO CLORIDRATO DE PROPRANOLOL**

Orientadora: Professora Doutora Tânia Santos de Almeida

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2020

MIGUEL MOREIRA CARDOSO RAPOSO

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÓNICOS EM IMPLANTES
LIPÍDICOS CONTENDO CLORIDRATO DE PROPRANOLOL**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia no dia 7 de abril de 2021, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 72/2021 de 18 de março de 2021, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof^a Doutora Marisa Nicolai

Orientadora: Prof^a Doutora Tânia Almeida

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2020

Resumo

No que diz respeito ao desenvolvimento de substâncias ativas, com melhores perfis de segurança e eficácia e à sua incorporação em sistemas de veiculação, a Indústria Farmacêutica despende grandemente dos seus recursos financeiros para alcançar estes objetivos. A baixa solubilidade desses ativos, bem como a estabilidade das formulações desenvolvidas, são alguns dos desafios a ultrapassar no desenvolvimento desses sistemas.

Neste âmbito, os líquidos iónicos (LI), conhecidos como sais orgânicos, ao serem introduzidos em soluções lipofílicas ou hidrofílicas, podem ser uma estratégia interessante com impacto na solubilidade dos ativos pouco solúveis e na estabilidade de diferentes tipos de formulações.

Assim, neste trabalho foram incorporados, em implantes lipídicos com cloridrato de propranolol, dois LI contendo o catião de colina, [Cho][Phe] e [Cho][Glu], a concentrações que asseguram a viabilidade celular.

Os resultados evidenciam que o LI [Cho][Phe] tem potencial para ser utilizado como excipiente funcional porque com a sua utilização obtém-se um aumento significativo da libertação de fármaco, contudo, em função do tipo de promotor de libertação, é possível variar essa libertação. Mais estudos são necessários para compreender na totalidade a forma como os LI influenciam a libertação dos fármacos em sistemas lipídicos, embora os presentes resultados sejam bastante promissores.

PALAVRAS-CHAVE: Cloridrato de Propranolol; Implantes Lipídicos; Líquidos Iónicos.

Abstract

Concerning the development of active compounds, with better safety and efficacy profiles and their incorporation into delivery systems, the Pharmaceutical Industry is heavily dependent on their financial resources to reach these goals. The low solubility of these substances, as well as the stability of the developed formulations, are some of the challenges to overcome with regard to the development of these delivery systems.

In this scope, ionic liquids (ILs), which are organic salts that can be introduced into lipophilic or hydrophilic solutions, may be an interesting strategy that may have an impact on the solubility of poorly soluble drugs and on the stability of different types of formulations.

Thus, in this work, two ILs containing the choline cation, [Cho][Phe] and [Cho][Glu], at concentrations where cell viability is maintained, were incorporated in lipid implants containing propranolol hydrochloride.

The results show that [Cho][Phe] may potentially to be used as a functional excipient since it allows an increase in drug release, however, it is possible to vary this release depending on the type of release promoter. Further studies are needed to fully understand how ILs influence drug release in lipid systems, although the present results are quite promising.

KEY WORDS: Ionic Liquids; Lipidic Implants; Propranolol Hydrochloride.

Abreviaturas, siglas e símbolos

| | |
|---------------------------------------|---|
| % (m/m) | Percentagem massa por massa |
| % (m/V) | Percentagem massa por volume |
| % (V/V) | Percentagem volume por volume |
| % | Percentagem |
| $[\text{C}(\text{CN})_4]^-$ | Tetracianoborato |
| $[\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$ | Acetato |
| $[\text{Cho}]^+$ | Catião de Colina |
| $[\text{Cho}][\text{Glu}]$ | (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-glutaminato |
| $[\text{Cho}][\text{OH}]/\text{MeOH}$ | Hidróxido de colina em metanol |
| $[\text{Cho}][\text{Phe}]$ | (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-fenilalaninato |
| $[\text{BF}_4]^-$ | Tetrafluoroborato |
| $[\text{Glu}]^-$ | Glutaminato |
| $[\text{PF}_6]^-$ | Hexafluorofosfato |
| $[\text{Phe}]^-$ | Fenilalaninato |
| $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ | bis(trifluorometilsulfonil)imida |
| ± | Mais ou menos |
| µg | Micrograma |
| µm | Micrómetro |
| η | Viscosidade |
| °C | Graus Celcius |
| ∅ | Diâmetro |
| AA | Aminoácido |
| ACS | <i>American Chemical Society</i> |
| ANOVA | Análise de variância |
| API | Ingrediente farmacologicamente ativo |
| API-IL | Líquido iónico-ingrediente farmacologicamente ativo |
| atm | Atmosfera |
| Br^- | Brometo |
| C | Número de carbonos num composto orgânico |

| | |
|-----------------|---|
| C_i | Concentração inicial |
| Cl^- | Cloreto |
| cm | Centímetro |
| cP | Centipoise |
| Da | Dalton |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DP | Desvio Padrão |
| Dynasan® 118 | Triestearato de Glicerina |
| EHL | Equilíbrio hidrofílico-lipofílico |
| etc. | <i>Et cetera</i> |
| EUA | Estados Unidos da América |
| <i>g</i> | Força <i>g</i> |
| Gelucire® 50/02 | Mistura de monoésteres, di-ésteres e tri-ésteres de glicerol e mono- e di-ésteres |
| h | Hora |
| HF | Ácido fluorídrico |
| I^- | Iodeto |
| LI | Líquido iónico |
| min. | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mmol | Milimol |
| nm | Nanómetros |
| NO_3^- | Nitrato |
| PEG | Poli(etilenoglicol) |
| PLGA | Poli(ácido láctico-co-glicólico) |
| qbp. | Quanto baste para |
| Vis | Radiação visível |
| UV | Radiação ultravioleta |

Índice Geral

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Estratégias Para Aumentar a Solubilidade..... | 2 |
| 1.2. Líquidos Iónicos | 3 |
| 1.2.1. Toxicidade e Biodegradação..... | 5 |
| 1.2.2. Aumento da Solubilidade de Fármacos | 8 |
| 1.2.3. Aumento da Permeação de Fármacos | 10 |
| 1.3. Sistemas de Libertação Controlada | 13 |
| 1.3.1. Sistemas Terapêuticos Implantáveis | 13 |
| 1.3.2. Vantagens..... | 14 |
| 1.3.3. Desvantagens..... | 16 |
| 1.3.4. Implantes Poliméricos vs. Lipídicos | 17 |
| 1.4. Cloridrato de Propranolol | 22 |
| 2. Materiais e Métodos | 24 |
| 2.1. Materiais..... | 24 |
| 2.2. Reagentes..... | 25 |
| 2.3. Métodos | 25 |
| 2.3.1. Síntese de Líquidos Iónicos | 25 |
| 2.3.2. Implantes Lipídicos | 26 |
| 2.3.2.1. Método de Preparação | 26 |
| 2.3.2.2. Ensaio de Libertação <i>in vitro</i> | 28 |
| 2.3.2.3. Uniformidade de Teor | 28 |
| 2.3.2.4. Análise Estatística | 29 |
| 3. Resultados e Discussão | 30 |
| 3.1. Síntese de Líquidos Iónicos | 30 |
| 3.2. Desenvolvimento de Implantes Lipídicos | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1. Determinação da Uniformidade de Teor dos Implantes | 32 |
| 3.2.2. Ensaio <i>in vitro</i> da Libertação do fármaco | 33 |
| 4. Conclusão | 40 |
| 5. Referências | 42 |

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição em % (m/m) dos implantes lipídicos, compostos por diferentes adjuvantes de libertação (Gelucire® ou Sacarose) e na presença ou ausência de cloridrato de propranolol e/ou de cada LI estudado, [Cho][Phe] ou [Cho][Glu].27

Tabela 2 – Rendimentos obtidos na síntese dos LI [Cho][Phe] e [Cho][Glu].31

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura. 1 - Análise do conteúdo de cloridrato de propranolol nos implantes preparados com A: Dynasan® 118; B: Dynasan® 118:[Cho][Phe]; C: Dynasan® 118:Gelucire® 50/02; D: Dynasan® 118: Gelucire® 50/02:[Cho][Phe]; E: Dynasan® 118: Sacarose; F: Dynasan® 118: Sacarose:[Cho][Phe]; G: Dynasan® 118:[Cho][Glu]; H: Dynasan® 118: Sacarose:[Cho][Glu] e I: Dynasan® 118: Gelucire® 50/02:[Cho][Glu]. | 32 |
| Figura. 2 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as diferentes composições de implantes desenvolvidos, n=5, média e \pm DP. | 33 |
| Figura. 3 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as formulações com Sacarose e Gelucire® 50/02 sem LI, n=5, média \pm DP e * p <0,05. | 34 |
| Figura. 4 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as formulações com Gelucire® 50/02 e LI, n=5, média \pm DP, * p <0,05 e ***p <0,001. . | 36 |
| Figura. 5 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as formulações com Sacarose e LI, n=5, média \pm DP. | 37 |
| Figura. 6 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as formulações com LI, n=5, média \pm DP e ** p <0,01..... | 38 |

1. Introdução

A Indústria Farmacêutica tem enfrentado diversos desafios como questões ambientais, grandes perdas de receita devido a patentes expiradas, sistemas de saúde cada vez com mais limitações de custos e requisitos regulatórios mais exigentes (Marrucho, Branco, & Rebelo, 2014). Adicionalmente, os indicadores de desempenho revelam que o custo da pesquisa e desenvolvimento farmacêutico está a aumentar, sendo cada vez menor o número de novos fármacos estudados (Adawiyah, Moniruzzaman, Hawatulaila, & Goto, 2016; Marrucho et al., 2014).

Embora muitos destes desafios sejam intrínsecos do setor, estando relacionados com os atuais modelos de negócio, paralelamente cresce a necessidade urgente de obter novos medicamentos que proporcionem terapias inovadoras e eficazes. No entanto, tem sido descrito que de todos os medicamentos avaliados em ensaios clínicos, apenas 10 % consegue chegar ao mercado o que diminui a acessibilidade a medicamentos e terapias eficazes para as pessoas que deles necessitam (Ferraz, Branco, Prudêncio, Noronha, & Petrovski, 2011).

Com 75 % dos potenciais novos fármacos a pertencer às classes II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, as estratégias de pesquisa e desenvolvimento seguidas até agora têm cada vez mais dificuldade em desenvolver fármacos que sejam terapêuticamente eficazes e fáceis de incorporar nos sistemas de veiculação tradicionais (Caparica et al., 2018; Ferraz et al., 2011).

Adicionalmente, a baixa solubilidade destas substâncias origina menores taxas de dissolução e absorção, o que se traduz numa menor biodisponibilidade, sendo por isso necessário administrar doses mais altas de fármaco para alcançar o efeito terapêutico pretendido (Egorova, Gordeev, & Ananikov, 2017). Desta forma, é fundamental encontrar formas de ultrapassar esta problemática.

1.1. Estratégias Para Aumentar a Solubilidade

A maioria das substâncias farmacologicamente ativas é sintetizada na forma cristalina principalmente por questões de pureza e estabilidade térmica, produção e facilidade de análise (Egorova et al., 2017; Ferraz et al., 2011; Savjani, Gajjar, & Savjani, 2012; Shamshina, Barber, & Rogers, 2013; Stoimenovski, MacFarlane, Bica, & Rogers, 2010).

Contudo algumas formas cristalinas têm uma baixa solubilidade, biodisponibilidade e estão sujeitas ao aparecimento de polimorfismos, que ocorrem quando uma forma cristalina se transforma noutra durante os processos de produção e/ou armazenamento, provocando a alteração de propriedades como características das partículas, estabilidade, solubilidade, ponto de fusão, e biodisponibilidade (Adawiyah et al., 2016; Aitipamula et al., 2012; Savjani et al., 2012; Shamshina et al., 2013; Stoimenovski et al., 2010).

A formação de polimorfismos para além de ser imprevisível e difícil de controlar, afeta também propriedades químicas, como a solubilidade e propriedades biológicas como a biodisponibilidade e farmacocinética do fármaco, podendo interferir com os processos de produção devido à alteração das propriedades da forma sólida do fármaco, nomeadamente mecânicas e físicas. Adicionalmente a formação de polimorfismos pode converter uma dose eficaz de um fármaco numa dose letal ou subterapêutica (Egorova et al., 2017; Ferraz et al., 2011; Hough & Rogers, 2007).

Face às várias problemáticas inerentes às substâncias farmacologicamente ativas, a Indústria Farmacêutica está a adotar uma série de novas estratégias que permitam controlar as propriedades físico-químicas dos novos fármacos logo na fase de investigação e desenvolvimento, bem como inovar quer as formulações quer os métodos de administração (Adawiyah et al., 2016; Rautio, Meanwell, Di, & Hageman, 2018).

Assim, de forma a facilitar a formulação e melhorar as propriedades de um determinado fármaco, podem ser feitas modificações químicas que originem pró-fármacos ou sais. No entanto, caso estas opções não sejam possíveis recorre-se a

técnicas como engenharia de cristais, dispersões sólidas, sistemas micelares, utilização de solventes/co-solventes, formação de hidratos e solvatos e/ou redução do tamanho de partícula (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017; Marrucho et al., 2014).

Neste âmbito, e na sequência das suas propriedades valiosas, os líquidos iónicos têm sido uma das estratégias consideradas para elevar a solubilidade de compostos pouco solúveis (Adawiyah et al., 2016; Caparica et al., 2018; Huang et al., 2019; Santos de Almeida, Júlio, Mota, Rijo, & Reis, 2017). De facto, a extraordinária flexibilidade e as amplas áreas de aplicação dos líquidos iónicos (LI) fizeram com que na última década, se verificasse um interesse crescente por estes sais em diferentes domínios da indústria farmacêutica. Nomeadamente, na formulação de fármacos em LI (API-IL), como solubilizadores ativos ou co-solventes em soluções aquosas, hidroalcoólicas ou oleosas e modeladores da permeação em sistemas para a administração de fármacos (Adawiyah et al., 2016; Caparica et al., 2018; Egorova et al., 2017; Gomes, Silva, & Reis, 2019; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Sendo a utilização de LI para dissolver fármacos com solubilidade muito baixa em água e para a formação de API-ILs, duas das aplicações mais promissoras destes compostos (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017; Santos de Almeida, Júlio, Mota, et al., 2017).

1.2. Líquidos Iónicos

A definição de LI é por si só uma temática alvo de discussão no seio da comunidade científica. Inicialmente definidos como sendo compostos iónicos líquidos à temperatura ambiente, esta definição levantava dúvidas quanto aos tipos de materiais que poderiam ser ou não considerados como LI (Bavishi & Borkhataria, 2016; Freemantle, 1998; Wang, Qin, Mu, Xue, & Gao, 2017; Welton, 2018).

Atualmente os LI são definidos na literatura como sais orgânicos que se encontram no estado líquido abaixo de 100 °C (Caparica et al., 2018; Huang et al., 2019; Lei, Chen, Koo, & MacFarlane, 2017; Santos de Almeida, Júlio, Mota, et al., 2017; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017; Welton, 2018). No entanto, esta definição está longe de ser consensual e considerada como a mais correta, uma vez que não existe fundamento científico para considerar que existem diferenças significativas entre um sal, por exemplo, com um ponto de fusão de 90 °C e outro com ponto de fusão de 110 °C (Welton, 2018).

Contudo é consensual definir os LI como líquidos constituídos por íões em que o catião é um composto orgânico e o anião tanto pode ser orgânico como inorgânico. Sendo compostos iônicos, têm uma baixa pressão de vapor e, por isso, não são voláteis, apresentam uma elevada estabilidade química, térmica e condutividade iônica.

Dada a variedade e complexidade dos LI ainda não foi criado um sistema universal de classificação de LI. Pelo que estes são normalmente classificados em função do grupo funcional de maior relevância e posteriormente, à medida que a sua variedade química vai crescendo, são subdivididos em vários tipos (Dong, Liu, Dong, Zhang, & Zhang, 2017; Lei et al., 2017).

Os LI que são líquidos à temperatura ambiente (25 °C, 1 atm) resultam de aniões fracamente coordenadores e de catiões volumosos com um elevado grau de assimetria, que dificulta o empacotamento dos íões e assim a formação do reticulado cristalino característico do processo de cristalização (Dong et al., 2017; Egorova et al., 2017; Izgorodina, Seeger, Scarborough, & Tan, 2017; Zhang, Zhang, Zhang, & Deng, 2017).

Caraterizam-se por serem líquidos na sua grande maioria com uma elevada viscosidade, com valores que variam entre 20 e 40000 cP, sendo estes muito superiores à viscosidade dos solventes orgânicos mais utilizados pela indústria química (Aparicio, Atilhan, & Karadas, 2010; Dong et al., 2017).

Devido à sua baixa pressão de vapor estes compostos não são voláteis e apresentam uma elevada estabilidade térmica e química. Adicionalmente, têm capacidade para dissolver substâncias inorgânicas e orgânicas e em função da

natureza dos iões que os constituem têm miscibilidade variável em água (Adawiyah et al., 2016; Caparica et al., 2018; Egorova et al., 2017; Gouveia et al., 2014; Santos de Almeida, Júlio, Mota, et al., 2017). No que diz respeito à sua aplicação na área da saúde, a toxicidade e biodegradabilidade destes compostos são dois fatores que não devem ser ignorados.

1.2.1. Toxicidade e Biodegradação

A ideia de que todos os LI poderiam ser considerados como substâncias não nocivas para o meio ambiente foi fundamentada, não por dados de segurança biológica, mas pelas suas propriedades físicas, nomeadamente pelo facto dos LI serem compostos não voláteis, com aplicabilidade em várias reações químicas e podendo por isso ser utilizados como substitutos dos solventes orgânicos voláteis tóxicos (Egorova et al., 2017; Heckenbach, Romero, Green, & Halden, 2016).

No entanto, esta propriedade corresponde a apenas um dos critérios impostos pelos 12 Princípios da Química Verde descritos pela *ACS Green Chemistry Institute*®, sendo que na sua generalidade os LI cumprem com o princípio da utilização de solventes mais seguros (Princípio 5), catálise altamente seletiva (Princípio 9) e implementação de uma química intrinsecamente mais segura para a prevenção de acidentes (Princípio 12) (Heckenbach et al., 2016).

Com a crescente ambição de implementar a utilização de LI em processos ecológicos de produção, começaram a surgir os primeiros estudos toxicológicos a estes compostos de forma a avaliar quais os impactos para o Meio Ambiente decorrentes da sua utilização. Neste âmbito, os catiões amónio, fosfónio, imidazol, piridínio e pirrolidínio têm sido os mais estudados (Egorova et al., 2017; Gouveia et al., 2014; Heckenbach et al., 2016).

Como resultado dos estudos toxicológicos efetuados tem-se verificado que a maioria dos LI apresenta um certo grau de toxicidade, particularmente os LI de imidazol que chegam a ser mais tóxicos do que alguns compostos orgânicos

voláteis, frequentemente utilizados pela indústria química, como o metanol e o diclorometano (Gouveia et al., 2014; Heckenbach et al., 2016; Zhao, Liao, & Zhang, 2007).

Contudo, tem-se verificado que a toxicidade dos LI, embora dependa do tipo de interações entre os iões e da natureza do anião, deve-se maioritariamente às propriedades do catião, nomeadamente do tipo (amónio, fosfónio, imidazol, etc.), da sua natureza (tamanho, hidrofobicidade, aromaticidade, etc.) e da cadeia substituinte (comprimento, presença e natureza dos grupos funcionais) (Egorova et al., 2017; Heckenbach et al., 2016).

Catiões com cadeias substituintes muito extensas ($C > 4$) apresentam um maior grau de toxicidade, contudo a biodegradabilidade está fortemente relacionada com o tamanho destas cadeias sendo que quanto maior for o seu tamanho ($C > 6$) maior é a biodegradabilidade nos ecossistemas. Adicionalmente, a introdução de grupos funcionais passíveis de sofrerem hidrólise enzimática pode aumentar significativamente a biodegradação dos LI (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017; Wang et al., 2017).

Relativamente aos aniões e tal como acontece com os catiões, o tamanho da cadeia substituinte e a natureza do anião também influenciam a biodegradabilidade dos LI, pelo que aniões com mais de três carbonos nas cadeias substituintes e com grupos sulfato ou fosfato originam LI facilmente biodegradáveis. A utilização de aniões como bis(trifluorometilsulfonil)imida ($[\text{Tf}_2\text{N}]^-$), tetracianoborato $[\text{B}(\text{CN})_4]^-$, halogenetos (cloreto, Cl^- , brometo, Br^- , iodeto, I^-) e compostos fluorados (hexafluorofosfato, $[\text{PF}_6]^-$, e tetrafluoroborato, $[\text{BF}_4]^-$) não são fontes de carbono e por isso não são biodegradáveis em condições ambientais. Adicionalmente a hidrólise dos compostos fluorados origina ácido fluorídrico (HF) que é muito tóxico e corrosivo para o meio ambiente (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017; Wang et al., 2017).

No entanto, como as propriedades dos LI podem ser facilmente alteradas através de diferentes combinações entre catião e anião, a síntese de LI não tóxicos pode ser feita utilizando catiões orgânicos biocompatíveis e aniões inorgânicos (Adawiyah et al., 2016; Heckenbach et al., 2016).

Outra forma descrita para obter LI não tóxicos é introduzir grupos funcionais polares (por exemplo, grupos hidroxilo, nitrilo ou éter) nos catiões dos LI (Adawiyah et al., 2016; Thuy Pham, Cho, & Yun, 2010; Wang et al., 2017).

Desta forma, fica claro que são vários os fatores a considerar aquando da síntese de LI no que diz respeito à obtenção compostos com menor toxicidade. Por exemplo, os LI formados por catiões e aniões de origem natural, sendo obtidos a partir de fontes renováveis como a colina e de aminoácidos (AA), são biodegradáveis e considerados menos tóxicos para o ser Humano e para o Meio Ambiente, sendo por isso considerados LI biocompatíveis e com diversas aplicações úteis na área farmacêutica, como permitirem o aumento da solubilidade e permeação de ingredientes farmacologicamente ativos (APIs) (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017; Gomes et al., 2019; Gouveia et al., 2014; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017; Wu et al., 2019).

A colina é um precursor do neurotransmissor acetilcolina, estando por isso envolvida nos processos de formação de memória e controlo muscular. O catião colina está ainda presente nas membranas celulares na forma de fosfatidilcolina e esfingomielina (Gomes et al., 2019).

Os LI à base de colina e aminoácidos, [Cho][AA], são constituídos por iões de natureza bastante diferente, um catião de amónio quaternário, o catião de colina ($[Cho]^+$) e por um anião aminoácido ($[AA]^-$) como por exemplo o fenilalaninato ($[Phe]^-$) ou o glutaminato ($[Glu]^-$), que são considerados neste estudo. No catião, a carga positiva encontra-se deslocalizada pelos três átomos de hidrogénio do grupo metilamónio, pelo átomo de azoto e pelo hidrogénio do grupo hidroxilo, podendo este grupo ser doador ou aceitador de ligações hidrogénio. No caso do anião e contrariamente ao que acontece no catião, a carga negativa encontra-se concentrada no grupo carboxilato do AA. Aniões polares como a glutamina tendem a formar ligações de hidrogénio e AA aromáticos como a fenilalanina formam interações catião- π e empacotamento π - π . Sendo que este tipo de interações é responsável pelo elevado poder de solvatação e confere uma elevada viscosidade aos LI [Cho][AA] (Caparica et al., 2018; Egorova et al., 2017; Gontrani, 2018; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017). Assim, estes LI podem ser uma classe

promissora, particularmente no que diz respeito à aplicabilidade destes sais na área da saúde.

O crescente interesse da comunidade científica pelos LI deve-se sobretudo à possibilidade de conferir a estes compostos, propriedades específicas através de diferentes combinações de catiões (imidazol $[C_3H_4N_2]^+$, amónio quaternário $[NR_4]^+$, fosfónio $[PH_4]^+$, piridínio $[C_5H_5NH]^+$, pirrolidínio $[C_4H_8NH_2]^+$, etc.) com vários aniões (hexafluorofosfato $[PF_6]^-$, tetrafluoroborato $[BF_4]^-$, bis(trifluorometilsulfonil)imida $[Tf_2N]^-$, acetato $[CH_3CO_2]^-$, nitrato $[NO_3]^-$, cloreto Cl^- , brometo Br^- e iodeto I^-) e da utilização de grupos substituintes de diferentes naturezas e comprimentos (alcenos, alcanos, aminas, amidas, éteres, álcoois, etc.) (Caparica et al., 2018; Gouveia et al., 2014; Heckenbach et al., 2016; Zhao et al., 2007).

Em consequência, está descrito que será possível formar aproximadamente 10^{18} combinações de diferentes LI, sendo por isso possível combinar, numa única molécula de LI, diversas propriedades desejáveis para variadas aplicações (Adawiyah et al., 2016; Dong et al., 2017; Ferraz et al., 2011). Concretamente no que diz respeito à indústria farmacêutica, esta variedade de propriedades dos LI podem ser extremamente úteis podendo estes sais serem utilizados como excipientes funcionais, nomeadamente para aumentar a solubilidade de determinados tipos de fármacos e até a sua permeação.

1.2.2. Aumento da Solubilidade de Fármacos

Tem-se assistido a um aumento no número de estudos que demonstram a capacidade dos LI para dissolver eficazmente fármacos com baixa solubilidade, quer em água quer na maioria dos solventes orgânicos farmacologicamente aceites. Chegando mesmo alguns LI a ter uma capacidade de solubilização superior aos solventes tradicionais como o dimetilsulfóxido (DMSO), etanol ou o metanol (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017; Huang et al., 2019).

Contudo, não basta apenas dissolver o fármaco, é igualmente necessário evitar a sua precipitação e agregação. E para este efeito os LI podem ser utilizados como solventes, co-solventes, agentes emulsionantes e como misturas de solvente/antissolvente para a formação de substâncias cristalinas (Egorova et al., 2017).

A capacidade de solvatação dos LI sabe-se que está intrinsecamente relacionada com os tipos de catião e anião que constituem o LI e que o efeito do catião sobre a capacidade de solvatação das moléculas dos fármacos é muito menor do que o efeito do anião (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017).

Adicionalmente verifica-se que os LI hidrofílicos com aniões coordenados do tipo acetato, dimetilfosfato e carboxilato têm uma capacidade de solubilização de fármacos à temperatura ambiente muito superior aos LI lipofílicos com aniões não coordenados do tipo $[BF_4]^-$, $[PF_6]^-$ e $[Tf_2N]^-$. Este comportamento evidencia que é a capacidade do anião em estabelecer ligações de hidrogénio com o fármaco que determina a solubilização do fármaco no LI (Adawiyah et al., 2016; Egorova et al., 2017; Huang et al., 2019).

Santos de Almeida *et al.*, num estudo sobre a utilização de LI à base do catião de imidazol ($[C_2mim][Br]$, $[C_4mim][Br]$ e $[C_6mim][Br]$) e de colina ($[Cho][Phe]$ e $[Cho][Glu]$), como ingredientes funcionais em sistemas de veiculação tópica, concluíram que embora os LI derivados de colina permitam aumentar a solubilidade dos ativos estudados (cafeína e ácido salicílico), estes não influenciam significativamente a permeação cutânea dos ativos. Relativamente aos LI derivados de imidazol, verificaram que estes têm menor efeito na solubilidade dos ativos estudados, mas em contraste têm maior impacto na sua permeação.

Adicionalmente, os LI derivados de colina, devido à sua baixa citotoxicidade, são apontados como potenciais ingredientes funcionais comparativamente com os LI derivados de imidazol (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Caparica *et al.* verificaram que, a concentrações em que é mantida a viabilidade celular em queratinócitos humanos (células HaCaT), dois LI derivados de colina, $[Cho][Phe]$ e $[Cho][Glu]$, quando utilizados como excipientes funcionais

umentam significativamente a solubilidade do ácido ferúlico e da rutina em meio aquoso (Caparica et al., 2018).

Embora o mecanismo através do qual os LI solubilizam substâncias lipofílicas ainda não esteja bem determinado, dados experimentais e simulações de dinâmica molecular sugerem que os LI ao entrarem em contacto com a água formam pequenos filamentos iónicos que se incorporam na matriz da água, sendo estas estruturas estabilizadas por ligações de hidrogénio entre os aniões do LI e as moléculas de água. Estes filamentos podem ser responsáveis pela formação de agregados LI-soluto aumentando desta forma a solubilidade em meio hidrofílico de substâncias de natureza lipofílica (Cláudio et al., 2015; Egorova et al., 2017).

Juntamente com a solubilidade, a permeabilidade de um determinado fármaco é outro fator decisivo para a sua biodisponibilidade. Como a maioria dos fármacos é administrada por via oral, a absorção pelo trato gastrointestinal implica o contacto do fármaco com o meio aquoso dos vários compartimentos biológicos. Deste modo a solubilização do fármaco nesses compartimentos é essencial para que ocorra a sua absorção. Uma vez dissolvido, o fármaco tem agora que permear através de membranas biológicas como o epitélio intestinal ou pulmonar no caso da via oral ou inalatória, o estrato córneo para uma absorção transdérmica e a córnea para via ocular de forma a chegar à circulação sanguínea e ser conduzido até ao seu local de ação onde desencadeia o seu efeito terapêutico (Egorova et al., 2017). Pelo que a permeação é outro fator determinante a considerar.

1.2.3. Aumento da Permeação de Fármacos

Embora a pele seja uma via promissora para a administração de fármacos com ação local (administração tópica) ou sistémica (administração transdérmica), a função de barreira hidrofóbica conferida pelo estrato córneo é um grande obstáculo à permeação de muitos fármacos (Adawiyah et al., 2016; Kováčik, Kopečná, & Vávrová, 2020).

Para aumentar a biodisponibilidade e eficácia de um fármaco administrado pela pele é necessário aumentar a sua permeação cutânea. Podendo para este efeito serem utilizados métodos físicos (microagulhas, iontoforese, ultrassons, magnetoforese, etc.) ou métodos químicos que passam pela utilização de excipientes que ou interagem com os constituintes do estrato córneo aumentando a permeabilidade desta camada cutânea ou que alterem as propriedades da formulação como o coeficiente de partição e difusão do fármaco no estrato córneo de forma a aumentar o seu fluxo através das várias camadas da pele (Akhtar, Singh, Yusuf, & Khan, 2020; Caparica et al., 2018; Dragicevic & Maibach, 2015; Kováčik et al., 2020).

Contudo nem todos estes métodos são apropriados para uma aplicação diária, sendo por isso necessário desenvolver sistemas de solventes e/ou veiculação que possibilitem aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, bem como viabilizar a sua administração tópica (Panigrahi et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Com a utilização de surfactantes é possível aumentar a solubilidade do fármaco, no entanto, o aumento da taxa de permeação transdérmica só é obtido com a utilização de elevadas concentrações destes excipientes que consequentemente podem causar efeitos adversos tóxicos (Panigrahi et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

A utilização de LI como agentes de permeação tem sido descrita como eficaz na veiculação transdérmica de moléculas com diferentes tamanhos, incluindo insulina (Kováčik et al., 2020).

Os mecanismos propostos para descrever a forma como os LI aumentam a permeação de fármacos através das membranas biológicas variam em função da natureza hidrofílica ou lipofílica dos LI (Huang et al., 2019). Os LI de natureza hidrofílica aumentam a fluidez da membrana devido à abertura das junções ocludentes do estrato córneo favorecendo assim o transporte paracelular e os LI de natureza lipofílica inserem-se nas membranas lipídicas provocando a sua disrupção devido à extração de componentes lípidos promovendo desta forma o transporte transcelular (Huang et al., 2019).

Em resumo, a baixa solubilidade em água e permeabilidade são as principais propriedades dos novos fármacos que condicionam o desenvolvimento de formulações orais. Adicionalmente a baixa biodisponibilidade oral dos medicamentos biológicos derivados de ácidos nucleicos, péptidos ou proteínas obriga a que estes sejam administrados por via parentérica uma vez que associado ao curto tempo de semivida o seu elevado peso molecular impede a absorção através do epitélio intestinal (Yun, Lee, & Park, 2015).

Contudo, em detrimento da via parentérica, a via oral por permitir uma administração mais cómoda ao doente, é uma via de administração preferencial. Esta preferência é igualmente seguida pela indústria farmacêutica uma vez que permite reduzir os custos de produção associados à formulação (Li, Nielsen, & Müllertz, 2012).

Para ultrapassar os vários obstáculos que condicionam a administração de fármacos derivados de macromoléculas ou com baixa solubilidade em água, nas últimas duas décadas têm sido desenvolvidos novos sistemas de veiculação baseados em biomateriais como lípidos, proteínas e polissacarídeos que permitem utilizar as vias pulmonar, nasal e cutânea como alternativa à via oral (Adawiyah et al., 2016; Heng, 2018; Santos de Almeida, Júlio, Mota, et al., 2017).

A via cutânea devido à sua acessibilidade e elevada área superficial não compromete a *compliance* do doente e é uma alternativa viável para a administração controlada de alguns fármacos lipofílicos (Feridooni, Hotchkiss, & Agu, 2016).

Uma outra estratégia que permite aumentar a efetividade e eficácia de um fármaco bem como reduzir a sua toxicidade, levando a uma maior *compliance* do doente, é a utilização de sistemas de libertação controlada que comparativamente com os sistemas convencionais, permitem influenciar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos de forma a manter a concentração destes dentro da janela terapêutica por um maior período de tempo, reduzindo assim o número de administrações e de possíveis efeitos secundários (Liechty, Kryscio, Slaughter, & Peppas, 2010).

1.3. Sistemas de Liberação Controlada

Neste tipo de sistemas, a liberação pode ser feita de forma constante ou modulável. Sendo que a liberação constante é utilizada quando se pretende que a concentração plasmática do fármaco seja constante por um determinado período de tempo e a liberação modulável quando se pretende que o fármaco seja libertado em função dos ciclos circadianos (Sakamoto et al., 2010).

Para que a liberação de um fármaco seja feita de forma controlada é necessário que este estabeleça uma interação de natureza química ou física com um material biocompatível e que em conjunto formem um sistema que controle a taxa de liberação do fármaco de forma pré-definida e/ou que conduza o fármaco até ao seu local de ação (J. Siepmann, Siegel, & Rathbone, 2012; J. Siepmann, Siegel, & Siepmann, 2012). Contudo, é fundamental que os materiais utilizados, bem como os seus produtos de degradação, não sejam tóxicos para os organismos em que se inserem (Tong et al., 2020).

São exemplos de sistemas de liberação controlada os sistemas de nanopartículas, suspensões injetáveis, lipossomas, microesferas e sistemas implantáveis (Abu-Diak, Andrews, & Jones, 2012; Tsung & Burgess, 2012). Estes últimos podem ser vantajosos para reduzir a sua frequência de administração e aplicar fármacos no local ação bem como aumentar a sua estabilidade *in vivo* (Stewart, Domínguez-Robles, Donnelly, & Larrañeta, 2018).

1.3.1. Sistemas Terapêuticos Implantáveis

Os implantes são sistemas de veiculação de fármacos que permitem que a liberação de um fármaco seja feita por um longo período de tempo e de forma controlada e localizada, podem apresentar diversos tamanhos, formas e mecanismos de liberação (Hillery, Lloyd, & Swarbrick, 2001; F. Kreye et al., 2011; Frauke Kreye, Siepmann, & Siepmann, 2008; Tsung & Burgess, 2012).

Estes sistemas de administração parentérica são geralmente colocados no tecido intersticial do braço, coxa ou abdómen, podendo também ser aplicados no peritoneu ou na câmara vítrea do olho (F. Kreye et al., 2011; Frauke Kreye et al., 2008).

Os sistemas implantáveis podem ser poliméricos ou lipídicos e o fármaco pode ser introduzido num reservatório (núcleo), que controla a sua libertação – aparelho reservatório –, pode também ser incorporado numa matriz, que condiciona a sua libertação – sistema monolítico – ou então pode ser colocado num sistema de bomba implantável, que liberta o fármaco mediante uma taxa de fluxo controlada por mecanismos mecânicos ou osmóticos (Hillery et al., 2001; F. Kreye et al., 2011; F. Kreye, Siepmann, Willart, Descamps, & Siepmann, 2011; Pongjanyakul, Medlicott, & Tucker, 2004; Tsung & Burgess, 2012).

No que concerne à sua aplicação, estes tipos de sistemas apresentam diversas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas aquando do seu desenvolvimento.

1.3.2. Vantagens

- **Conveniência:** Estes sistemas permitem manter as concentrações plasmáticas do fármaco por longos períodos de tempo sem que haja necessidade do paciente permanecer sob vigilância médica durante a administração do medicamento (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).
- **Compliance:** Uma vez inserido o implante, não há o risco do paciente não cumprir o esquema terapêutico, o que leva a uma melhor adesão à terapêutica (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).

- **Potencial para libertação controlada:** Ao libertarem o fármaco de forma controlada e segundo uma cinética de libertação de ordem zero, os sistemas implantáveis permitem evitar picos plasmáticos associados a toxicidade e/ou existência de doses subterapêuticas, bem como reduzir a frequência de administração (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).
- **Potencial para libertação intermitente:** com a utilização de bombas programáveis, o fármaco pode ser libertado em função de ritmos circadianos ou de dados metabólicos (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).
- **Melhorar a veiculação de fármacos:** Os sistemas implantáveis permitem a administração local ou sistémica de fármacos suscetíveis à interferência de barreiras biológicas ou de processos metabólicos que condicionam a sua chegada ao local de ação (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).
- **Flexibilidade:** a possibilidade de utilizar diferentes materiais e processos de fabrico, bem como diferentes dosagens de fármaco e taxas de libertação permite que estes sistemas sejam facilmente adaptados às necessidades terapêuticas (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).

Sendo muitas as vantagens destes sistemas, as suas possíveis desvantagens não devem ser ignoradas.

1.3.3. Desvantagens

- **Sistema invasivo:** Uma terapêutica com um sistema implantável implica a realização de uma pequena cirurgia para a sua colocação. Adicionalmente, no caso de implantes não biodegradáveis e bombas implantáveis após o término do tratamento também é necessário realizar uma cirurgia para a sua remoção. Relativamente aos implantes biodegradáveis, por vezes pode ser necessário efetuar a sua remoção visto que a sua degradação ao longo do tempo pode condicionar o término da terapêutica (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).
- **Possibilidade de reações-aversas:** Como a libertação do fármaco é feita continuamente no mesmo local, podem-se atingir níveis elevados de concentração de fármaco durante longos períodos de tempo que podem desencadear reações adversas teciduais ou irritação (Hillery et al., 2001).
- **Limitado a fármacos potentes:** Para melhorar a *compliance* dos pacientes, os implantes têm que ter um tamanho reduzido. Esta condicionante limita a capacidade de dosagem destes sistemas pelo que apenas se tornam viáveis para a administração de fármacos potentes (Hillery et al., 2001).
- **Comercial:** Uma vez que os parâmetros de segurança e biocompatibilidade têm que ser sempre avaliados de forma a garantir a aprovação de um novo implante ou material pelas autoridades regulamentares, a investigação e desenvolvimento de sistemas implantáveis requer a alocação de recursos financeiros avultados e de tempo. Caso estes parâmetros não estejam de acordo com os requisitos necessários podem surgir atrasos na comercialização do produto (Hillery et al., 2001).

- **Perfil de Libertação:** Alguns processos de preparação de implantes podem fazer com que alguns dos seus constituintes sofram polimorfismos originando libertações erráticas dos fármacos. Contudo durante o armazenamento dos implantes, os seus constituintes também podem sofrer polimorfismos que podem alterar a libertação dos fármacos (F Kreye et al., 2011).

Desta forma, são vários os fatores a considerar no desenvolvimento de novos sistemas implantáveis para que as vantagens se sobreponham às desvantagens. Adicionalmente, estes sistemas podem ser poliméricos ou lipídicos, o que irá afetar o seu desenvolvimento, aplicação e mecanismos de libertação do fármaco.

1.3.4. Implantes Poliméricos vs. Lipídicos

Implantes Poliméricos

O controlo da libertação do fármaco a partir de implantes poliméricos pode ser feito por vários mecanismos.

No caso dos sistemas do tipo reservatório a libertação do fármaco inicia-se com a penetração do solvente, usualmente água, no núcleo do implante provocando a difusão do fármaco até ao meio de libertação. Contudo nos sistemas em que a membrana é não porosa a difusão do fármaco é condicionada quer pelo tamanho das moléculas do fármaco quer pelos espaços disponíveis entre as cadeias poliméricas. Adicionalmente, o local onde se irá implantar o sistema, bem como a interface entre a membrana e o reservatório e a taxa de controlo por parte da membrana, são três fatores que também condicionam a libertação do fármaco. Nestes sistemas a taxa de libertação do fármaco é regida pela Lei de Fick (Hillery et al., 2001; Stewart et al., 2018).

Nos sistemas poliméricos biodegradáveis os polímeros podem ser degradados por dois mecanismos. Por bioerosão, quando a matriz polimérica é gradualmente dissolvida por erosão da superfície em direção ao centro da matriz, ou por biodegradação, quando processos químicos ou enzimáticos atuam sobre a estrutura do polímero provocando a erosão homogênea de toda a matriz polimérica (Hillery et al., 2001).

O poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) é o copolímero mais utilizado na produção de sistemas de libertação sustentada de fármacos (Shrestha, Bala, & Arora, 2014). No entanto os implantes desenvolvidos a partir do PLGA durante a sua biodegradação geram ambientes ácidos que podem provocar a inativação de alguns fármacos, não sendo por isso os indicados para a veiculação de fármacos de natureza proteica (Guse et al., 2006; Shrestha et al., 2014). Contudo esta condicionante pode ser solucionada com a utilização de implantes lipídicos que têm sido descritos como uma alternativa viável para a veiculação de fármacos ácido-lábeis e de fármacos com baixa solubilidade em água (Guse et al., 2006; Heng, 2018; F. Kreye et al., 2011; Frauke Kreye et al., 2011; Rawat, Singh, Saraf, & Saraf, 2008; Shrestha et al., 2014; F. Siepmann et al., 2006).

Implantes Lipídicos

Os implantes lipídicos são constituídos por uma matriz lipídica na qual o fármaco é incorporado, permitindo formar sistemas de veiculação que libertam o fármaco de uma forma controlada. Podem ser constituídos por uma grande variedade de materiais lipídicos e produzidos por diversos métodos (Frauke Kreye et al., 2008; Yadav, Khatak, & Singh Sara, 2013).

Devido ao seu maior grau de biocompatibilidade e versatilidade são especialmente úteis para a administração parentérica de fármacos utilizados em terapêuticas prolongadas de doenças crónicas ou tratamentos hormonais. (Del Frari et al., 2018; Rawat et al., 2008).

Os implantes lipídicos são sistemas biodegradáveis e versáteis com uma elevada biocompatibilidade, permitem veicular substâncias com diferentes pesos

moleculares sendo especialmente indicados para a veiculação de fármacos de natureza proteica, uma vez que ao serem produzidos sem a utilização de solventes orgânicos, não originam ambientes ácidos durante a sua degradação, permitem conservar a estrutura terciária e quaternária das proteínas. A sua utilização é também vantajosa para aumentar a biodisponibilidade de substâncias com baixa solubilidade em água e veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos (Guse et al., 2006; Heng, 2018; F Kreye et al., 2011; Frauke Kreye et al., 2008; Pawar, Ben-Ari, & Domb, 2004; Pongjanyakul et al., 2004; Rawat et al., 2008; Shrestha et al., 2014).

Assim, devido a todas as vantagens inerentes à utilização deste tipo implantes bem como ao seu potencial para a administração das novas substâncias, neste trabalho foram desenvolvidos implantes lipídicos para estudar de que forma os LI sintetizados influenciam a libertação do cloridrato de propranolol.

Os implantes de carácter lipídico podem ser produzidos por compressão direta, fusão, moldagem e extrusão (Frauke Kreye et al., 2008). No âmbito deste trabalho, os implantes foram produzidos pela técnica de fusão e moldagem. Esta pressupõe a incorporação do fármaco numa matriz lipídica previamente fundida juntamente com os modificadores da libertação, e, subsequente moldagem da mistura em moldes cilíndricos, sempre em agitação para garantir homogeneidade da mistura, arrefecendo sob condições controladas (F. Kreye et al., 2011; Frauke Kreye et al., 2008, 2011). Neste trabalho, o Dynasan® 118 é o lípido que constitui a matriz dos implantes e o Gelucire® 50/02 e a sacarose foram utilizados como possíveis modificadores da libertação.

O Dynasan® e o Gelucire® são dois dos vários tipos de triglicerídeos que têm sido cada vez mais utilizados para formar matrizes ou reservatórios de fármacos em sistemas tanto de micropartículas como de implantes. No entanto, a instabilidade dos triglicerídeos durante o armazenamento e os processos de produção dos implantes lipídicos pode originar polimorfismos com diferentes propriedades físicas que influenciam os mecanismos de libertação do fármaco (F Kreye et al., 2011).

O Dynasan® representa um grupo de três tipos de triglicerídeos de origem vegetal com estrutura microcristalina e elevadas temperaturas de fusão (IOI Oleo

GmbH, 2020). Dos vários tipos de Dynasan®, os mais descritos na literatura para a formação de sistemas lipídicos de libertação controlada são o trimiristato de glicerilo - Dynasan® 114; o tripalmitato de glicerilo - Dynasan® 116 e o triestearato de glicerilo - Dynasan®118, com temperaturas de fusão 55 – 60 °C, 63 – 68 °C e 72 °C, respectivamente (Ferraz et al., 2011; IOI Oleo GmbH, 2020; Severino, Pinho, Souto, & Santana, 2012; Wei et al., 2016; Yadav et al., 2013).

Quando utilizado como base para a formação de matrizes lipídicas, o Dynasan®, independentemente do tipo, leva a que o controlo da libertação do fármaco seja feito por difusão, contudo não é claro se é a água do meio de libertação que se difunde pela matriz e dissolve o fármaco levando à sua remoção do implante ou se é o fármaco dissolvido que se difunde pela matriz do implante até ao meio de libertação. (F. Kreye et al., 2011).

Devido à sua baixa toxicidade o Dynasan® é utilizado na indústria farmacêutica como excipiente em comprimidos, óvulos vaginais, supositórios e unguentos e na indústria cosmética, em *sticks* cosméticos, cremes e loções (IOI Oleo GmbH, 2020; Wei et al., 2016). Assim, considerando as suas características e funcionalidade, o Dynasan®, nomeadamente o Dynasan®118, foi o componente selecionado como base para a formação da matriz lipídica dos implantes desenvolvidos neste estudo.

No que diz respeito ao Gelucire®, este é o nome comercial para um produto resultante de misturas de monoésteres, di-ésteres e tri-ésteres de glicerol com ésteres de polietilenoglicol (PEG) resultantes da reação de PEG com ácidos gordos (Panigrahi et al., 2018).

A denominação Gelucire® é acompanhada por dois números (como no caso do Gelucire® 50/02 usado neste trabalho) sendo que o primeiro número corresponde ao seu ponto de fusão e o segundo ao valor de equilíbrio hidrófilico-lipofílico (EHL). Estes sistemas podem ser utilizados para formar matrizes lipídicas de forma a modificar de perfil de libertação de um fármaco ou podem ser aplicados em formulações orais para alterar as suas propriedades organolépticas, como a textura e o sabor. Podem também aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de um

fármaco bem como conferir proteção contra luz, oxigénio e humidade atmosférica. Em formulações tópicas, o Gelucire® pode ser utilizado como modificador da permeação e para aumentar a viscosidade e estabilidade de cremes, loções e géis (Panigrahi et al., 2018; F. Siepmann et al., 2006).

Diferentes tipos de Gelucire® resultam em diferentes mecanismos de libertação, pelo que em matrizes de Gelucire® com carácter hidrofóbico, ou seja EHL baixo, (por exemplo Gelucire® 43/01, 50/02, etc.) a libertação de fármacos é controlada por um processo de difusão através da matriz (Panigrahi et al., 2018). Nas matrizes de Gelucire® com carácter hidrofílico, ou seja com valores de EHL elevados, (por exemplo Gelucire® 55/18, 50/13, etc.) tem sido descrito que os fármacos são libertados em função da velocidade de erosão da matriz (Panigrahi et al., 2018; F. Siepmann et al., 2006).

A incorporação de sacarose por si só em matrizes lipídicas também apresenta potencial para promover a libertação de ativos devido ao aumento da porosidade da matriz o que origina um aumento da área da superfície do implante (Guse et al., 2006).

Guse *et al.* ao introduzirem a sacarose como agente promotor da formação de poros em implantes lipídicos de tripalmitato de glicerol verificaram que a libertação do ativo aumenta com uma concentração de sacarose mais elevada no implante, devendo-se este facto ao aumento da porosidade da matriz provocado pela dissolução da sacarose. Adicionalmente a redução do tamanho das partículas de sacarose também demonstrou promover o aumento da libertação do ativo, sendo que quanto menor forem as partículas de sacarose maior é a quantidade de ativo libertado. Este comportamento é justificado pela formação de uma rede de poros interligados como resultado da dissolução da sacarose, rede esta que promove a difusão do ativo através da matriz do implante, sendo que quanto menor forem as partículas de sacarose mais eficaz é a difusão do ativo (Guse et al., 2006).

Referidas as características que levaram à escolha dos vários compostos utilizados na produção dos implantes, importa agora fundamentar a escolha do cloridrato de propranolol como ativo para estudo da libertação.

1.4. Cloridrato de Propranolol

A escolha do cloridrato de propranolol para ser o ativo veiculado em implantes lipídicos é suportada pelos trabalhos desenvolvidos por Kreye *et al.* nos quais o cloridrato de propranolol é utilizado como ativo modelo hidrossolúvel para estudar os mecanismos de libertação de fármacos em implantes preparados pela compressão direta de misturas de diferentes materiais lipídicos (F Kreye et al., 2011).

Sabendo que durante a preparação e armazenamento de implantes lipídicos preparados pelo método de fusão e moldagem, os lípidos utilizados podem sofrer polimorfismos que afetam as propriedades do implante originando libertações erráticas dos ativos, Kreye *et al.* estudaram de que forma é que um tratamento térmico após a produção dos implantes (temperamento/têmpera) evita o aparecimento de polimorfismos e influencia a libertação do cloridrato de propranolol.

Neste estudo focaram-se em duas variáveis: a duração do processo de têmpera do implante, verificando que ocorre um aumento significativo da libertação do ativo à medida que a duração deste tempo aumenta, de 1 até 7 dias; e a temperatura da têmpera, verificando que no intervalo de 20 °C a 37 °C o temperamento conduz a uma diminuição da libertação do ativo e que o aumento sucessivo da temperatura até aos 50 °C origina um aumento da libertação do ativo (F. Kreye et al., 2011).

O cloridrato de propranolol apresenta-se como um pó branco cristalino sem odor, é solúvel em água (Log P = -0,45) e tem uma temperatura de fusão entre 162 – 165 °C (Al-Majed, Bakheit, Abdel Aziz, Alajmi, & AlRabiah, 2017; National Center for Biotechnology Information, 2020). O cloridrato de propranolol é um sal de propranolol utilizado na terapêutica da hipertensão, angina *pectoris*, enfarte do miocárdio e arritmias cardíacas. É também usado para controlar sintomas de sobreatividade simpática associados ao hipertiroidismo, bem como para controlar distúrbios de ansiedade e tremores (Al-Majed et al., 2017; Del Frari et al., 2018). Assim, este é um ativo com interesse farmacêutico, justificando a escolha da sua incorporação nos sistemas a desenvolver no presente estudo.

Adicionalmente, o âmbito deste trabalho surge como continuação de projetos anteriormente desenvolvidos pelo Centro de Investigação CBIOS, nos quais alguns LI foram estudados como excipientes funcionais em diversos sistemas de veiculação de fármacos, principalmente como agentes promotores da solubilidade, da permeação e da libertação de diferentes ativos, bem como materiais valiosos na estabilização dos sistemas de veiculação e no aumento da incorporação de ativos nesses mesmos sistemas (Antunes, 2019; Caparica et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Mota, et al., 2017; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Desta forma, os LI podem ser materiais promissores no desenvolvimento de sistemas lipídicos.

Assim, dada a versatilidade dos LI e à diversidade das suas possíveis aplicações, neste trabalho avaliou-se de que forma a utilização de dois LI (ambos contendo o catião de colina e cada um possuindo um anião diferente derivado de dois aminoácidos), iria influenciar o desenvolvimento dos implantes lipídicos e a performance desses sistemas, em particular o perfil de libertação do cloridrato de propranolol.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Na síntese dos LI foi utilizado o evaporador rotativo IKA® Werke RV 06-ML 1B com banho de água termostático IKA® HB4 basic, ambos da IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Alemanha) e a centrífuga BR4i Jouan® (Saint-herblain, França).

Relativamente à produção dos implantes lipídicos, e aos ensaios subsequentes, recorreu-se à utilização, da balança analítica BP221S AG Sartorius® (Goettingen, Alemanha), do espectrofotómetro Evolution™ 300 UV-Vis da Thermo Scientific™ (Hertfordshire, Inglaterra), da incubadora 1000® com agitador Unimax 1010® da Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Alemanha) e da placa de aquecimento multipontos com agitação IKA® RT 15 P da IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Alemanha).

Para a preparação da solução tampão fosfato pH 7,4 utilizou-se a balança analítica BP221S AG Sartorius® (Goettingen, Alemanha), o banho de ultrassons Sonorex™ Super RK 510 H da Bandelin® (Berlim, Alemanha) e a placa de aquecimento com agitação da IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Alemanha).

Foram ainda utilizadas micropipetas, com diferentes capacidades, da VWR Ergonomic High-Performance® (Radnor, PA, Estados Unidos da América (EUA)).

Todas as operações laboratoriais foram realizadas utilizando material corrente de laboratório.

2.2. Reagentes

No que diz respeito aos reagentes utilizados, para a síntese dos LI foram usados, o hidróxido de colina em 45 % de metanol ([Cho][OH]/MeOH 45 %), o acetonitrilo, o metanol e os aminoácidos L-fenilalanina e L-glutamina. Todos os reagentes anteriormente enunciados são de pureza analítica e foram obtidos na Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA).

A solução de tampão fosfato pH 7,4 foi preparada com azida de sódio a 0,01 % (m/V), cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico di-hidratado e fosfato de sódio monobásico di-hidratado, também fornecidos pela Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA).

Os implantes foram produzidos com Dynasan® 118 (Triestearato de Glicerina) adquirido à Cremer Oleo GmbH (Hamburgo, Alemanha), o Gelucire® 50/02 (mistura de mono-, di- e triésteres de glicerol e mono- e diésteres de polietilenoglicol) foi fornecido pela GatteFossé (Saint-Priest, França) e a sacarose foi fornecida pela Sigma Aldrich® (Darmstadt, Alemanha). O cloridrato de propranolol foi adquirido na Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Finalmente, o éter dietílico utilizado no ensaio de uniformidade de teor foi fornecido pela PanReac AppliChem® ITW Reagents (Barcelona, Espanha).

2.3. Métodos

2.3.1. Síntese de Líquidos Iônicos

No âmbito deste estudo foram sintetizados dois LI, o (2-hidroxietil)-trimetilamônio-L-fenilalaninato, e o (2-hidroxietil)-trimetilamônio-L-glutaminato, o primeiro denominado como [Cho][Phe] e o segundo como [Cho][Glu]. Estes LI foram

preparados de acordo com a literatura (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Para este efeito foram evaporados no evaporador rotativo a 50 °C e sob vácuo 15,6 mL de hidróxido de colina em metanol [Cho][OH]/MeOH 45 %. Posteriormente adicionou-se uma solução aquosa de aminoácido (57,79 mmol), sendo esta mistura colocada sob agitação num banho de gelo durante 17 h e depois evaporada a 60 °C no evaporador rotativo. Em seguida, para promover a precipitação do excesso de aminoácido da solução, adicionou-se, sob agitação vigorosa, uma mistura acetonitrilo:metanol na proporção 9:1 e o precipitado formado foi removido da solução inicialmente por filtração por gravidade e após centrifugação durante 20 minutos a 10 080 x *g* foi novamente filtrado. Por fim, de forma a remover o solvente, realizou-se uma evaporação a vácuo a 60 °C. Os LI preparados foram armazenados e conservados num exsiccador protegido da luz.

2.3.2. Implantes Lipídicos

2.3.2.1. Método de Preparação

Todos os implantes foram produzidos segundo a técnica de fusão e moldagem, descrita por (Frauke Kreye et al., 2008) com algumas alterações (Antunes, 2019).

A composição dos diversos implantes está representada na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Composição em % (m/m) dos implantes lipídicos, compostos por diferentes adjuvantes de libertação (Gelucire® ou Sacarose) e na presença ou ausência de cloridrato de propranolol e/ou de cada LI estudado, [Cho][Phe] ou [Cho][Glu].

| Formulação | % m/m | | | | | Fármaco |
|------------|--------------|-----------------|----------|------------|------------|---------|
| | Dynasan® 118 | Gelucire® 50/02 | Sacarose | [Cho][Phe] | [Cho][Glu] | |
| A | | - | - | - | - | |
| B | | - | - | 0,2 | - | |
| C | | 10,0 | - | - | - | |
| D | | 10,0 | - | 0,2 | - | |
| E | qbp 100 | - | 10,0 | - | - | 10,0 |
| F | | - | 10,0 | 0,2 | - | |
| G | | - | - | - | 0,2 | |
| H | | 10,0 | - | - | 0,2 | |
| I | | - | 10,0 | - | 0,2 | |
| J | | - | - | - | - | |
| K | | - | - | 0,2 | - | |
| L | | 10,0 | - | - | - | |
| M | | 10,0 | - | 0,2 | - | |
| N | qbp 100 | - | 10,0 | - | - | - |
| O | | - | 10,0 | 0,2 | - | |
| P | | - | - | - | 0,2 | |
| Q | | 10,0 | - | - | 0,2 | |
| R | | - | 10,0 | - | 0,2 | |

O fármaco estudado (cloridrato de propranolol), previamente tamisado ($\varnothing < 100 \mu\text{m}$), foi colocado em *vials* juntamente com lípido sólido e com um agitador e posteriormente a mistura foi aquecida usando um banho de água a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, até que ocorresse a fusão do lípido e se verificasse a dispersão total do fármaco neste lípido. A mistura fundida foi então pipetada com uma pipeta estéril e descartável de plástico ($\varnothing = 0,1 \text{ cm}$) e arrefecida à temperatura ambiente. Depois de retirados do interior da pipeta, os implantes foram cortados com o comprimento pretendido e conservados no exsiccador. Os implantes utilizados possuem o diâmetro pipeta usada ($0,1 \text{ cm}$) e podem ser cortados de acordo com o comprimento requerido ($0,5 \text{ cm}$).

2.3.2.2. Ensaio de Libertação *in vitro*

Todos os implantes (n=5) foram individualmente pesados e de seguida introduzidos em *eppendorfs*. A estes adicionou-se tampão fosfato a pH 7,4 com azida de sódio a 0,01 % (m/V), num volume total de 1,5 mL. Depois, as amostras foram colocadas na incubadora com agitação horizontal de 100 rpm, mantendo a temperatura constante de 37 °C durante 140 dias.

Em tempos pré-definidos, descritos de seguida, removeu-se o meio de libertação existente e adicionou-se novo meio previamente aquecido a 37 °C. Posteriormente determinou-se o teor de fármaco libertado por espectrofotometria UV-Visível a 289 nm (comprimento de onda de absorção máxima do cloridrato de propranolol, determinado experimentalmente). Assim, na primeira semana após a preparação dos implantes efetuaram-se recolhas diárias, na segunda e terceira semanas recolhas bissemanais, durante os 30 dias posteriores foram efetuadas recolhas semanais e, posteriormente, bimensais até à última recolha. As condições *sink* foram respeitadas durante os ensaios e o teor de fármaco libertado foi determinado de forma cumulativa.

2.3.2.3. Uniformidade de Teor

Para a determinação da uniformidade de teor, os implantes preparados (n=3) foram completamente dissolvidos em éter dietílico (0,5 mL) e tampão fosfato pH 7,4 com 0,01 % (m/V) azida de sódio (1 mL) e colocados a 37 °C com agitação. Decorridos 120 min, retirou-se uma alíquota de fase aquosa e quantificou-se o ativo por espectrometria UV-Visível a 289 nm (comprimento de onda de absorção máxima do cloridrato de propranolol, determinado experimentalmente).

O doseamento foi realizado em todos os lotes de implantes preparados.

2.3.2.4. Análise Estatística

A análise de variância *one-way* (ANOVA) e o teste de comparação de Tukey foram os métodos utilizados para avaliar as diferenças entre os valores médios dos resultados obtidos, tendo estes sido expressos como média \pm desvio padrão (DP).

O tratamento estatístico efetuado para os dados obtidos foi feito com o programa GraphPad Prism 8® da GraphPad Software (San Diego, CA, EUA).

3. Resultados e Discussão

Neste estudo pretendeu-se preparar diversos implantes lipídicos contendo cloridrato de propranolol e avaliar como as diferentes composições desses implantes, nomeadamente, a presença de Gelucire® 50/02 ou sacarose e/ou de dois LI diferentes, poderiam afetar a performance dos implantes desenvolvidos. Para este efeito começou-se este trabalho pela síntese dos dois LI em estudo, de acordo com a metodologia descrita na literatura (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

3.1. Síntese de Líquidos Iónicos

Uma vez que os LI derivados da colina, nomeadamente os de colina e aminoácidos, têm sido considerados como menos tóxicos e por isso mais adequados para uma aplicação farmacêutica (Caparica et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017), no âmbito deste trabalho sintetizaram-se dois destes LI. Os LI selecionados foram o [Cho][Glu] e [Cho][Phe], que foram sintetizados de acordo com o descrito na literatura (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Relativamente ao rendimento obtido na síntese do LI [Cho][Glu] (**Tabela 2**) este está concordante com o valor descrito na bibliografia (Santos de Almeida et al., 2017). Por sua vez, relativamente à síntese do LI [Cho][Phe], no âmbito deste trabalho foi possível alcançar um aumento de 18 % no rendimento da sua síntese em comparação com a bibliografia (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Tabela 2 – Rendimentos obtidos na síntese dos LI [Cho][Phe] e [Cho][Glu].

| Líquido Iónico | Rendimento obtido (%) |
|----------------|-----------------------|
| [Cho][Phe] | 88,5 |
| [Cho][Glu] | 77,7 |

Após a síntese dos dois LI em estudo, procedeu-se então à preparação dos diversos implantes lipídicos.

3.2. Desenvolvimento de Implantes Lipídicos

Diversos sistemas lipídicos, com diferentes composições (**Tabela 1**) foram preparados de modo a compreender o impacto dos diferentes componentes estudados, na formulação e na performance destes sistemas. Nomeadamente foi avaliado o impacto na uniformidade de conteúdo dos implantes desenvolvidos, bem como na libertação do cloridrato de propranolol, o ativo em estudo incorporado nos implantes.

Inicialmente começou-se por realizar o ensaio de uniformidade de teor, com o objetivo de determinar o teor individual de fármaco presente em cada implante. Este estudo pretendeu avaliar se a metodologia utilizada para a formulação dos implantes, bem como os diferentes componentes estudados nessa formulação, permitiam obter sistemas com homogeneidade de conteúdo entre todos os implantes preparados, independentemente dos componentes de cada implante.

3.2.1. Determinação da Uniformidade de Teor dos Implantes

Como evidenciado na **Figura 1**, os resultados deste ensaio mostraram uma uniformidade de teor adequada, acima de 95 % para todos os implantes não se verificando diferenças estatisticamente significativas no teor de fármaco para todos os lotes estudados, tal como pretendido.

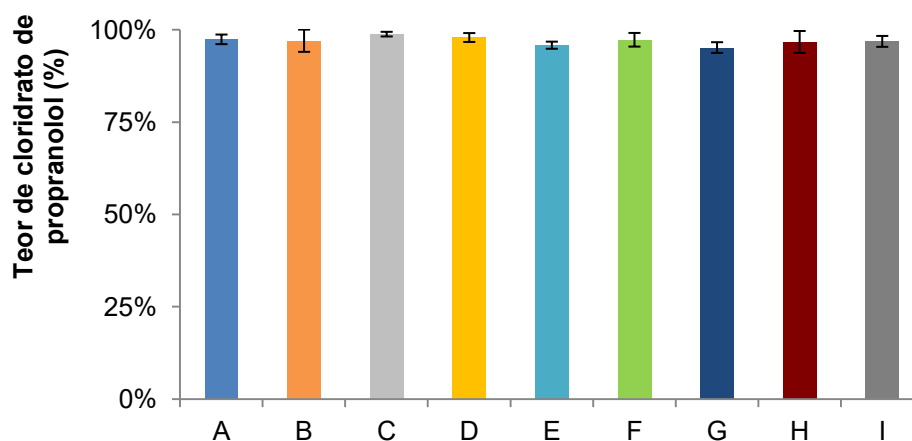


Figura. 1 – Análise do conteúdo de cloridrato de propranolol nos implantes preparados com **A**: Dynasan® 118; **B**: Dynasan® 118:[Cho][Phe]; **C**: Dynasan® 118:Gelucire® 50/02; **D**: Dynasan® 118:Gelucire® 50/02:[Cho][Phe]; **E**: Dynasan® 118:Sacarose; **F**: Dynasan® 118:Sacarose:[Cho][Phe]; **G**: Dynasan® 118:[Cho][Glu]; **H**: Dynasan® 118:Sacarose:[Cho][Glu] e **I**: Dynasan® 118: Gelucire® 50/02:[Cho][Glu].

Desta forma, os resultados sugerem que todos os implantes desenvolvidos apresentam uniformidade de teor e que a incorporação dos líquidos iónicos em estudo, nos sistemas lipídicos, não altera a uniformidade do conteúdo em fármaco. Assim, torna-se relevante passar para a avaliação do impacto dos diferentes componentes dos implantes no perfil de libertação do fármaco em estudo.

3.2.2. Ensaios *in vitro* da Libertação do fármaco

A incorporação de LI nos implantes lipídicos teve como principal objetivo avaliar de que forma estes sais poderiam influenciar a performance dos implantes, nomeadamente no que diz respeito à libertação do cloridrato de propranolol a partir de um sistema de veiculação lipídico (implante). De salientar, que estes LI foram incorporados a concentrações onde a viabilidade celular é mantida (0,2 %, V/V) em queratinócitos humanos (células HaCaT) tendo em conta resultados de citotoxicidade descritos na literatura (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Esta consideração é fundamental dado que os LI apenas podem ser considerados excipientes funcionais se a sua ação for possível a concentrações não citotóxicas (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

No que diz respeito aos resultados, e como evidenciado na **Figura 2**, destacam-se dois tipos de perfil de libertação, quatro de natureza sigmoide (**lotes B, C, D e H**), que traduzem a libertação de uma grande quantidade de fármaco logo ao início do ensaio e cinco de natureza linear (**lotes A, E, F, G e I**) que traduzem uma libertação mais controlada de fármaco ao longo do ensaio.

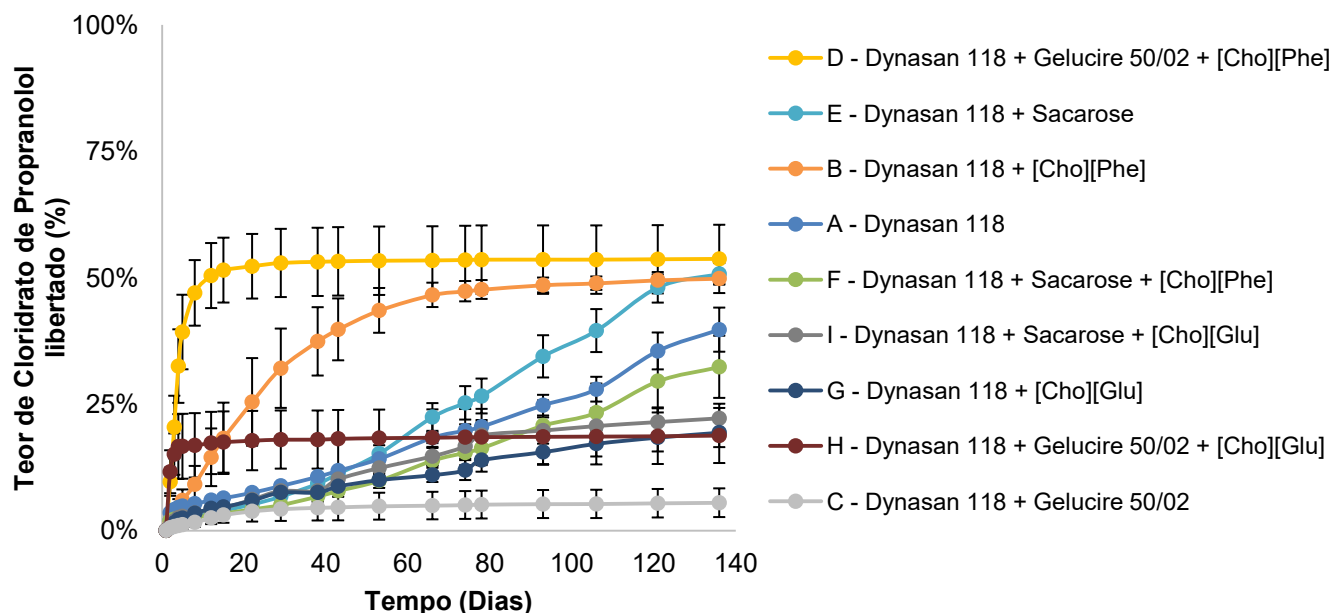


Figura. 2 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as diferentes composições de implantes desenvolvidos, n=5, média e \pm DP.

Estes perfis sugerem assim que os diferentes componentes podem alterar quer a velocidade de libertação do ativo quer o mecanismo subjacente à sua libertação, demonstrando a relevância do tipo de material a incorporar nestes sistemas.

Adicionalmente, verifica-se que a formulação correspondente ao **lote D** foi a que obteve a taxa libertação mais elevada, podendo este resultado dever-se a um aumento do carácter hidrofílico do implante em consequência da incorporação do LI e que poderá facilitar a libertação do ativo. Em contraste, a formulação correspondente ao **lote C** foi a que obteve uma taxa de libertação mais reduzida, sendo que tal poderá dever-se ao elevado carácter lipídico desta formulação que poderá condicionar a difusão do ativo (hidrofílico) para o meio de libertação.

No que diz respeito à inclusão do Gelucire® 50/02 ou da sacarose, os resultados indicam que estes materiais podem originar impactos diferentes na performance dos implantes, sendo estes evidenciados por alterações na libertação do cloridrato de propranolol. Torna-se por isso fundamental comparar os perfis de libertação destes dois tipos de implantes.

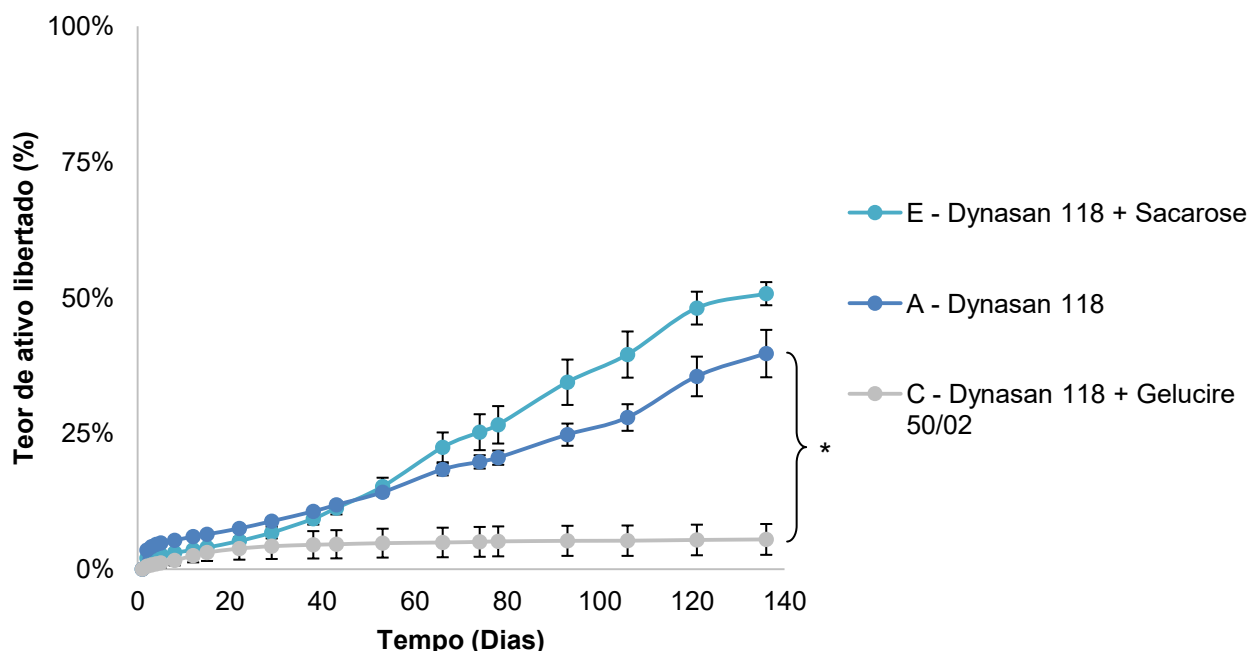


Figura. 3 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as formulações com Sacarose e Gelucire® 50/02 sem LI, n=5, média \pm DP e * p <0,05.

Relativamente às formulações em que é utilizado o Gelucire® 50/02 e a sacarose como modificadores da libertação, **lotes C e E** respetivamente (**Figura 3**), verificou-se que, comparativamente com o Gelucire® 50/02, os resultados com a sacarose apresentam um aumento estatisticamente significativo da libertação do cloridrato de propranolol.

Estes resultados são concordantes com o que se encontra exposto na literatura onde a sacarose está descrita como adequada para aumentar a porosidade de implantes lipídicos (Guse et al., 2006) e consequentemente este parâmetro poderia ser o responsável pelo aumento da libertação do ativo. No entanto, quando comparado com o lote contendo apenas Dynasan, os resultados observados não demonstram diferenças estatísticas entre os **lotes A** (apenas Dynasan® 118) e **E** (Dynasan® 118 e sacarose), não suportando por isso a hipótese de que a sacarose poderia eventualmente conduzir a uma maior libertação devido à porosidade dos implantes.

Por outro lado, relativamente ao Gelucire® 50/02, os resultados para o **lote C** (Dynasan® 118 e Gelucire® 50/02) demonstram um perfil de libertação mais baixo. Considerando que o Gelucire® 50/02 possui um valor de EHL de 2, esta é uma substância com um forte carácter lipofílico, o que poderá justificar a baixa libertação observada. Concretamente, encontra-se descrito na literatura que, em matrizes de Gelucire® com carácter lipofílico a libertação dos fármacos é feita por difusão através da matriz (F. Siepmann et al., 2006) e estes resultados poderão dever-se ao facto de um fármaco hidrofílico, como o cloridrato de propranolol, ter eventualmente maior dificuldade em se difundir através da matriz mais lipofílica do implante, o que poderia justificar uma consequente menor libertação deste ativo ao longo do tempo, tal como foi observado. De qualquer forma, mais estudos, com outros ativos hidrofílicos, seriam necessários para melhor compreender a razão desta baixa libertação na presença do Gelucire® 50/02.

De seguida, torna-se relevante comparar entre si os resultados de todos os implantes contendo Gelucire® 50/02, na ausência e presença dos LI, para compreender o impacto dos LI nos sistemas implantáveis desenvolvidos.

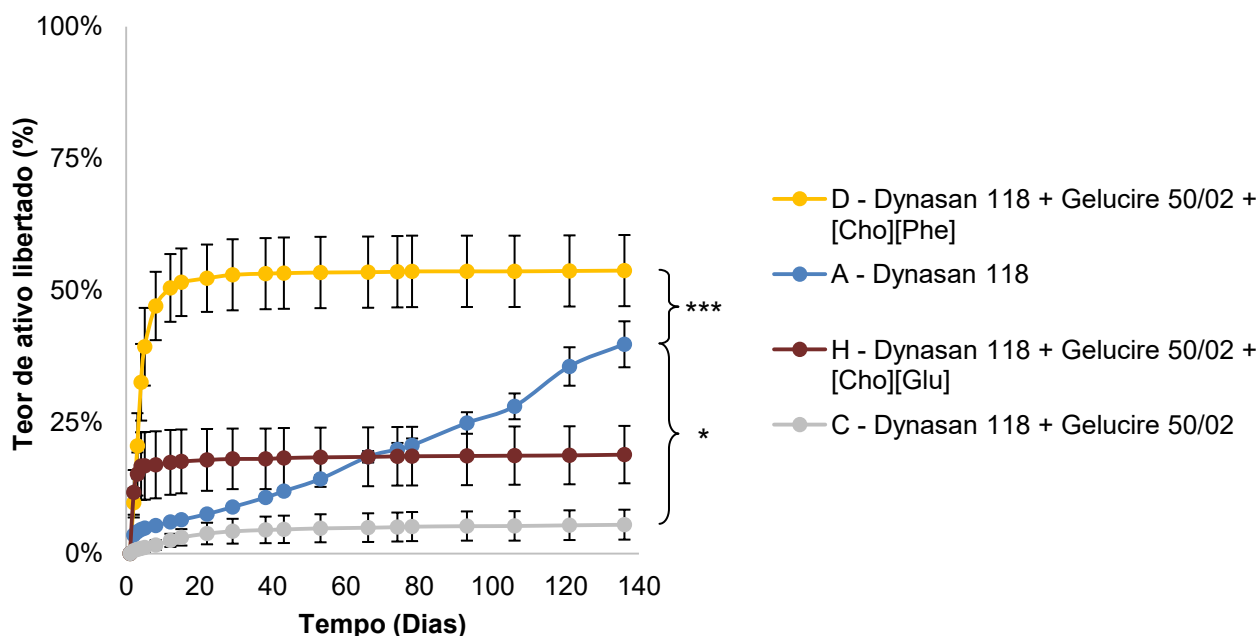


Figura. 4 - Resultados do ensaio de liberação do cloridrato de propranolol para as formulações com Gelucire® 50/02 e LI, n=5, média \pm DP, * p <0,05 e *** p <0,001.

Assim, no que diz respeito às formulações em que é utilizado o Gelucire® 50/02 como modificador da liberação (**lotes C, D e H; Figura 4**) verifica-se que apesar dos implantes contendo apenas Dynasan® 118+Gelucire® 50/02 (**lote C**) apresentarem um perfil de liberação mais baixo, o que poderá estar relacionado com as razões acima discutidas, a inclusão dos LI em implantes contendo Gelucire® promove um aumento da liberação do ativo. Estes resultados poderão indicar que os LI facilitam a difusão do cloridrato de propranolol através da matriz dos implantes contendo Gelucire® 50/02. Contudo, é de salientar que apesar de os resultados parecerem indicar que a incorporação dos LI aumenta a liberação do ativo, apenas o [Cho][Phe] promove um aumento estatisticamente significativo da liberação do ativo ao longo do tempo.

Adicionalmente, os resultados também demonstram que na presença de LI e Gelucire® 50/02, os perfis de liberação observados não são os desejáveis num sistema implantável, uma vez que descrevem a liberação de uma grande quantidade de ativo num curto intervalo de tempo, seguido de um patamar.

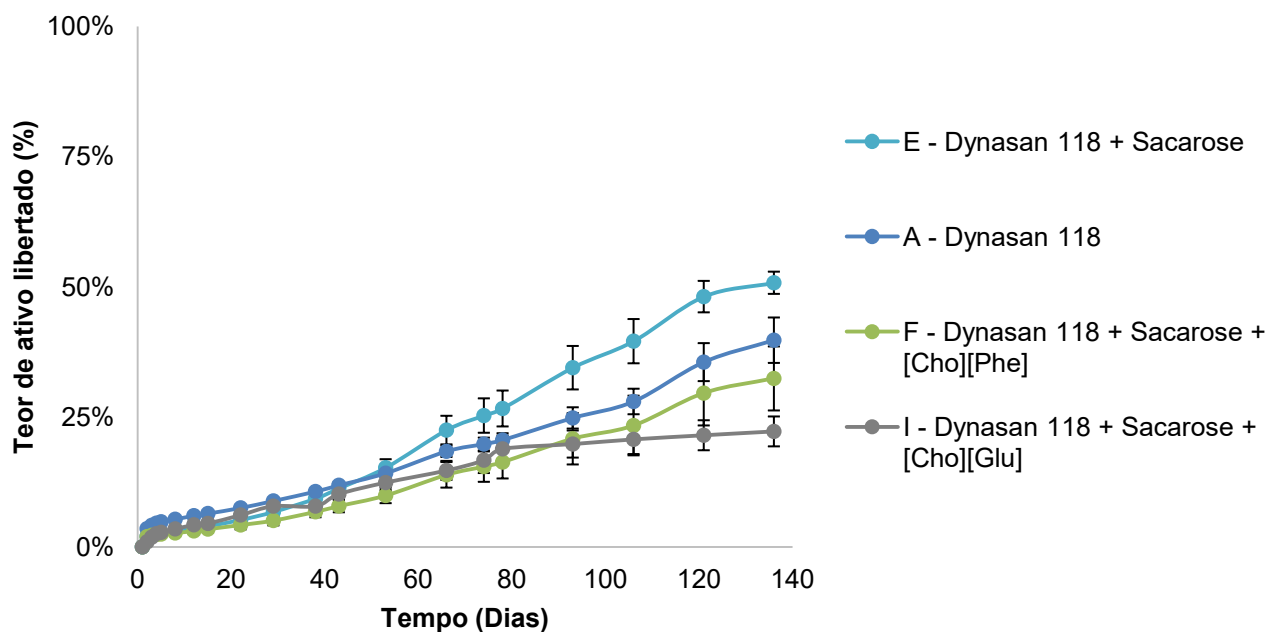


Figura. 5 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as formulações com Sacarose e LI, n=5, média \pm DP.

Contrariamente, para os implantes contendo sacarose, na presença ou ausência dos LI (**lotes E, F e I; Figura 5**), não se verificaram diferenças estatísticas entre os diversos lotes, demonstrando que nem a sacarose sozinha, nem a sacarose na presença dos LI permitem alterações significativas no perfil de libertação do ativo estudado.

Por fim, importa comparar os resultados dos implantes de Dynasan® 118 na presença e ausências de cada LI, **Figura 6**.

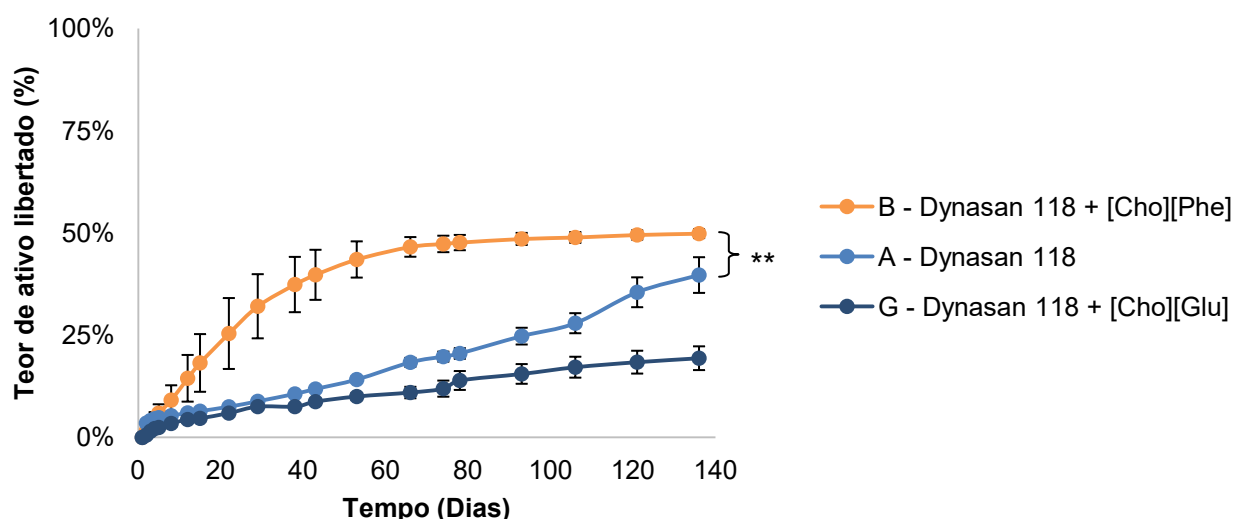


Figura. 6 - Resultados do ensaio de libertação do cloridrato de propranolol para as formulações com LI, n=5, média \pm DP e ** p < 0,01.

Neste caso, verificou-se que para os implantes de Dynasan 118 (**lote A**), a inclusão de [Cho][Phe] (**lote B**) originou um aumento estatisticamente significativo na libertação do ativo ao longo do tempo e começando logo após o início do ensaio. Contrariamente a inclusão de [Cho][Glu] (**lote G**) não originou resultados com diferenças estatisticamente significativas, quando comparado com os implantes do **lote A**.

Os resultados observados para o **lote B** parecem confirmar a tendência observada anteriormente na presença do Gelucire® 50/02 onde o [Cho][Phe] (**lote D**) permitiu igualmente originar um aumento estatisticamente significativo na libertação do ativo. Estes resultados poderão eventualmente indicar uma maior afinidade entre o cloridrato de propranolol e o LI [Cho][Phe], que poderá permitir assim uma melhor difusão do ativo através dos implantes contendo este LI.

No entanto, o que é mais relevante salientar relativamente ao **lote B**, é que contrariamente ao que foi observado para o **lote D**, na ausência de Gelucire® 50/02

(**lote B**) o perfil de libertação observado é mais adequado ao que se pretende de um sistema implantável por permitir uma libertação mais constante ao longo do tempo e não imediata, como foi observado para o **lote D**. Concretamente, neste caso observou-se uma libertação de forma constante nos primeiros 30 dias do ensaio e posteriormente observou-se uma redução dessa libertação de forma gradual até esta se tornar quase nula. De um ponto de vista farmacoterapêutico este comportamento pode ser vantajoso na administração de fármacos que necessitem de uma redução gradual da terapêutica de forma a evitar o aparecimento de reações adversas com a suspensão da administração.

Assim, os resultados parecem indicar que eventualmente será mais promissor adicionar apenas LI, aos implantes contendo Dynasan® 118, do que complementar com os outros materiais estudados, nomeadamente o Gelucire® 50/02 e a sacarose.

Seria assim importante realizar mais estudos, nomeadamente com outros LI, para compreender melhor se estes sais poderão realmente ser materiais promissores para melhorar a eficácia de sistemas implantáveis.

4. Conclusão

A utilização de sistemas implantáveis tais como os implantes lipídicos pode representar uma mais-valia, uma vez que estes para além de permitirem controlar libertação de fármaco por um longo período de tempo reduzindo a frequência de administração, permitem veicular fármacos com diferentes propriedades, bem como protegê-los da degradação *in vivo*.

Adicionalmente, a utilização de LI como modeladores da libertação dos ativos pode constituir uma vantagem adicional a estes sistemas de veiculação.

Neste seguimento, o presente estudo teve como objetivos: sintetizar dois LI contendo colina, [Cho][Glu] e o [Cho][Phe]; produzir implantes lipídicos com diferentes composições e verificar de que forma é que estas influenciam o perfil de libertação dos implantes desenvolvidos; analisar se a incorporação de 0,2 % (m/m) de cada LI sintetizado (percentagem não tóxica), teria impacto na uniformidade de teor dos implantes e se poderia influenciar o perfil de libertação do cloridrato de propranolol.

Para este efeito foram desenvolvidos 9 lotes de implantes lipídicos de Dynasan® 118, com diferentes composições, tendo sido comparados dois adjuvantes da libertação, o Gelucire® 50/02 e a sacarose, bem como os dois LI, sintetizados no âmbito desta dissertação.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a utilização de diferentes materiais, como constituintes dos implantes, contribuem para a obtenção de perfis de libertação do cloridrato de propranolol distintos.

Assim, nos implantes em que é utilizado o Gelucire® 50/02, verificou-se que este por si só origina um decréscimo significativo do teor de ativo libertado, comparativamente com os implantes contendo apenas Dynasan® 118. Contudo, a presença do [Cho][Phe] permite aumentar a libertação do ativo, mas de uma forma não desejada observando-se um *burst release* imediato. Por sua vez, na presença de sacarose, não se observaram diferenças estatisticamente significativas relativamente aos implantes contendo apenas Dynasan, quer na ausência, quer na presença dos LI estudados.

No que diz respeito à capacidade dos LI estudados de influenciarem por si só a libertação do ativo, concluiu-se que apenas o [Cho][Phe] parece alterar de

forma significativa a libertação do ativo estudado, permitindo um aumento significativo da libertação do ativo e demonstrando que a inclusão deste LI, na ausência de Gelucire® 50/02 ou de sacarose, parece ser a melhor opção ao permitir um aumento da libertação com um perfil mais adequado.

Em suma, este estudo demonstrou que os LI não alteram a uniformidade de teor dos implantes desenvolvidos, permitindo obter implantes igualmente homogêneos, comparativamente com os implantes na sua ausência, e que poderão ser úteis como modificadores dos perfis de libertação a partir de implantes lipídicos. No entanto, mais estudos são necessários com diferentes ativos e outros LI para melhor compreender o impacto destes sais na *performance* dos implantes lipídicos e nos possíveis mecanismos de libertação.

5. Referências

- Abu-Diak, O. A., Andrews, G. P., & Jones, D. S. (2012). Hydrophobic Polymers of Pharmaceutical Significance. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (pp. 47–73). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_3
- Adawiyah, N., Moniruzzaman, M., Hawatulaila, S., & Goto, M. (2016). Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems. *MedChemComm*, 7(10), 1881–1897. <https://doi.org/10.1039/C6MD00358C>
- Aitipamula, S., Banerjee, R., Bansal, A. K., Biradha, K., Cheney, M. L., Choudhury, A. R., ... Zaworotko, M. J. (2012). Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? *Crystal Growth & Design*, 12(5), 2147–2152. <https://doi.org/10.1021/cg3002948>
- Akhtar, N., Singh, V., Yusuf, M., & Khan, R. A. (2020). Non-invasive drug delivery technology: development and current status of transdermal drug delivery devices, techniques and biomedical applications. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, 1–30. <https://doi.org/10.1515/bmt-2019-0019>
- Al-Majed, A. A., Bakheit, A. H. H., Abdel Aziz, H. A., Alajmi, F. M., & AlRabiah, H. (2017). Propranolol. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 42, 287–338. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2017.02.006>
- Antunes, A. M. S. (2019). *Incorporação de Gelucire e de um Líquido Iônico em Implantes Lipídicos*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10437/10074>
- Aparicio, S., Atilhan, M., & Karadas, F. (2010). Thermophysical Properties of Pure Ionic Liquids: Review of Present Situation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(20), 9580–9595. <https://doi.org/10.1021/ie101441s>
- Bavishi, D. D., & Borkhataria, C. H. (2016). Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 62(3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2016.07.001>
- Caparica, R., Júlio, A., Baby, A., Araújo, M., Fernandes, A., Costa, J., & Santos de Almeida, T. (2018). Choline-Amino Acid Ionic Liquids as Green Functional Excipients to Enhance Drug Solubility. *Pharmaceutics*, 10(4), 288. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040288>

- Cláudio, A. F. M., Neves, M. C., Shimizu, K., Canongia Lopes, J. N., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2015). The magic of aqueous solutions of ionic liquids: Ionic liquids as a powerful class of cationic hydrotropes. *Green Chemistry*, 17(7), 3948–3963. <https://doi.org/10.1039/c5gc00712g>
- Del Frari, L., Léauté-Labrèze, C., Guibaud, L., Barbarot, S., Lacour, J.-P., Chaumont, C., ... Brunner, V. (2018). Propranolol pharmacokinetics in infants treated for Infantile Hemangiomas requiring systemic therapy: Modeling and dosing regimen recommendations. *Pharmacology Research & Perspectives*, 6(3), e00399. <https://doi.org/10.1002/prp2.399>
- Dong, K., Liu, X., Dong, H., Zhang, X., & Zhang, S. (2017). Multiscale Studies on Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 117(10), 6636–6695. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00776>
- Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2015). *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. (N. Dragicevic & H. I. Maibach, Eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017). Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132–7189. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>
- Feridooni, T., Hotchkiss, A., & Agu, R. U. (2016). Noninvasive Strategies for Systemic Delivery of Therapeutic Proteins — Prospects and Challenges. *Smart Drug Delivery System*. <https://doi.org/10.5772/61266>
- Ferraz, R., Branco, L. C., Prudêncio, C., Noronha, J. P., & Petrovski, Ž. (2011). Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. *ChemMedChem*, 6(6), 975–985. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100082>
- Freemantle, M. (1998). DESIGNER SOLVENTS. *Chemical & Engineering News*, 76(13), 32–37. <https://doi.org/10.1021/cen-v076n013.p032>
- Gomes, J. M., Silva, S. S., & Reis, R. L. (2019). Biocompatible ionic liquids: fundamental behaviours and applications. *Chemical Society Reviews*, 48(15), 4317–4335. <https://doi.org/10.1039/C9CS00016J>
- Gontrani, L. (2018). Choline-amino acid ionic liquids: past and recent achievements about the structure and properties of these really “green” chemicals. *Biophysical*

- Reviews*, 10(3), 873–880. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0420-9>
- Gouveia, W., Jorge, T. F., Martins, S., Meireles, M., Carolino, M., Cruz, C., ... Araújo, M. E. M. (2014). Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere*, 104, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.055>
- Guse, C., Koennings, S., Kreye, F., Siepmann, F., Goepferich, A., & Siepmann, J. (2006). Drug release from lipid-based implants: Elucidation of the underlying mass transport mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.08.030>
- Heckenbach, M. E., Romero, F. N., Green, M. D., & Halden, R. U. (2016). Meta-analysis of ionic liquid literature and toxicology. *Chemosphere*, 150, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.029>
- Heng, P. W. S. (2018). Controlled release drug delivery systems. *Pharmaceutical Development and Technology*, 23(9), 833–833. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1534376>
- Hillery, A., Lloyd, A., & Swarbrick, J. (2001). *Drug Delivery and Targeting For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor & Francis.
- Hough, W. L., & Rogers, R. D. (2007). Ionic Liquids Then and Now: From Solvents to Materials to Active Pharmaceutical Ingredients. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 80(12), 2262–2269. <https://doi.org/10.1246/bcsj.80.2262>
- Huang, W., Wu, X., Qi, J., Zhu, Q., Wu, W., Lu, Y., & Chen, Z. (2019). Ionic liquids: green and tailor-made solvents in drug delivery. *Drug Discovery Today*, 00(00), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.018>
- IOI Oleo GmbH. (2020). Dynasan. Retrieved August 4, 2020, from <https://www.ioioleo.de/en/products/pharma/>
- Izgorodina, E. I., Seeger, Z. L., Scarborough, D. L. A., & Tan, S. Y. S. (2017). Quantum Chemical Methods for the Prediction of Energetic, Physical, and Spectroscopic Properties of Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 117(10), 6696–6754. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00528>
- Kováčik, A., Kopečná, M., & Vávrová, K. (2020). Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(2), 145–155. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713087>
- Kreye, F., Siepmann, F., Zimmer, A., Willart, J. F., Descamps, M., & Siepmann, J. (2011). Controlled release implants based on cast lipid blends. *European*

- Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(1–2), 78–83.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.03.013>
- Kreye, F., Siepman, F., Willart, J. F., Descamps, M., & Siepman, J. (2011). Drug release mechanisms of cast lipid implants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(3), 394–400.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.011>
- Kreye, Frauke, Siepman, F., & Siepman, J. (2008). Lipid implants as drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(3), 291–307.
<https://doi.org/10.1517/17425247.5.3.291>
- Kreye, Frauke, Siepman, F., Zimmer, A., Willart, J., Descamps, M., & Siepman, J. (2011). Cast Lipid Implants for Controlled Drug Delivery: Importance of the Tempering Conditions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(8), 3471–3481.
<https://doi.org/10.1002/jps.22574>
- Lei, Z., Chen, B., Koo, Y., & MacFarlane, D. R. (2017). Introduction: Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 117(10), 6633–6635.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00246>
- Li, P., Nielsen, H. M., & Müllertz, A. (2012). Oral delivery of peptides and proteins using lipid-based drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(10), 1289–1304. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.717068>
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1), 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>
- Marrucho, I. M., Branco, L. C., & Rebelo, L. P. N. (2014). Ionic Liquids in Pharmaceutical Applications. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 5(1), 527–546. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060713-040024>
- National Center for Biotechnology Information. (2020). Propranolol hydrochloride, CID=62882. Retrieved April 8, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propranolol-hydrochloride>
- Panigrahi, K. C., Patra, C. N., Jena, G. K., Ghose, D., Jena, J., Panda, S. K., & Sahu, M. (2018). Gelucire: A versatile polymer for modified release drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 102–108.

- <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.11.001>
- Pawar, R., Ben-Ari, A., & Domb, A. J. (2004). Protein and peptide parenteral controlled delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(8), 1203–1212. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.8.1203>
- Pongjanyakul, T., Medlicott, N. J., & Tucker, I. G. (2004). Melted glyceryl palmitostearate (GPS) pellets for protein delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1–2), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.017>
- Rautio, J., Meanwell, N. A., Di, L., & Hageman, M. J. (2018). The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(8), 559–587. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.46>
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., & Saraf, S. (2008). Lipid Carriers: A Versatile Delivery Vehicle for Proteins and Peptides. *YAKUGAKU ZASSHI*, 128(2), 269–280. <https://doi.org/10.1248/yakushi.128.269>
- Sakamoto, J. H., van de Ven, A. L., Godin, B., Blanco, E., Serda, R. E., Grattoni, A., ... Ferrari, M. (2010). Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacological Research*, 62(2), 57–89. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.011>
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Mota, J. P., Rijo, P., & Reis, C. P. (2017). An emerging integration between ionic liquids and nanotechnology: general uses and future prospects in drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 8(6), 461–473. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0002>
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Saraiva, N., Fernandes, A. S., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., ... Mota, J. P. (2017). Choline- versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(11), 1858–1865. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1349788>
- Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012). Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*, 2012(100 mL), 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>
- Severino, P., Pinho, S. C., Souto, E. B., & Santana, M. H. A. (2012). Crystallinity of Dynasan ®114 and Dynasan ®118 matrices for the production of stable Miglyol ®-loaded nanoparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 108(1), 101–108. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1613-7>

- Shamshina, J. L., Barber, P. S., & Rogers, R. D. (2013). Ionic liquids in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(10), 1367–1381. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.808185>
- Shrestha, H., Bala, R., & Arora, S. (2014). Lipid-Based Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutics*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/801820>
- Siepmann, F., Muschert, S., Flament, M., Leterme, P., Gayot, A., & Siepmann, J. (2006). Controlled drug release from Gelucire-based matrix pellets: Experiment and theory. *International Journal of Pharmaceutics*, 317(2), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.006>
- Siepmann, J., Siegel, R. A., & Rathbone, M. J. (2012). Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, 1–594. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9>
- Siepmann, J., Siegel, R. A., & Siepmann, F. (2012). Diffusion Controlled Drug Delivery Systems. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (pp. 127–152). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_6
- Stewart, S., Domínguez-Robles, J., Donnelly, R., & Larrañeta, E. (2018). Implantable Polymeric Drug Delivery Devices: Classification, Manufacture, Materials, and Clinical Applications. *Polymers*, 10(12), 1379. <https://doi.org/10.3390/polym10121379>
- Stoimenovski, J., MacFarlane, D. R., Bica, K., & Rogers, R. D. (2010). Crystalline vs. Ionic Liquid Salt Forms of Active Pharmaceutical Ingredients: A Position Paper. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 521–526. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0030-0>
- Thuy Pham, T. P., Cho, C., & Yun, Y. (2010). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Research*, 44(2), 352–372. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.030>
- Tong, X., Pan, W., Su, T., Zhang, M., Dong, W., & Qi, X. (2020). Recent advances in natural polymer-based drug delivery systems. *Reactive and Functional Polymers*, 148, 104501. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104501>
- Tsung, J., & Burgess, D. J. (2012). Biodegradable Polymers in Drug Delivery Systems. In J. Siepmann, R. A. Siegel, & M. J. Rathbone (Eds.), *Fundamentals*

- and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (pp. 107–123). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_5
- Wang, B., Qin, L., Mu, T., Xue, Z., & Gao, G. (2017). Are Ionic Liquids Chemically Stable? *Chemical Reviews*, *117*(10), 7113–7131. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00594>
- Wei, L., Yang, Y., Shi, K., Wu, J., Zhao, W., & Mo, J. (2016). Preparation and characterization of loperamide-loaded dynasan 114 solid lipid nanoparticles for increased oral absorption in the treatment of diarrhea. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00332>
- Welton, T. (2018). Ionic liquids: a brief history. *Biophysical Reviews*, *10*(3), 691–706. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0419-2>
- Wu, S., Li, F., Zeng, L., Wang, C., Yang, Y., & Tan, Z. (2019). Assessment of the toxicity and biodegradation of amino acid-based ionic liquids. *RSC Advances*, *9*(18), 10100–10108. <https://doi.org/10.1039/C8RA06929H>
- Yadav, N., Khatak, S., & Singh Sara, U. V. (2013). Solid lipid nanoparticles- A review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *5*(2), 8–18. <https://doi.org/10.9790/3013-26103444>
- Yun, Y. H., Lee, B. K., & Park, K. (2015). Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *Journal of Controlled Release*, *219*, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.005>
- Zhang, S., Zhang, J., Zhang, Y., & Deng, Y. (2017). Nanoconfined Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, *117*(10), 6755–6833. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00509>
- Zhao, D., Liao, Y., & Zhang, Z. (2007). Toxicity of Ionic Liquids. *CLEAN – Soil, Air, Water*, *35*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1002/clen.200600015>