

FILIPPE DANIEL TAVARES FERNANDES

**Emulsões O/A contendo Rutina: Impacto dos Líquidos
Iónicos na sua Estabilidade**

Orientadora: Professora Doutora Tânia Santos de Almeida

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

Lisboa

2022

FILIPPE DANIEL TAVARES FERNANDES

Emulsões O/A contendo Rutina: Impacto dos Líquidos Iónicos na sua Estabilidade

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 27 de janeiro de 2022, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº361/2021 de 29 de dezembro de 2021, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof^ª. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^ª. Doutora Maria Catarina Leite

Orientador:

Prof^ª. Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2022

Não é para se ir fazendo, é para se fazer

Maria Odette Ferreira

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Tânia Santos de Almeida, por me ter convidado e dar a conhecer a Investigação Científica, e por ter acreditado em mim, ajudando-me a crescer como pessoa ao longo destes três anos.

Em segundo lugar, não posso esquecer as pessoas que estiveram comigo no Associativismo, quer tenha sido na Associação de Estudantes de Ciências Farmacêuticas da Universidade Lusófona (AECFUL), ou na Associação Portuguesa de Estudantes de Farmácia (APEF), por me terem dado a oportunidade de conhecer este mundo, e tornar-me na pessoa que sou hoje.

À Ana Júlio, por toda a ajuda e disponibilidade durante estes 3 anos de investigação, que muito contribuiu a ter chegado aqui, e também não esquecer a Rita Caparica, por toda ajuda e explicações.

Ao João Menezes e à Inês Marreiros, por terem sido as pessoas que foram, duas amigas que levo para a vida, e que me proporcionaram tanto durante estes anos, não existem palavras para descrever o quanto importante que foram e por terem permitido viver a Faculdade e não ter apenas passado por ela.

Ao João pelos 11 anos de amizade, obrigado por todo o apoio e por estares sempre aí para o que for preciso.

Aos colegas que me acompanharam nestes anos, por todos os momentos passados, e por terem tornado esta caminhada, inesquecível.

Aos meus pais e família, por terem tornado tudo isto possível, por estarem sempre presentes seja nos bons e maus momentos e estarem sempre disponíveis, um “obrigado” não chega.

Resumo:

O desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos tópicos tem despertado um interesse crescente. No entanto, algumas limitações podem surgir durante o desenvolvimento destes, como a baixa solubilidade de certos ativos, a dificuldade de incorporação desses mesmos ativos nos sistemas de veiculação e até mesmo a desafios na estabilidade desses sistemas. Os Líquidos Iônicos (LI) têm várias propriedades que podem ser benéficas para este desafio, pois podem aumentar a solubilidade e facilitar a incorporação de compostos pouco solúveis em diferentes tipos de formulações, e também está descrito que podem aumentar a estabilidade de formulações.

A rutina é um composto fenólico com propriedades interessantes do ponto de vista farmacológico, porém a sua baixa solubilidade limita a sua aplicabilidade.

No âmbito deste estudo, foi avaliado a incorporação de rutina em emulsões óleo em água (O/A), tanto na presença como na ausência de rutina e/ou de LI e foi avaliado qual o impacto destes sais na estabilidade das emulsões preparadas na presença de diferentes quantidades de emulsificante.

Após a execução de estudos de solubilidade, onde ficou comprovado que os dois LI estudados permitem um aumento de solubilidade da rutina em água, foram preparadas formulações O/A, na ausência e presença de rutina e/ou dos LI estudados e foram executados estudos de estabilidade das formulações. Os resultados obtidos possibilitaram concluir que a presença dos LI permitiu uma maior facilidade na formulação e uma maior estabilidade das formulações desenvolvidas permitindo utilizar menores quantidades do emulsificante Crodafos® CES.

Palavras-chave: Rutina, Líquidos Iônicos, Solubilidade, Emulsões Óleo/Água, Estabilidade, Armazenamento.

Abstract:

The development of drug delivery systems has attracted growing interest. However, some limitations may arise during their development, such as the low solubility of some compounds, difficulty in incorporating them in the delivery systems and even challenges in the stability of the systems. Ionic Liquids (IL) have several properties that can be beneficial for this challenge, as they can increase solubility and facilitate the incorporation of poorly soluble compounds in different types of formulations, and it has also been described that they can increase the stability of formulations.

Rutin is a phenolic compound with interesting properties from a pharmacological point of view, however its low solubility limits its applicability.

Within the scope of this study, the incorporation of rutin in oil in water (O/W) emulsions in the presence and absence of rutin and/or IL was evaluated and the impact of these salts on the stability of the developed formulations in the presence of different amounts of emulsifier was evaluated.

Initially, solubility studies were carried out, where it was proven that the two IL allow an increase in the solubility of rutin in water. Then O/W formulations were developed, in the absence and presence of rutin and / or the studied IL and stability studies of the formulations were carried out. The results obtained allowed to conclude that the presence of IL allowed a greater ease in the formulation and a superior stability of the formulations developed allowing the use of smaller amounts of the emulsifier Crodafo[®] CES.

Keywords: Rutin, Ionic liquids, Solubility, Oil-in-water emulsions, Stability, Shelf-life.

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

% m/m	Percentagem massa por massa
%	Percentagem
[Cho][Gly]	(2-hidroxietil)-trimetilamónio glicinato
[Cho][Phe]	(2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-fenilalaninato
±	Mais ou Menos
°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise Unidirecional de Variância
BHT	Butil hidroxitolueno
CBIOS	Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde
Crodafos® CES	Álcool cetearílico e fosfato diacetílico e fosfato cetílico (-10OE)
DA	Unidade de massa atómica
DP	Desvio Padrão
EDTA Dissódico	Ácido etilenodiaminotetracético dissódico
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
h	Horas
LI	Líquido Iónico
IL	<i>Ionic Liquid</i>
M	Molar
mg	Miligramma
mg/mL	Miligramma por mililitros
min	Minuto
MIP	Miristato de isopropilo
mL	Mililitros
n	Número de amostras
nm	Nanometros
O/A	Óleo em água
O/W	<i>Oil in water</i>
PEG 400	Polietilenoglicol 400
PG	Propano-1,2-diol ou propilenoglicol

q.b.	Quanto baste para
TA	Temperatura Ambiente
UV	Radiação UV

Índice Geral

Índice de Tabelas	IX
Índice de Figuras	XI
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Vias de Administração.....</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Sistemas de Veiculação.....</i>	<i>6</i>
1.3. <i>Solubilidade dos Fármacos.....</i>	<i>12</i>
1.4. <i>Líquidos Iónicos</i>	<i>13</i>
1.5. <i>Rutina.....</i>	<i>19</i>
2. Material e Métodos	21
2.1. <i>Reagentes.....</i>	<i>21</i>
2.2. <i>Estudos de Solubilidade.....</i>	<i>21</i>
2.3. <i>Análise estatística</i>	<i>22</i>
2.4. <i>Preparação das Emulsões óleo em água (O/A)</i>	<i>22</i>
2.5. <i>Estabilidade preliminar</i>	<i>24</i>
2.5.1. <i>Teste de aquecimento gradual ou de stress térmico</i>	<i>24</i>
2.5.2. <i>Teste de centrifugação</i>	<i>25</i>
2.5.3. <i>Ciclos de Temperatura.....</i>	<i>25</i>
2.6. <i>Estabilidade Acelerada e armazenamento (shelf life).....</i>	<i>25</i>

3. Resultados e discussão	26
<i>3.1. Estudos de Solubilidade.....</i>	<i>26</i>
<i>3.2 Preparação das emulsões O/A</i>	<i>27</i>
<i>3.3 Propriedades organoléticas e viscosidades</i>	<i>27</i>
<i>3.4 Estabilidade Preliminar.....</i>	<i>30</i>
<i>3.5 Estabilidade Acelerada e armazenamento (shelf life)</i>	<i>32</i>
4. Conclusão.....	35
5. Bibliografia	36

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição qualitativa e quantitativa (% m/m) para todas as emulsões O/A contendo 3 % de Crodafos® CES e preparadas sem ou com Rutina e sem ou com cada Líquidos Iônicos.	23
Tabela 2 - Composição qualitativa e quantitativa (% m/m) para todas as emulsões O/A contendo 3,5 % de Crodafos® CES e preparadas sem ou com Rutina e sem ou com cada Líquidos Iônicos.	23
Tabela 3 - Composição qualitativa e quantitativa (% m/m) para todas as emulsões O/A contendo 4 % de Crodafos® CES e preparadas sem ou com Rutina e sem ou com cada Líquidos Iônicos.	24
Tabela 4 - Solubilidade da Rutina em água ou nas misturas água: Líquidos Iônicos, 99.5:0.5 [Cho][Gly] e 99.8:0.2 [Cho][Phe], n=3, média $\pm$ DP. ** p < 0.01 e *** p < 0.001 (ANOVA a um fator, teste de Tukey, comparado com a solubilidade em água).	27
Tabela 5 - Viscosidade das emulsões O/A na ausência de Rutina após formulação (n=3).	29
Tabela 6 - Viscosidade das emulsões O/A na presença de Rutina após formulação (n=3).	29

Tabela 7 - Resultados do estudo de estabilidade preliminar das emulsões O/A na ausência de Rutina. Os valores da viscosidade foram medidos após 6 ciclos de temperatura (a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $45\text{ }^{\circ}\text{C}$) ($n=3$).....30

Tabela 8 - Resultados do estudo de estabilidade preliminar das emulsões O/A na presença de Rutina ($n=3$). Os valores da viscosidade foram medidos após 6 ciclos de temperatura (a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $45\text{ }^{\circ}\text{C}$) ($n=3$).....31

Tabela 9 - Resultados dos estudos de estabilidade e teste de armazenamento das emulsões O/A na ausência de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 3 meses na estufa ($40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), no frigorífico ($5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ou à TA ($n=3$).32

Tabela 10 - Resultados dos estudos de estabilidade e teste de armazenamento das emulsões O/A na presença de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 3 meses na estufa ($40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), no frigorífico ($5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ou à TA ($n=3$).32

Tabela 11 - Resultados dos estudos de estabilidade e teste de armazenamento das emulsões O/A na ausência de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 6 meses na estufa ($40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), no frigorífico ($5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ou à TA ($n=3$).33

Tabela 12 - Resultados dos estudos de estabilidade acelerada após 6 meses na estufa ($40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e teste de armazenamento das emulsões O/A na presença de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 180 dias na estufa ($40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), no frigorífico ($5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ou à TA ($n=3$).33

Índice de Figuras

Figura 1 - Vias sintéticas típicas para a obtenção de Líquidos Iônicos próticos e apróticos (Adaptado de W. Silva et al., 2020).....	14
Figura 2 - Iões típicos presentes nos Líquidos Iônicos (Adaptado de W. Silva et al., 2020).....	15
Figura 3 - Gerações de Líquidos Iônicos ao longo do tempo (Adaptado de W. Silva et al., 2020 e MacFarlane et al., 2018).	16
Figura 4 - Estrutura química da Rutina.	19
Figura 5 - Aparência macroscópica das formulações (A) - na ausência de Rutina e (B) - na presença de Rutina.	28

1. Introdução

Ao longo dos anos, tem havido uma grande procura por melhores formas farmacêuticas, principalmente, quando estamos perante fármacos com um elevado potencial farmacoterapêutico, porém que contam com uma baixa solubilidade, permeabilidade e/ou estabilidade. Tal tem dificultado o desenvolvimento de novas formas de administração desses ativos, ou a adaptação de formas já usadas (Caparica et al., 2018; Singh Malik, Mital, & Kaur, 2016). É muito importante também considerar a via de administração a que recorreremos, a qual depende de diversos fatores nomeadamente, o tipo de fármaco, a farmacocinética e o alvo terapêutico. A via de administração deve ser muito bem avaliada, consoante o objetivo e o fármaco que temos.

1.1. Vias de Administração

Como referido anteriormente, a via de administração de um fármaco, é um dos principais fatores a considerar no desenvolvimento do mesmo. Existem várias vias de administração que podem ser utilizadas, entre elas, a oral, a via parentérica, a via transmucosa e a tópica (Jain, 2020).

A via mais usada é indubitavelmente a oral, uma vez que é de fácil administração e facilmente aceite pelos pacientes, porém contém diversas limitações, como, o efeito de primeira passagem, isto é, a inativação de uma grande parte do fármaco no fígado antes de atingir a circulação sanguínea, e muitos compostos polares e macromoléculas têm dificuldade em ultrapassar as membranas epiteliais no intestino. Outra desvantagem, é a variabilidade elevada da absorção das várias substâncias quando tomadas por esta via. A biodisponibilidade também pode ser comprometida, uma vez que muitos fármacos se tornam insolúveis a pH baixos, condição encontrada no trato digestivo, tornando complicada a

transição do fármaco para a sua forma solúvel, uma vez que esta é aquela que é absorvida pela corrente sanguínea (Jain, 2020; Patel, Liu, & Brown, 2011).

Relativamente à via parentérica, temos por exemplo a subcutânea, intramuscular, intravenosa e a intraóssea. A parentérica é a via invasiva mais utilizada, tendo como vantagens, ser uma via de fácil administração em pacientes mais incapacitados, é previsível, tem uma boa biodisponibilidade, é de rápida ação e evita boa parte dos problemas associados à via oral (Jain, 2020; Korani et al., 2019). Por outro lado, temos como desvantagens, o facto de não ser o método ideal, por envolver uma injeção, o que provoca geralmente dor contribuindo para a não adesão dos pacientes à terapêutica (Vollrath, Engert, & Winter, 2017).

As injeções subcutâneas por exemplo, permitem que seja o próprio paciente a efetuar a administração, como é o caso da insulina nos diabéticos. Porém existem muitos fatores que têm impacto nesta via, como por exemplo o tamanho das moléculas, que influencia a velocidade de penetração das mesmas, e a viscosidade que pode impactar negativamente a forma como o fármaco se difunde ao longo do corpo. Este tipo de injeção tem assim, um baixo nível de absorção e uma velocidade de ação menor quando comparada com outros tipos de injeção, em particular a intramuscular e a intravenosa (Jain, 2020).

A intramuscular, pode dizer-se que se situa entre a subcutânea e a intravenosa em termos de velocidade de ação, variando consoante a circulação sanguínea no músculo em que é administrada e com a própria atividade muscular. Como limitações temos, a dor no local de administração, que funciona como um fator de não adesão, a quantidade administrada ser limitada, depende da quantidade de massa muscular presente, o facto de existir a possibilidade de atingir num vaso sanguíneo durante a administração, o que pode levar à introdução direta na corrente sanguínea.

Por fim, a administração intravenosa é muito usada em momentos de emergência, devido à sua rápida ação, permitindo o controlo da velocidade de administração. Relativamente às suas desvantagens, existe a possibilidade de ocorrerem reações

imunológicas à injeção de proteínas ou péptidos, podem ocorrer infeções no local de administração, pode também ocorrer embolismo devido à possibilidade de entrar ar na corrente sanguínea, ou pode mesmo ocorrer trauma nas veias conduzindo a um tromboembolismo (Jain, 2020; Malamed, 2010).

Relativamente à via intraóssea, esta é uma alternativa à via anterior, principalmente, quando em casos críticos a via intravenosa não resulta. É uma via acessível através da medula óssea, ou seja, tem uma ligação direta ao sistema venoso do corpo (Lane & Guimarães, 2008). É uma via que permite um efeito bastante rápido, mas devido ao facto de ser bastante desconfortável e de difícil aplicação é maioritariamente usada em casos de emergência.

No que diz respeito à via transmucosa, esta refere-se à difusão através de uma membrana mucosa. Como exemplos temos as vias pulmonar, bucal, sublingual, intranasal, vaginal e retal (Lam et al., 2020; Targhotra & Chauhan, 2020).

A via pulmonar tem como principais vantagens, a possibilidade de usar uma menor dose de fármaco, fazendo assim com que as possibilidades de ocorrerem efeitos adversos sejam mais baixas e permite ainda que alguns fármacos tenham um início de ação mais rápido. Oferece assim uma boa alternativa para fármacos com ação sistémica, evitando injeções e assim facilitar a adesão à terapêutica, é uma via vantajosa para fármacos que sejam mal absorvidos a nível do trato gastrointestinal, tendo uma farmacocinética bem mais vantajosa e ainda evita o efeito de primeira passagem (Patel et al., 2011), oferecendo uma área de superfície considerável. Por outro lado, existem algumas desvantagens, podendo ocorrer efeitos irritantes nas vias aéreas, tem um custo relativamente elevado e pode não ser muito fácil controlar o efeito da dosagem do fármaco, devido à grande variabilidade dos padrões de respiração (Hill, Preston, & Roberts, 2015).

A respeito da via bucal, esta é uma via bastante atraente uma vez que permite o uso de fármacos a nível local ou sistémico, adsorvendo na mucosa oral. Comparativamente à via

oral, esta via, tem algumas vantagens importantes, como o facto de evitar o efeito de primeira passagem e situar-se numa zona fortemente vascularizada (Jacob et al., 2021). Para além destas vantagens, esta via permite a fácil expulsão em caso de toma incorreta do fármaco e aumenta a biodisponibilidade do fármaco, permitindo o uso de doses menores: Assim, é uma via mais segura e é também uma via que proporciona uma maior adesão por parte dos pacientes, principalmente quando comparada com vias não orais (Gilhotra, Ikram, Srivastava, & Gilhotra, 2014; Targhotra & Chauhan, 2020). Por outro lado, é uma zona com baixa área de superfície, a presença da saliva acaba por diluir o fármaco, a ingestão da mesma pode baixar a biodisponibilidade e não é aconselhável à pediatria e geriatria, uma vez que pode levar a asfixia (Jacob et al., 2021).

Já a via sublingual, como o próprio nome indica, diz respeito à zona abaixo da língua sendo este um local muito vascularizado e assim útil para fármacos atuarem a nível sistémico. Como vantagens, esta permite uma ação mais rápida, quando comparada com a via oral, sendo também bastante útil quando estamos perante fármacos bastante solúveis que sofrem decomposição no trato gastrointestinal, uma vez que esta via evita este contacto. É também de fácil autoadministração e útil para pacientes com dificuldades de deglutição. A nível de desvantagens, é necessário manter o fármaco na zona certa, isto é, para não acabar por engolir o mesmo e assim não obter o efeito desejado. Alguns fármacos não podem ser administrados por esta via, em caso de emergência, não sendo a via ideal por haver a necessidade do paciente estar consciente e não é permitida a absorção de dosagens muito elevadas de fármaco (Hua, 2019).

Quanto à via intranasal, inicialmente foi bastante usada a nível pediátrico, evitando o uso da via subcutânea ou oral que nestes pacientes pode ser um problema. No que diz respeito à absorção, esta ocorre diretamente na corrente sanguínea, evitando assim o efeito de primeira passagem e leva a um início rápido de ação da substância ativa. (Grassin-Delyle et al., 2012; Jain, 2020; Malamed, 2010; Tucker, Tucker, & Brown, 2018). Em contraponto é necessário usar uma dose mais elevada quando comparada com a via intravenosa, devido à

baixa biodisponibilidade da mucosa nasal, a área disponível é pequena, e pode também causar intolerância local.

Relativamente à via vaginal, esta é uma via que permite a entrega de doses bastante elevadas de fármaco quando comparada com a intranasal, por exemplo. Permite ainda a automedicação, evitando também reações adversas como a náusea ou o vomito associadas à via oral. Por outro lado, um dos obstáculos principais, é o facto de ser uma via exclusivamente feminina, tem uma absorção limitada devido ao tipo de tecido presente nesta zona que varia consideravelmente dependendo da idade da pessoa, bem como o facto de haver ou não menstruação (Iqbal & Dilnawaz, 2019).

A via retal é outra possibilidade que nos é apresentada, na qual é possível impedir o efeito de primeira passagem, permitir ainda uma rápida absorção, por possuir grande capilaridade da zona em questão e evitar ainda fatores como o sabor dos fármacos quando administrados oralmente. Por outro lado, não é uma via muito bem aceite pelos pacientes, diversos fatores influenciam a biodisponibilidade dos fármacos, tais como a área superficial, a quantidade de fármaco no local onde este é absorvido e o tempo de retenção, tudo isto torna pouco previsível a absorção do fármaco (Kaminsky, Bostwick, & Guthrie, 2015).

Por sua vez a via tópica, refere-se à administração dos fármacos através da pele, funcionando como uma alternativa às restantes vias já referidas. Aqui estão inseridas várias formulações, que são administradas por esta via, com o intuito de atuar localmente. Nomeadamente, soluções, emulsões, suspensões, geles e *sprays* (Arora, Kumar, & Sharma, 2015). Algumas vantagens, desta via de administração, são o facto de evitar o efeito de primeira passagem, a maior facilidade de administração, o facto de ser menos invasiva, permitir um acesso mais direto ao alvo terapêutico e uma maior biodisponibilidade (Singh Malik et al., 2016). Porém, existem alguns entraves no uso desta via, como é o caso da baixa solubilidade aquosa de muitas substâncias ativas, podendo este fator dificultar a sua formulação tópica.

Existem ainda outras limitações, tais como a dificuldade de absorver fármacos com mais de 500 Da de peso molecular, o Log P (octanol/água) deve encontrar-se entre 1 e 3, para ultrapassar as várias camadas da pele, além disso a presença de enzimas na pele, tais como esterases e peptidases, podem metabolizar os fármacos, e assim reduzir a eficácia dos mesmos. Existe ainda a possibilidade de reações de sensibilidade e irritação da pele, podendo ocorrer, quando exposta a certos excipientes ou fármacos, resultando em eritemas ou edemas (Brown, Martin, Jones, & Akomeah, 2006).

1.2. Sistemas de Veiculação

Como foi possível verificar anteriormente, os fármacos podem ser administrados no corpo humano através de várias vias de administração, cada uma delas com as suas especificidades, vantagens e desvantagens. Outro fator muito importante a se considerar é o sistema de veiculação usado, pois é este que vai definir de que maneira o fármaco chegará ao local de ação, impactando de grande forma a eficácia do mesmo.

Certos fármacos possuem uma concentração ideal no local de ação, enquanto a concentração de outros pode ser muito baixa, podendo não resultar no efeito desejado. Em contrapartida, a concentração do fármaco pode ser muito elevada e resultar no surgimento de reações adversas. Por outras palavras, ao desenvolver um novo sistema de veiculação de fármacos, é necessário compreender e controlar a farmacocinética, a farmacodinâmica, a toxicidade e a eficácia dos fármacos. Estes sistemas devem assim garantir que a entrega dos fármacos no local de ação, é feita nas melhores condições possíveis, de forma controlada e na dose ideal. Assim, têm sido feitos estudos intensivos e constantes, de forma a encontrar sistemas de veiculação que permitam ao fármaco chegar ao local de ação com a maior eficácia possível.

Tendo em mente que o objetivo primário é veicular o fármaco escolhido, é então fundamental considerar as suas propriedades, de forma a escolher a forma farmacêutica mais

indicada ao mesmo. As substâncias podem ser classificadas em quatro classes, sendo elas a Classe 1 (Alta Solubilidade e Permeabilidade), a Classe 2 (Alta Permeabilidade e Baixa Solubilidade), a Classe 3 (Alta Solubilidade e Baixa Permeabilidade) e a Classe 4 (Baixa Solubilidade e Permeabilidade) (Adepu & Ramakrishna, 2021). A grande maioria dos novos fármacos encontra-se nas classes 2 e 4, logo estes possuem baixa solubilidade o que complica a sua incorporação em sistemas de veiculação (Ku, 2008). É por isso que este tem sido um dos maiores focos de investigação, quanto à preparação de novos sistemas de veiculação.

Mas apesar de o ideal ser o desenvolvimento de novos sistemas de veiculação, com os elevados custos associados ao desenvolvimento de um fármaco, muitas vezes não é possível desenvolver um sistema de veiculação completamente novo e personalizado. Assim muitas vezes opta-se por melhorar estratégias já existentes.

Em resumo, quando se pretende desenvolver sistemas de veiculação novos ou melhorar sistemas já existentes, é necessário considerar as propriedades físico-químicas do fármaco, bem como a via de administração, a doença que se pretende tratar, a dose do fármaco, os custos envolvidos na produção e aplicação do sistema e ainda considerar se é um tratamento agudo ou crónico (Allen & Cullis, 2004; Kawamoto, Matsuda, & Ito, 2018).

A nível tópico, é preciso ponderar todas as limitações associadas a esta via, nomeadamente no que se refere às características e propriedades tanto dos fármacos, como da pele. Dada a quantidade de camadas presentes na pele, a biodisponibilidade de alguns fármacos pode estar comprometida, e por isso a sua escolha é muito importante, bem como a seleção dos excipientes a serem usados nas formulações a desenvolver (Caparica et al., 2018).

No âmbito deste trabalho, será considerada a via de administração tópica existindo diversos sistemas de veiculação adequados à mesma, como por exemplo as soluções, *sprays*, suspensões, geles e emulsões, já acima enumerados (Arora et al., 2015).

Começando pelas soluções, estas são compostas por líquidos contendo um veículo (Edman, 1994). Este tipo de formulações tem como principais vantagens o facto de serem muito fáceis de produzir. Em oposição, não oferecem proteção à pele, não são muito hidratantes, e quando são baseadas em álcool, podem ser irritantes no local de ação (Mayba & Gooderham, 2018).

Relativamente às suspensões, estas são constituídas por um líquido e um sólido insolúvel, assim sendo existe sempre a tendência destas partículas sedimentarem (Edman, 1994). Como principais vantagens as suspensões são de fácil aplicação e são calmantes ao aplicar. Pelo contrário, exigem cuidados como o agitar antes da sua aplicação, podem ser irritantes, tal como as soluções, quando possuem na sua formulação álcool e são mais secas quando comparadas com pomadas ou cremes (Rosen, Landriscina, & Friedman, 2014).

Relativamente aos geles, estes têm normalmente um aspeto transparente. Em contacto com a pele liquidificam, e ao secarem, deixam o filme não oclusivo por cima da zona de aplicação (Rosen et al., 2014). As principais vantagens são, tal como as anteriores, serem de fácil uso, são elegantes do ponto de vista cosmético, não gordurosas e de fácil remoção. Por outro lado, exatamente por serem facilmente retirados, estes podem ser removidos pela transpiração e dependendo dos componentes podem causar irritabilidade no local de ação (Mayba & Gooderham, 2018).

No que aos *sprays* diz respeito, estes oferecem diversas vantagens, tais como serem de fácil utilização e de aplicabilidade em zonas de difícil acesso, ajustável ao nível da dosagem, permitirem uma boa distribuição e deixam poucos resíduos (Habet, Kolli, Pona, & Feldman, 2019). No entanto, podem causar alguma irritabilidade na zona aplicada (Mayba & Gooderham, 2018).

No âmbito deste trabalho, as formulações tópicas escolhidas foram as emulsões porque estas permitem evitar o efeito de primeira passagem, evitar incompatibilidades gastrointestinais, é possível haver automedicação, permite a incorporação de fármacos

hidrofóbicos e permite ainda uma libertação controlada (Arora et al., 2015). No entanto estas formulações podem apresentar problemas no que diz respeito à sua estabilidade.

As emulsões são constituídas por dois líquidos imiscíveis originando sistemas bifásicos ou mais complexos, sendo aplicadas principalmente na cosmética (Kovács et al., 2005). Na prática, temos uma fase contínua ou também conhecida como fase externa, onde vão estar dispersas as gotículas, sendo esta a fase descontínua ou interna (Talarico, Casas, Chung, & Dobrogosz, 2012). Uma vez que juntando apenas estas duas fases, as emulsões não seriam estáveis, é necessário juntar componentes que ajudem à estabilidade destas, sendo estes os emulsificantes e os surfactantes. As emulsões podem ser categorizadas como óleo/água, água/óleo e ainda as múltiplas como é o caso de água/óleo/água e de óleo/água/óleo (Goodarzi & Zendehboudi, 2019). Dentro destes 4 tipos principais, temos outras variações que diferem no tamanho das gotículas e na sua distribuição. Temos desde as nano, micro e macroemulsões, respetivamente das gotículas mais pequenas para as maiores (Sweeta Akbari & Abdurahman Hamid Nour, 2018).

Relativamente às emulsões água/óleo, estas têm uma fase externa hidrofóbica, o óleo, e como fase interna, a água. Já as emulsões óleo/água, são exatamente o contrário das anteriores, ou seja, a fase interna é óleo e a externa, é água, e estas são as emulsões mais comuns. Por fim, as emulsões múltiplas, podem ser água/óleo/água ou óleo/água/óleo, que consistem em gotículas muito pequenas suspensas em gotículas maiores e, por fim, dispersas numa fase contínua (Yaqoob Khan, Talegaonkar, Iqbal, Jalees Ahmed, & Krishan Khar, 2006).

Para formular uma emulsão, é necessária bastante energia mecânica de forma a dispersar um dos líquidos, em forma de gotículas, na fase contínua. As características de uma emulsão são personalizáveis desde o início da sua formulação, dependendo de fatores como velocidade de agitação, tempo, temperatura e pressão. Para além dos dois líquidos é necessário adicionar mais componentes de forma a obtermos uma formulação estável, entre

outras características (Light & Karboune, 2021; Sweeta Akbari & Abdurahman Hamid Nour, 2018).

Existem duas características reológicas, bastante relevantes nas emulsões, são elas, o tamanho da gotícula e a viscosidade. Relativamente ao tamanho das gotículas, é relevante, principalmente no que toca à estabilidade. Quando numa emulsão, o tamanho e número das gotículas não se altera significativamente ao longo do tempo, quando armazenado, consideramos que a emulsão é estável. Esta característica é adaptável, no momento da formulação, uma vez que depende da velocidade de agitação. Quanto menor o tamanho das gotículas, maior será a sua distribuição ao longo da emulsão (Sweeta Akbari & Abdurahman Hamid Nour, 2018).

Relativamente à viscosidade, esta pode ser definida como a resistência ao fluxo. No caso de um aumento de viscosidade, esta pode reduzir a mobilidade das gotículas da emulsão, impedindo a coalescência das mesmas e assim evitar a separação de fases (Fredrick, Walstra, & Dewettinck, 2010). Este aumento de viscosidade pode também favorecer a aceitação por parte dos consumidores, se permitir a obtenção de uma fluidez mais agradável.

A respeito da estabilidade das emulsões, verificou-se que esta é influenciada por fatores físicos ou químicos (Angardi, Ettehadi, & Yücel, 2022). A instabilidade de uma emulsão é verificável, quando começa a acontecer floculação ou sedimentação das partículas (tal poderá ser evitado, reduzindo o tamanho das partículas, reduzindo a diferença de densidades entre fases, ou aumentando a viscosidade da fase dispersa), seguida de coalescência, a qual consiste numa fase já irreversível, onde ocorre a fundição de duas ou mais gotas numa única grande, e assim a interface rompe promovendo a formação de um filme, que leva ao aparecimento de uma pressão de desconexão, resultando por fim na separação de fases (Marquez, Forgiarini, Langevin, & Salager, 2018). Apesar disto a estabilidade das emulsões pode ser controlável através da adição de substâncias à formulação, que permitam contornar

este problema. Neste âmbito, componentes como surfactantes, permitem a formação de um filme à volta da fase interna, o que aumenta a viscosidade interfacial e diminui a tensão interfacial, promovendo a estabilidade da formulação. Por isso é necessário encontrar os componentes adequados para cada formulação e assim garantir a sua estabilidade e uniformidade (Talarico et al., 2012).

Para verificar a estabilidade de uma emulsão, é possível efetuar esta análise ao expor a formulação a diversos testes de estabilidade, como a, estabilidade preliminar e a estabilidade acelerada. No caso da primeira, esta é realizado normalmente, durante 6 ciclos, que incluem 24h em condições de aquecimento numa estufa, seguidas de novas 24h, desta vez em condições de arrefecimento num frigorífico. Assim as formulações são sujeitas a condições de *stress* de forma a evidenciar possíveis sinais de instabilidade mais rapidamente. Já relativamente à estabilidade acelerada, esta é realizada num período de tempo superior, normalmente de 3 meses, mas poderá estender-se por mais tempo. A formulação é sujeita a condições como o aquecimento em estufa ou o arrefecimento no frigorífico, não envolvendo as variações em ciclos de temperatura, como no estudo referido anteriormente e utilizando assim condições menos extremas. Deste modo, este é um estudo útil para estimar o prazo de validade da formulação. É possível ainda avaliar a estabilidade de longa duração, conhecido como o teste de *shelf life*, onde as formulações são colocadas à temperatura ambiente (TA) sendo estas observadas e avaliadas periodicamente (ANVISA, 2005). Este teste permite comprovar os resultados previstos pelo teste de estabilidade acelerada, nomeadamente o prazo de validade estimado.

Em todos estes testes os parâmetros estudados são definidos pelo formulador sendo geralmente avaliadas as características organoléticas das formulações, verificando-se se ocorre alguma alteração ao longo do tempo, como a ocorrência de sinais de instabilidade, mudanças drásticas na viscosidade, mudanças de cor ou de textura, bem como as propriedades físico-químicas das emulsões, como o pH e a viscosidade, e podem ainda ser avaliadas as características microbiológicas das formulações.

De acordo com o acima exposto, fica claro a relevância de estudar a incorporação de diferentes substâncias que permitam o aumento da estabilidade das emulsões, e que permita a manutenção da mesma ao longo do tempo e a importância de realizar estudos de estabilidade das formulações desenvolvidas.

Assim, devido à sua adaptabilidade, as emulsões, são um interessante sistema de veiculação, apesar de alguns problemas de estabilidade e de uniformidade (Light & Karboune, 2021; Sweeta Akbari & Abdurahman Hamid Nour, 2018) que justificam investir no estudo de estratégias para ultrapassar os mesmos.

1.3. Solubilidade dos Fármacos

Como referido anteriormente, a baixa solubilidade de muitos fármacos, revela-se como outro dos grandes obstáculos a transpor, na preparação de novos sistemas de veiculação, nomeadamente de emulsões, uma vez que tal conduzirá a uma reduzida disponibilidade da substância ativa no organismo, não garantindo assim a sua eficácia.

A solubilidade é uma propriedade de uma substância gasosa, líquida ou sólida, chamada soluto, dissolvida num solvente, também ele podendo ser gasoso, líquido ou sólido. Tal depende de fatores como a temperatura, a pressão, e o solvente em si. Uma substância ativa, pouco solúvel, implica a utilização de uma dose consideravelmente maior para atingir uma concentração plasmática terapêutica. Assim, a baixa solubilidade representa um desafio e tem sido descrito que cerca de 40 % de novas entidades químicas, são praticamente insolúveis em água (Savjani, Gajjar, & Savjani, 2012).

Desta forma é importante garantir, através de várias técnicas de formulação, o aumento de solubilidade, dissolução e biodisponibilidade destes fármacos (Zhang, Xing, Zhao, & Ma, 2018). Assim sendo é necessário encontrar formas de permitir aumentar a solubilidade destas substâncias, incorporando estes fármacos em sistemas de veiculação adequados.

Considerando este problema da baixa solubilidade de vários fármacos em água, nos últimos anos os líquidos iônicos (LI) têm vindo a ser explorados como excipientes funcionais com a finalidade de contornar este obstáculo (Balk, Holzgrabe, & Meinel, 2015).

1.4. Líquidos Iônicos

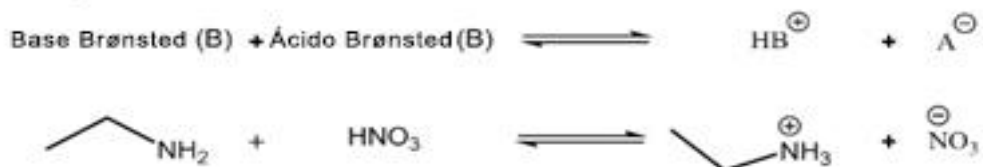
Os LI são conhecidos como sais orgânicos, líquidos quando se encontram a temperaturas abaixo dos 100 °C (Balk et al., 2015; Dobler, Schmidts, Klingenhöfer, & Runkel, 2013; Ferraz, Branco, Prudêncio, Noronha, & Petrovski, 2011; Li, Ma, Zhang, Ling, & Zhang, 2021; Moniruzzaman, Tamura, Tahara, Kamiya, & Goto, 2010), compostos por iões, nomeadamente um catião orgânico, bem como de um anião orgânico ou inorgânico (Dobler et al., 2013; Gouveia et al., 2014). Estes têm uma forte aptidão de dissolver polímeros, compostos inorgânicos e orgânicos (Dobler et al., 2013).

As principais propriedades atribuídas a estes compostos, são as de não serem inflamáveis (Balk et al., 2015), terem um elevado índice de refração (Zandu, Chopra, & Singh, 2020), serem facilmente recicláveis (Ghandi, 2014), terem uma tensão de superfície mais baixa do que a água (Zandu et al., 2020), possuírem baixa pressão de vapor (Balk et al., 2015; Dobler et al., 2013), terem uma elevada condutividade (Moniruzzaman et al., 2010), e elevada estabilidade química (Agatemor, Ibsen, Tanner, & Mitragotri, 2018), maior densidade que a água (1.05 - 1.36 g/cm³) (Zandu et al., 2020) e a sua viscosidade (Gouveia et al., 2014; Wahib, Da'na, Zaouri, Hijji, & Al-Ghouti, 2022).

Os LI podem ser considerados como próticos ou apróticos, sendo referidos como próticos quando são obtidos pela transferência de um protão de um ácido *Brønsted* para uma base *Brønsted*, sendo preparados através de uma reação de neutralização. Por sua vez no caso dos LI apróticos, esta transferência de protões não é possível, uma vez que a natureza dos iões que os constituem, não permitirem tal. Estes LI apróticos são produzidos numa

reação de quaternização, e de seguida por uma troca de aniões (**Figura 1**) (Endres, 2010; Ghandi, 2014; Schalka & Addor, 2008; Silva, Zanatta, Ferreira, Corvo, & Cabrita, 2020).

(A) Líquido Iónico Prótico



(B) Líquido Iónico Aprótico

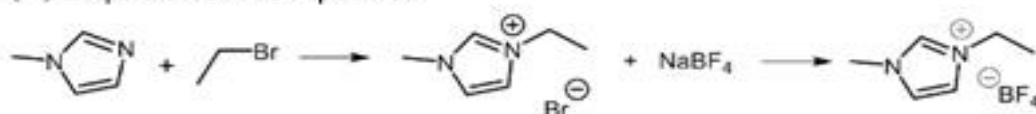


Figura 1 - Vias sintéticas típicas para a obtenção de Líquidos Iónicos próticos e apróticos (Adaptado de W. Silva et al., 2020).

A partir das suas sínteses é possível alterar a estrutura dos LI e consequentemente as suas propriedades, consoante a aplicação pretendida, nomeadamente ao mudar o tipo de aniões e catiões (**Figura 2**) presentes (Balk et al., 2015). Assim, o número de LI com estruturas e com propriedades distintas que se pode preparar é imenso (Egorova, Gordeev, & Ananikov, 2017; Júlio et al., 2018; Silva et al., 2020).

Catiões



Aniões

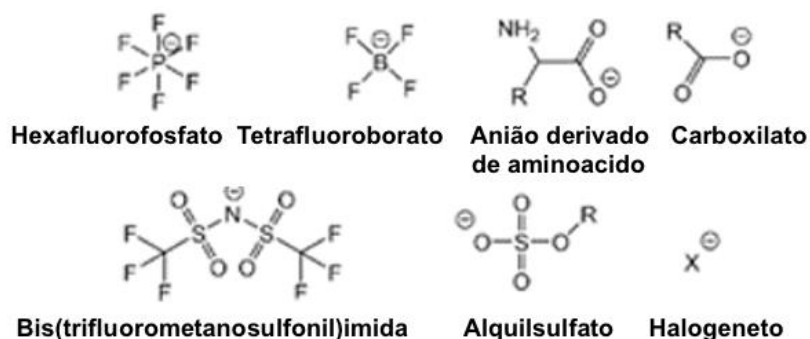


Figura 2 - Iões típicos presentes nos Líquidos Iônicos (Adaptado de W. Silva et al., 2020).

Assim, no que diz respeito à forma como os LI são diferenciados entre si, a sua categorização tem variado ao longo dos tempos, podendo ser classificados de acordo com o tipo de catião presente em cada LI ou organizados em gerações (Correia et al., 2021).

No que diz respeito à sua classificação em gerações (**Figura 3**), esta categorização considera as diferenças nas suas propriedades e estrutura química.



Figura 3 - Gerações de Líquidos Iônicos ao longo do tempo (Adaptado de W. Silva et al., 2020 e MacFarlane et al., 2018).

O primeiro LI reportado, remonta a 1914 (Morton & Hamer, 2018), sendo ele o Nitrato de etilamónio ($[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$), fazendo parte da primeira geração de LI. Esta geração resulta de combinações de cátions dialquilimidazólio e alquilpiridínio com aniões de haleto metálicos. As principais desvantagens descritas para esta geração são a grande instabilidade ao ar e água.

Na sequência das desvantagens apresentadas pela primeira geração de LI, surge a segunda geração que procura corrigir as mesmas. Assim sendo, esta geração possui LI mais estáveis ao ar e água, sendo também muito mais fáceis de lidar que os da primeira geração. Estes foram considerados uma alternativa a solventes orgânicos tóxicos, sendo constituídos na sua maioria pelos cátions diaquilimidazólio, alquilpiridínio, amónio e fosfónio. Relativamente aos aniões, os mais utilizados são os halogenetos, tetrafluoroborato e hexafluorofosfatos. A partir deste ponto, os LI começaram a ser cada vez mais estudados (Morton & Hamer, 2018; Silva et al., 2020).

Surge então de seguida a terceira geração de LI, em que os LI são compostos por iões biodegradáveis e naturais, como a colina e aminoácidos, ou com iões com atividade biológica conhecida. Esta geração é também referida como a geração na qual é possível ajustar as propriedades físico-químicas consoante a aplicação desejada, sendo assim uma geração de elevado interesse científico, particularmente para a sua aplicação na área farmacêutica (Egorova et al., 2017; Santos de Almeida et al., 2017).

Por fim, recentemente foi proposta por MacFarlane e colaboradores, a existência de uma quarta geração de LI, considerando que para além das únicas e importantes propriedades dos LI, estes por vezes não são totalmente previsíveis (MacFarlane et al., 2018), com base na interação que existe entre o solvente e os sais, tal abre as portas a ainda mais possibilidades por parte destes (Gomes, Silva, & Reis, 2019).

Tal como acima referido, em alguns estudos os LI também têm sido divididos em categorias, de acordo com o tipo de catião que o LI tiver, principalmente no que diz respeito aos LI contendo os catiões diaquilimidazólio, N-alquilpiridínio, fosfónio e de amónio quaternário (Ghandi, 2014). No entanto esta divisão já não é tão referida.

No que se refere, aos LI à base de imidazólio, estes estão entre os mais estudados, possuindo baixa viscosidade, capacidade de serem estáveis em situações de oxidação e redução, sendo a sua síntese relativamente fácil (Wang, Luo, Luo, Li, & Dai, 2010). Porém foram relatadas algumas situações em que estes podem não ser completamente seguros (Ghandi, 2014). Estes LI, têm sido bastante estudados como catalisadores em sínteses, como solventes e como promotores de solubilidade. Os LI à contendo o catião piridínio, também demonstraram ser bons catalisadores de algumas reações de síntese de alguns compostos, como a di-hidropiridina por exemplo.

No que diz respeito aos LI contendo o fosfónio estes também têm sido utilizados como catalisadores em diversas reações e por serem mais termoestáveis têm sido muito utilizados a temperaturas superiores a 100 °C (Cao & Alper, 2010).

Relativamente aos LI à base do catião amónio quaternário, estes têm sido descritos como possuindo bioatividade e atividade antimicrobiana e têm sido considerados menos tóxicos, pelo que têm sido muito estudados na área farmacêutica, nomeadamente os LI contendo o catião de colina. Também têm sido bastante usados como eletrólitos, para melhorar a atividade antibiótica e distribuição de fármacos topicamente (Melo, Bogel-Lukasik, Nunes da Ponte, & Bogel-Lukasik, 2013; Santos de Almeida et al., 2017).

Torna-se claro o quanto os LI são interessantes e promissores para a sua aplicação em diversas áreas, nomeadamente na área da saúde, por exemplo ao serem incluídos em sistemas de veiculação. Estes podem ser incorporados em soluções aquosas, bem como oleosas ou ainda hidroalcoólicas, o que é de extrema importância no que toca ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas (Santos de Almeida et al., 2017), principalmente para aumentar a solubilidade de vários fármacos e possivelmente melhorando a sua administração. No entanto, existem alguns estudos, que referem que alguns LI podem ser bastante tóxicos (Egorova et al., 2017) e esta toxicidade deve ser sempre considerada ao definir a quantidade de LI, a ser adicionada para o considerar funcional e seguro. Por este motivo, começam a existir cada vez mais estudos que consideram a toxicidade dos LI antes de estudar a sua incorporação em sistemas de veiculação (Caparica et al., 2020, 2018; Wei et al., 2021)

Adicionalmente, alguns estudos permitiram estudar o impacto positivo dos LI, na permeabilidade, na estabilidade de formulações e na inclusão de fármacos pouco solúveis com interesse farmacológico, como a rutina (Caparica et al., 2020, 2018; Mizuuchi, Jaitely, Murdan, & Florence, 2008; Santos de Almeida et al., 2017). Na sequência de existirem alguns estudos que demonstram o impacto de LI contendo colina para aumentar a solubilidade da rutina, neste trabalho selecionou-se este composto fenólico para ser estudado.

1.5. Rutina

De facto, existem bastantes compostos, com potencial farmacêutico, mas cuja aplicabilidade está comprometida em consequência da sua baixa solubilidade aquosa, o que dificulta a sua incorporação em sistemas de veiculação. A rutina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona-3- ramnoglucosídeo) (**Figura 4**), é um desses exemplos. É um composto polifenólico hidrofóbico, pertencente à família dos flavonoides (Pinzaru et al., 2021), que pode ser encontrado em diversos tipos de plantas, como trigo, tabaco, etc.

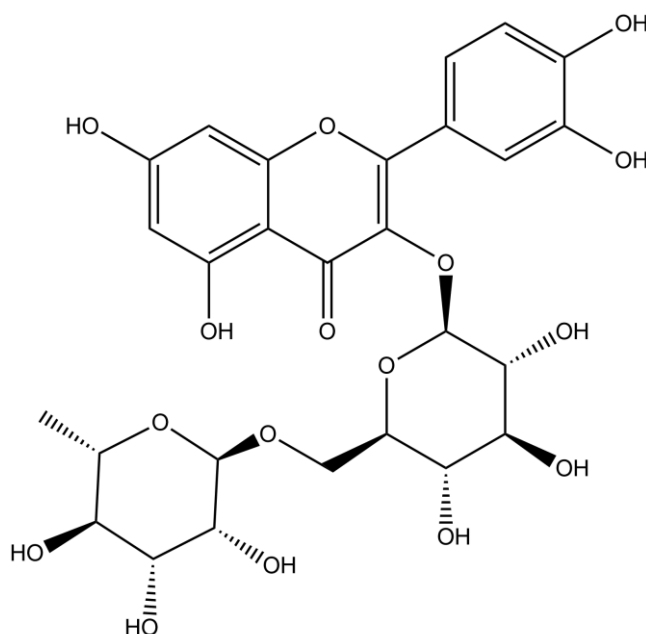


Figura 4 - Estrutura química da Rutina.

Este composto, tem sido descrito como possuindo efeito agregador, cardioprotetor, cito protetor, diurético, neuro protetor, vaso protetor e ainda como possuindo atividade analgésica, antiartrítica, antiasmática, antidiabética, antihipercolesterolêmica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiosteopênicas, antiosteoporóticas, antiplaquetário, antiúlcera, anticancerígena e antioxidante (Caparica et al., 2020; Enogieru, Haylett, Hiss, Bardien, & Ekpo, 2018; Ganeshpurkar & Saluja, 2017; Lins et al., 2021; Nassiri-Asl, Nikfarjam, Adineh, &

Hajiali, 2017; Pinzaru et al., 2021), justificando a relevância de continuar a estudar este composto.

Em particular a capacidade antioxidante e anti-inflamatória, podem ser muito interessantes do ponto de vista de aplicação dirigida à pele, sendo que a este nível tem havido estudos que mostram que a rutina pode ter efeitos benéficos em diversas doenças da pele, como dermatite de contato atópica e alérgica (Choi & Kim, 2013), envelhecimento da pele (Kostyuk et al., 2018), e na psoríase (Pratibha Kumar, 2020). Tal revela que poderia ser interessante incluir a rutina num sistema de veiculação que permita a sua administração na pele.

No entanto, como acima referido, este composto tem solubilidade bastante baixa em água, podendo assim dificultar a sua aplicabilidade (Pedriali, Fernandes, Bernusso, & Polakiewicz, 2008). Neste âmbito, recentemente foram publicados estudos que demonstraram que os líquidos iônicos podem não só aumentar bastante a solubilidade da rutina em água, como permitir uma maior incorporação de rutina em formulações, nomeadamente em emulsões óleo em água (O/A) (Caparica et al., 2018). No entanto, estes tipos de emulsões são termodinamicamente instáveis, relevando a importância de estudar diferentes excipientes e diferentes concentrações, a serem incorporados nessas formulações, para determinar o impacto destes na estabilidade das formulações, tanto na presença como na ausência dos ativos em estudo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi continuar a avaliar como a inclusão de LI em emulsões O/A, preparadas na presença ou ausência de rutina, pode afetar a sua estabilidade, nomeadamente na presença de diferentes percentagens do emulsificante Crodafo® CES na formulação.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes

Relativamente aos ensaios de solubilidade, foram utilizados LI derivados de colina, o (2-hidroxiethyl)-triethylamônio-L-fenilalaninato ou [Cho][Phe] e o glicinato de (2-hidroxiethyl)-triethylamônio ou [Cho][Gly], sintetizados no âmbito do doutoramento de Rita Caparica. Para além disso, foi ainda utilizado rutina da Fagron (São Paulo, Brasil) e água destilada.

Para a produção das emulsões O/A, utilizou-se: Crodafo® CES, álcool cetosteárilico, diacetil fosfato e fosfato de cetet-10, produzido pela Mapric (São Paulo, Brasil), como base lipídica da formulação; água desionizada como veículo; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico da Fagron, (Barcelona, Espanha), funcionando como agente quelante; miristato de isopropilo (MIP), produzido pela Scharlab (Sentmenat, Espanha), como emoliente; um concentrado de parabenos, que funciona como conservante, produzido com metilparabeno e propilparabeno (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), seguindo as normas da Farmacopeia Portuguesa VIII; o polietilenoglicol (PEG) 400 produzido pela PanReac (Barcelona, Espanha), como solubilizante; o propilenoglicol (PG), adquirido na Fagron (Barcelona, Espanha), como humectante; o butil hidroxitolueno (BHT), produzido pela Mapric (São Paulo, Brasil); e a trietanolamina de José Vaz Pereira (Lisboa, Portugal), para ajuste do pH, no final da formulação da emulsão.

2.2. Estudos de Solubilidade

Com o intuito de realizar os estudos de solubilidade, avançou-se com a saturação com rutina das soluções apenas com água como solvente e das soluções contendo água e cada um dos LI, [Cho][Gly] a 0,5 % m/m ou [Cho][Phe] a 0,2 % m/m. As percentagens de LI incorporadas correspondem à percentagem máxima de cada LI que permitiu a manutenção da viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCaT) de acordo com os resultados obtidos no âmbito do Doutoramento da doutoranda Rita Caparica. As soluções saturadas

foram colocadas em agitação, durante 72 h a 25 °C. Seguidamente, para retirar o excesso de soluto, todas as soluções foram então filtradas e, posteriormente, analisadas num espectrofotómetro de UV-visível Evolution (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra), ao comprimento de onda de absorção máxima da rutina, 353 nm.

2.3. Análise estatística

Para os estudos de solubilidade, as diferenças nas médias dos resultados obtidos foram avaliadas estatisticamente por ANOVA (análise de variância simples) e depois pelo método de comparação múltipla de Tukey. Os resultados que apresentavam diferenças estatísticas entre as médias individuais foram significativos com ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Todos os valores encontram-se expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) e as análises realizadas utilizando GraphPad Prism 5® by GraphPad Software, EUA.

2.4. Preparação das Emulsões óleo em água (O/A)

As emulsões O/A que foram desenvolvidas encontram a sua composição qualitativa e quantitativa descrita nas **Tabelas 1, 2 e 3**. Sendo que para a sua preparação foram pesadas isoladamente a fase oleosa e a fase aquosa, que de seguida foram colocadas num banho aquecido a 65 °C (Memmert®, Büchenbach, Alemanha). Desta forma, a fase oleosa funde e ocorre um equilíbrio na temperatura das duas fases, que permita que, ainda no banho, a fase aquosa seja adicionada à oleosa, sempre mantendo uma agitação energética da mistura. Prontamente, a mistura é removida do banho, continuando-se a agitação até atingir a TA, e dessa forma se verificar a obtenção de uma emulsão homogénea.

Tabela 1 - Composição qualitativa e quantitativa (% m/m) para todas as emulsões O/A contendo 3 % de Crodafo[®] CES e preparadas sem ou com Rutina e sem ou com cada Líquidos Iônicos.

Composição (% m/m)	Emulsão O/A					
	Sem Rutina			Com Rutina		
	Sem LI	Com [Cho][Phe]	Com [Cho][Gly]	Sem LI	Com [Cho][Phe]	Com [Cho][Gly]
Crodafos [®] CES	3	3	3	3	3	3
MIP	2	2	2	2	2	2
BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
EDTA Dissódico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
PG	5	5	5	5	5	5
PEG 400	5	5	5	5	5	5
Concentrado de Parabenos	1	1	1	1	1	1
Rutina	-	-	-	0,016	0,016	0,016
LI	-	0,2	0,5	-	0,2	0,5
Trietanolamina			q.b para pH = 5			
Água deionizada			q.b para 100			

Tabela 2 - Composição qualitativa e quantitativa (% m/m) para todas as emulsões O/A contendo 3,5 % de Crodafo[®] CES e preparadas sem ou com Rutina e sem ou com cada Líquidos Iônicos.

Composição (% m/m)	Emulsão O/A					
	Sem Rutina			Com Rutina		
	Sem LI	Com [Cho][Phe]	Com [Cho][Gly]	Sem LI	Com [Cho][Phe]	Com [Cho][Gly]
Crodafos [®] CES	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
MIP	2	2	2	2	2	2
BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
EDTA Dissódico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
PG	5	5	5	5	5	5
PEG 400	5	5	5	5	5	5
Concentrado de Parabenos	1	1	1	1	1	1
Rutina	-	-	-	0,016	0,016	0,016
LI	-	0,2	0,5	-	0,2	0,5
Trietanolamina			q.b para pH = 5			
Água deionizada			q.b para 100			

Tabela 3 - Composição qualitativa e quantitativa (% m/m) para todas as emulsões O/A contendo 4 % de Crodafo[®] CES e preparadas sem ou com Rutina e sem ou com cada Líquidos Iônicos.

Composição (% m/m)	Emulsão O/A					
	Sem Rutina			Com Rutina		
	Sem LI	Com [Cho][Phe]	Com [Cho][Gly]	Sem LI	Com [Cho][Phe]	Com [Cho][Gly]
Crodafos [®] CES	4	4	4	4	4	4
MIP	2	2	2	2	2	2
BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
EDTA Dissódico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
PG	5	5	5	5	5	5
PEG 400	5	5	5	5	5	5
Concentrado de Parabenos	1	1	1	1	1	1
Rutina	-	-	-	0,016	0,016	0,016
LI	-	0,2	0,5	-	0,2	0,5
Trietanolamina			q.b para pH = 5			
Água deionizada			q.b para 100			

2.5. Estabilidade preliminar

As características organoléticas e a viscosidade de todas as emulsões O/A desenvolvidas foram avaliadas ao tempo inicial. Para além disso, as formulações foram seguidamente sujeitas a estudos de estabilidade preliminar, nomeadamente aos testes de aquecimento gradual e de centrifugação.

2.5.1. Teste de aquecimento gradual ou de stress térmico

Para proceder a este teste, foram pesados 5,0 g de cada emulsão (n=3) para *falcons*, que de seguida foram introduzidos num banho termostatzado, à temperatura inicial de 40 °C. As amostras foram sujeitas a um aquecimento gradual até 80 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C por cada 30 minutos. No final do aquecimento, as amostras foram avaliadas relativamente há existência ou não de separação de fases (fenómeno de instabilidade).

2.5.2. Teste de centrifugação

Relativamente ao teste da centrifugação, pesou-se 5,0 g de cada formulação (n=3) que foram centrifugadas durante um período de 30 minutos a $7200 \times g$, a 25 ± 2 °C. Após a centrifugação, foi avaliado se as amostras apresentavam ou não separação de fases (fenómeno de instabilidade).

2.5.3. Ciclos de Temperatura

Relativamente aos ciclos de temperatura, cada formulação (n=3), foi submetida a 6 ciclos sucessivos de temperatura em que cada ciclo corresponde ao arrefecimento, a -5 °C, durante 24h, seguido de aquecimento, a 45 °C, também durante 24h.

2.6. Estabilidade Acelerada e armazenamento (*shelf life*)

As formulações (n = 3) foram submetidas a duas condições diferentes, aquecimento na estufa (40 ± 2 °C) e arrefecimento no frigorífico (5 ± 2 °C), por 3 e 6 meses, com o objetivo de avaliar como as emulsões se comportavam em condições extremas.

Adicionalmente, para que seja possível avaliar o comportamento das emulsões em condições normais de armazenamento, as mesmas (n=3) foram armazenadas à TA por períodos de tempo pré-definidos (3 e 6 meses), analisando-se assim a sua estabilidade e armazenamento.

Ao longo do tempo e em todas as condições de análise, foram analisadas as propriedades organoléticas (cor, odor e aparência), os parâmetros físico-químicos (pH e viscosidade) e a viscosidade de todas as formulações. A viscosidade foi avaliada usando o RVDV-I + viscosímetro, BROOKFIELD® (Middleboro, Massachusetts, EUA).

3. Resultados e discussão

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar qual o impacto, da incorporação de LI em emulsões O/A contendo rutina, nomeadamente na estabilidade das formulações preparadas. Para este efeito, começou-se por avaliar o impacto dos LI estudados na solubilidade da Rutina para posteriormente considerar esses resultados para a incorporação da rutina nas formulações preparadas.

3.1. Estudos de Solubilidade

A análise da solubilidade da rutina, foi efetuada em água, e em misturas de água com cada um dos dois LI em estudo ([Cho][Gly] ou [Cho][Phe]), a 25 °C. No caso do [Cho][Gly], usou-se uma concentração de 0,5 % deste LI, e no caso do [Cho][Phe], uma concentração de 0,2 %, pois são as percentagens máximas onde se sabe que é mantida a viabilidade celular na presença de cada um dos LI usados (Caparica et al., 2018).

Respeitante aos resultados da solubilidade (**Tabela 4**), relativamente ao ensaio em água o valor obtido para a solubilidade da rutina foi de $0,22 \pm 0,01$ mg/mL, estando de acordo com o resultado publicado de 0,20 mg/mL (Caparica et al., 2018). Relativamente à solubilidade da rutina nas misturas de água com cada um dos LI estudados, os resultados revelaram, que com ambos os LI, a solubilidade da rutina aumenta (**Tabela 4**). Este aumento é observado na presença dos dois LI, mesmo no caso do [Cho][Phe], que se incorporou numa concentração inferior (0,2 % m/m), e para o qual foi possível observar um aumento na solubilidade da rutina em cerca de 7 vezes. Este aumento está relativamente de acordo com o descrito anteriormente na literatura (Caparica, 2017). No que diz respeito ao LI [Cho][Gly], que foi incluído numa maior percentagem (0,5 % m/m), este permitiu um aumento superior na solubilidade da rutina e na ordem de 13 vezes superior, comparativamente com a sua solubilidade em água.

Tabela 4 - Solubilidade da Rutina em água ou nas misturas água: Líquidos Iônicos, 99.5:0.5 [Cho][Gly] e 99.8:0.2 [Cho][Phe], n=3, média $\pm$ DP. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA a um fator, teste de Tukey, comparado com a solubilidade em água).

Solvente	Solubilidade, mg/mL	
	Experimental	Literatura
Água (100%)	0,22 $\pm$ 0,01	0,20 (Caparica et al., 2018)
Água: [Cho][Phe] (99,8:0,2)	1,51 $\pm$ 0,05 **	1,15 (Caparica et al., 2018)
Água: [Cho][Gly] (99,5:0,5)	2,92 $\pm$ 0,76 ***	-

3.2 Preparação das emulsões O/A

Após demonstrado o aumento da solubilidade da rutina na presença dos LI, as emulsões O/A foram desenvolvidas na presença e ausência da substância ativa em estudo e/ou contendo ou não cada um dos LI. Para este fim, várias formulações, com percentagens diferentes de Crodafo® CES foram desenvolvidas, para tentar entender como estes diferentes compostos afetam a estabilidade da emulsão desenvolvida.

No que diz respeito à incorporação da rutina nas formulações, esta foi incorporada na concentração máxima em que esta é solúvel em água a 25 °C (0,2 mg/mL). De salientar, que no que diz respeito ao desenvolvimento destas formulações, a sua preparação, nomeadamente a homogeneização das emulsões é mais fácil e rápida na presença dos LI do que na sua ausência. Este fator, indica que os LI poderão ter um papel determinante no aumento da miscibilidade dos diversos componentes das formulações.

Após desenvolvimento de todas as formulações procedeu-se então à avaliação das suas propriedades organoléticas, viscosidade e estabilidade preliminar.

3.3 Propriedades organoléticas e viscosidades

Quanto às propriedades organoléticas das formulações desenvolvidas após preparação e antes de efetuar os estudos de estabilidade, foi possível observar que todas as formulações tinham um aspeto cremoso e que as formulações na ausência de rutina apresentaram todas uma coloração branca. Por sua vez as formulações contendo rutina

apresentaram uma cor amarelada, característica da presença do ativo que apresenta esta tonalidade (**Figura 5**). De salientar que as emulsões contendo os LI, apresentaram uma homogeneidade superior, comparativamente com as emulsões na ausência destes sais, indicando que os LI poderão promover uma melhor mistura dos componentes da formulação e permitindo assim a obtenção de formulações com um aspeto mais cremoso e consequentemente visualmente mais apelativas. Adicionalmente, foi possível observar que as formulações contendo os LI, além de mais homogêneas aparentavam ser mais viscosas.

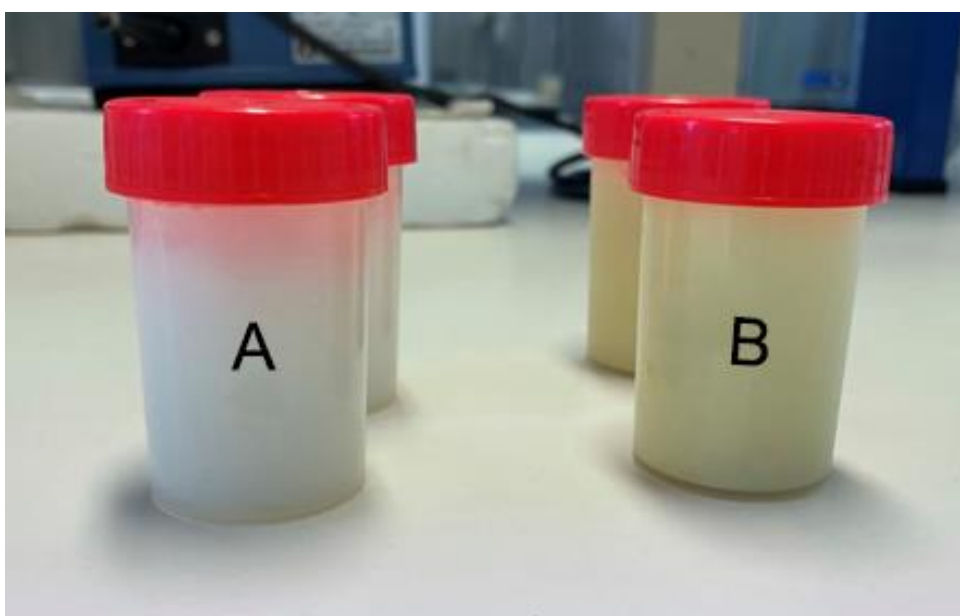


Figura 5 - Aparência macroscópica das formulações (A) - na ausência de Rutina e (B) - na presença de Rutina.

Estes resultados de observação qualitativa foram comprovados na avaliação da viscosidade de todas as formulações desenvolvidas (**Tabelas 5 e 6**). De facto, tanto na ausência como na presença de ativo foi possível verificar uma maior viscosidade das formulações na presença dos LI, indicando que os LI estudados contribuem para o aumento da viscosidade das formulações (**Tabela 6**), o que é bastante relevante, uma vez que este aumento de viscosidade pode reduzir a mobilidade das gotículas da emulsão e assim evitar a separação de fases, por impedir a coalescência das mesmas. Também ao nível de propriedades sensoriais, este aumento de viscosidade pode ser relevante, uma vez que para

além de poder aumentar a estabilidade da formulação, também pode tornar a formulação mais agradável para o consumidor final.

Tabela 5 - Viscosidade das emulsões O/A na ausência de Rutina após formulação (n=3).

% Crodafo [®] CES	LI	Tempo Zero
		Viscosidade (mPas)
3	-	4067 ± 208
	[Cho][Phe]	12267 ± 251,7
	[Cho][Gly]	9367 ± 436,8
3,5	-	4583 ± 76,4
	[Cho][Phe]	12500 ± 200
	[Cho][Gly]	11250 ± 250
4	-	12387 ± 400,7
	[Cho][Phe]	15633 ± 321,6
	[Cho][Gly]	17250 ± 250

Tabela 6 - Viscosidade das emulsões O/A na presença de Rutina após formulação (n=3).

% Crodafo [®] CES	LI	Tempo Zero
		Viscosidade (mPas)
3	-	4250 ± 250
	[Cho][Phe]	12800 ± 264,6
	[Cho][Gly]	9930 ± 112,7
3,5	-	5150 ± 304
	[Cho][Phe]	13000 ± 100
	[Cho][Gly]	11593 ± 179
4	-	13120 ± 130,6
	[Cho][Phe]	16017 ± 76,4
	[Cho][Gly]	17093 ± 369

De seguida, foi pertinente avaliar a estabilidade de todas as formulações desenvolvidas, com o intuito de comprovar se as emulsões preparadas seriam todas estáveis e principalmente, para avaliar se a incorporação dos LI, teriam algum impacto nessa estabilidade. Para isso, foram efetuados estudos de estabilidade preliminar.

3.4 Estabilidade Preliminar

Nos estudos de estabilidade e no que se refere às formulações na ausência de rutina (**Tabela 7**) e contendo diferentes percentagens de Crodafo[®] CES, os dados estão concordantes com os dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo no âmbito da dissertação de mestrado de Telma Rodrigues (dados ainda não publicados) onde se verificou que usando apenas 3% de Crodafo[®] CES, nenhuma das formulações foi estável, observando-se separação de fases para todas as emulsões preparadas.

Adicionalmente, observou-se mais uma vez que na presença dos LI é possível obter formulações estáveis na presença de 3,5 % de Crodafo[®] CES, enquanto a esta percentagem, mas na ausência dos LI a formulação desenvolvida não é estável.

Tabela 7 - Resultados do estudo de estabilidade preliminar das emulsões O/A na ausência de Rutina. Os valores da viscosidade foram medidos após 6 ciclos de temperatura (a -5 °C e 45 °C) (n=3).

% Crodafo [®] CES	LI	Centrifugação	Aquecimento Gradual	Viscosidade(mPas) depois de 6 Ciclos de Temperatura
3	- [Cho][Phe] [Cho][Gly]	Instável	Instável	-
3,5	- [Cho][Phe] [Cho][Gly]	Instável Estável	Instável Estável	- 13203 ± 50 17117 ± 76
4	- [Cho][Phe] [Cho][Gly]	Estável	Estável	14299 ± 40 17566 ± 114 18579 ± 153

Tendo em conta estes resultados promissores, pretendia-se no presente estudo avaliar se ao incorporar o ativo se observaria a mesma capacidade por parte dos LI de estabilizar as formulações desenvolvidas. De facto, os resultados obtidos neste estudo permitiram demonstrar este efeito, como se pode ver pelos dados apresentados na **Tabela 8**.

Assim, foi possível verificar que, à percentagem de 3,5 % de Crodafos® CES, ao incorporar a rutina as formulações na ausência dos LI, estas não são estáveis, apresentando separação de fase após a realização dos testes de *stress* térmico e de centrifugação.

Por sua vez, na presença dos LI foi possível incorporar não só incorporar maiores quantidades de rutina, como também obter formulações estáveis.

Tabela 8 - Resultados do estudo de estabilidade preliminar das emulsões O/A na presença de Rutina (n=3). Os valores da viscosidade foram medidos após 6 ciclos de temperatura (a -5 °C e 45 °C) (n=3).

% Crodafos® CES	LI	Centrifugação	Aquecimento Gradual	Viscosidade(mPas) depois de 6 Ciclos de Temperatura
3	- [Cho][Phe] [Cho][Gly]	Instável	Instável	-
3,5	- [Cho][Phe] [Cho][Gly]	Instável Estável	Instável Estável	- 16842 ± 129 16265 ± 59
4	- [Cho][Phe] [Cho][Gly]	Estável	Estável	15052 ± 42 17150 ± 26 17995 ± 8

Assim, este estudo indica que a presença de LI nas emulsões permite não só obter formulações mais estáveis, tanto na presença, como na ausência de rutina, permitindo a utilização de menores quantidades de agente emulsificante, além de possibilitar uma melhor miscibilidade dos componentes das emulsões aquando da sua preparação, ao mesmo tempo que permite incorporar maiores quantidades do ativo em estudo.

3.5 Estabilidade Acelerada e armazenamento (*shelf life*)

Por fim, procedeu-se à avaliação do impacto dos LI utilizados, ao longo de 90 e de 180 dias. As formulações foram assim submetidas a aquecimento em estufa (40 ± 2 °C) e arrefecimento no frigorífico (5 ± 2 °C). Foram também armazenadas amostras de todas as emulsões à TA para avaliar a estabilidade e armazenamento. No final dos 90 (Tabelas 9 e 10) e 180 dias, foram avaliadas as propriedades organoléticas das amostras, tal como o pH e viscosidade (Tabelas 11 e 12).

Tabela 9 - Resultados dos estudos de estabilidade e teste de armazenamento das emulsões O/A na ausência de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 3 meses na estufa (40 ± 2 °C), no frigorífico (5 ± 2 °C), ou à TA ($n=3$).

% Crodafos® CES	LI	Estabilidade Acelerada		Teste de Armazenamento
		Aquecimento na estufa	Arrefecimento no frigorífico	Viscosidade (mPas)
	-	-	-	-
3,5	[Cho][Phe]	9112 $\pm$ 106	7844 $\pm$ 56	7236 $\pm$ 17
	[Cho][Gly]	12773 $\pm$ 109	12425 $\pm$ 120	13215 $\pm$ 1
	-	12853 $\pm$ 52	12458 $\pm$ 105	14232 $\pm$ 21
4	[Cho][Phe]	17873 $\pm$ 23	15750 $\pm$ 107	16416 $\pm$ 14
	[Cho][Gly]	18950 $\pm$ 49	17883 $\pm$ 22	16851 $\pm$ 61

Tabela 10 - Resultados dos estudos de estabilidade e teste de armazenamento das emulsões O/A na presença de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 3 meses na estufa (40 ± 2 °C), no frigorífico (5 ± 2 °C), ou à TA ($n=3$).

% Crodafos® CES	LI	Estabilidade Acelerada		Teste de Armazenamento
		Aquecimento na estufa	Arrefecimento no frigorífico	Viscosidade (mPas)
	-	-	-	-
3,5	[Cho][Phe]	12420 $\pm$ 105	13347 $\pm$ 197	12356 $\pm$ 14
	[Cho][Gly]	13917 $\pm$ 53	14822 $\pm$ 143	13789 $\pm$ 167
	-	14193 $\pm$ 50	14671 $\pm$ 138	12669 $\pm$ 14
4	[Cho][Phe]	16311 $\pm$ 115	16476 $\pm$ 51	15947 $\pm$ 44
	[Cho][Gly]	16736 $\pm$ 55	16914 $\pm$ 64	17878 $\pm$ 46

Tabela 11 - Resultados dos estudos de estabilidade e teste de armazenamento das emulsões O/A na ausência de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 6 meses na estufa (40 ± 2 °C), no frigorífico (5 ± 2 °C), ou à TA ($n=3$).

% Crodafos® CES	LI	Estabilidade Acelerada		Teste de Armazenamento
		Aquecimento na estufa	Arrefecimento no frigorífico	Viscosidade (mPas)
	-	-	-	-
3,5	[Cho][Phe]	10229 ± 10	8756 ± 14	7657 ± 28
	[Cho][Gly]	13259 ± 17	12382 ± 63	13546 ± 23
	-	13205 ± 37	12552 ± 98	14399 ± 41
4	[Cho][Phe]	18920 ± 41	16512 ± 29	16848 ± 47
	[Cho][Gly]	19016 ± 7	18626 ± 148	17128 ± 10

Tabela 12 - Resultados dos estudos de estabilidade acelerada após 6 meses na estufa (40 ± 2 °C) e teste de armazenamento das emulsões O/A na presença de Rutina. Os valores de viscosidade foram obtidos após 180 dias na estufa (40 ± 2 °C), no frigorífico (5 ± 2 °C), ou à TA ($n=3$).

% Crodafos® CES	LI	Estabilidade Acelerada		Teste de Armazenamento
		Aquecimento na estufa	Arrefecimento no frigorífico	Viscosidade (mPas)
	-	-	-	-
3,5	[Cho][Phe]	13347 ± 10	13347 ± 10	12668 ± 18
	[Cho][Gly]	14822 ± 17	14822 ± 17	14063 ± 35
	-	14671 ± 37	14671 ± 37	12948 ± 45
4	[Cho][Phe]	16476 ± 41	16476 ± 41	16033 ± 18
	[Cho][Gly]	16914 ± 7	16914 ± 7	18054 ± 43

Foi então possível verificar, que na presença dos LI, tanto as formulações sem rotina (**Tabela 9 e 11**), como as formulações contendo este composto fenólico (**Tabela 10 e 12**), não apresentaram quaisquer sinais de instabilidade. Tal sugere, que os LI, não só favorecem a estabilidade das formulações após a sua formulação, bem como, após serem submetidas a condições extremas decorrentes dos estudos de estabilidade, ao longo de 6 meses. No que à viscosidade diz respeito, foi possível verificar que este manteve a tendência já observada

nos estudos de estabilidade preliminar, mostrando que a estabilidade se manteve ao longo do tempo.

Deste modo, este trabalho demonstrou que os LI permitem facilitar o processo de formulação e aumentar a estabilidade das emulsões desenvolvidas, quer na ausência ou na presença de ativo, bem como possibilitar a utilização de uma menor concentração de emulsificante na formulação.

4. Conclusão

No âmbito deste trabalho avaliou-se a influência de dois LI, o [Cho][Gly] e o [Cho][Phe], na estabilidade de emulsões O/A contendo rutina e percentagens distintas do emulsificante, o Crodafo[®] CES. Inicialmente procedeu-se a estudos de solubilidade da rutina na presença dos LI em estudo e os resultados demonstraram que ambos os LI aumentam a solubilidade da rutina e os resultados reforçaram a capacidade dos LI para melhorar a solubilidade da rutina.

De seguida, foram então preparadas emulsões O/A na ausência e presença de rutina e/ou de cada um dos LI estudados e foi efetuada a estabilidade preliminar de todas as emulsões. Os resultados obtidos indicaram que a presença dos LI permitiu uma estabilidade superior das formulações desenvolvidas, possibilitando a utilização de uma menor percentagem de Crodafo[®] CES. Em particular, nas formulações contendo 3,5% de Crodafo[®] CES, onde unicamente as formulações contendo LI mostraram ser estáveis, quer na ausência quer na presença de rutina, quando comparadas com as formulações sem LI e também após serem submetidas a condições extremas decorrentes dos estudos de estabilidade, ao longo de 3 e 6 meses.

Assim, os presentes resultados sugerem não só que os LI podem ser úteis para melhorar a solubilidade da rutina em água e a sua incorporação em emulsões O/A, tal como descrito na literatura, mas indicam ainda que estes sais poderão ser úteis para facilitar a formulação e estabilizar as emulsões O/A desenvolvidas, permitindo nomeadamente a utilização de uma concentração menor de emulsificante.

Seria relevante de futuro continuar a avaliar a estabilidade destas emulsões O/A, nomeadamente na presença de outros ativos, bem como analisar como os LI poderão influenciar a estabilidade de outros sistemas de veiculação.

5. Bibliografia

- Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, 26(19), 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
- Agatemor, C., Ibsen, K. N., Tanner, E. E. L., & Mitragotri, S. (2018). Ionic liquids for addressing unmet needs in healthcare. *Bioengineering & Translational Medicine*, 3(1), 7–25. <https://doi.org/10.1002/btm2.10083>
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5665), 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>
- Angardi, V., Ettehadi, A., & Yücel, Ö. (2022). Critical Review of Emulsion Stability and Characterization Techniques in Oil Processing. *Journal of Energy Resources Technology*, 144(4). <https://doi.org/10.1115/1.4051571>
- ANVISA. (2005). *Quality in Cosmetics* (Vol. 1). National Health Surveillance Agency.
- Arora, V., Kumar, P., & Sharma, R. (2015). Emulgels: a Review for Topical Drug Delivery of Hydrophobic Drugs. *International Journal Of Pharma Professional's Research*, 6(3), 1256–1263.
- Balk, A., Holzgrabe, U., & Meinel, L. (2015). 'Pro et contra' ionic liquid drugs – Challenges and opportunities for pharmaceutical translation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.027>
- Brown, M. B., Martin, G. P., Jones, S. A., & Akomeah, F. K. (2006). Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery*, 13(3), 175–187. <https://doi.org/10.1080/10717540500455975>
- Cao, H., & Alper, H. (2010). Palladium-Catalyzed Double Carbonylation Reactions of o - Dihaloarenes with Amines in Phosphonium Salt Ionic Liquids. *Organic Letters*, 12(18), 4126–4129. <https://doi.org/10.1021/ol101714p>

- Caparica, R. (2017). Applicability of Ionic Liquids in Topical Drug Delivery Systems: A Mini Review. *Journal of pharmacology & clinical research*, 4(5).
<https://doi.org/10.19080/JPCR.2018.04.555649>
- Caparica, R., Júlio, A., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., Fonte, P., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2020). Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules*, 10(2), 233. <https://doi.org/10.3390/biom10020233>
- 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>
- Choi, J. K., & Kim, S. H. (2013). Rutin suppresses atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Experimental Biology and Medicine*, 238(4), 410–417.
<https://doi.org/10.1177/1535370213477975>
- Correia, D. M., Fernandes, L. C., Fernandes, M. M., Hermenegildo, B., Meira, R. M., Ribeiro, C., ... Lanceros-Méndez, S. (2021). Ionic Liquid-Based Materials for Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 11(9), 2401. <https://doi.org/10.3390/nano11092401>
- Dobler, D., Schmidts, T., Klingenhöfer, I., & Runkel, F. (2013). Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1–2), 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.035>
- Edman, P. (1994). Pharmaceutical Formulations— Suspensions and Solutions. *Journal of Aerosol Medicine*, 7(s1), S-3-S-6. https://doi.org/10.1089/jam.1994.7.Suppl_1.S-3
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017). Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132–7189. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>
- Endres, F. (2010). Physical chemistry of ionic liquids. *Physical chemistry chemical physics* :

- PCCP, 12(8), 1648. <https://doi.org/10.1039/c001176m>
- Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., & Ekpo, O. E. (2018). Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
- Ferraz, R., Branco, L. C., Prudêncio, C., Noronha, J. P., & Petrovski, Z. (2011). Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients. *ChemMedChem*, 6(6), 975–985. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100082>
- Fredrick, E., Walstra, P., & Dewettinck, K. (2010). Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 153(1–2), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2009.10.003>
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025>
- Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *Green and Sustainable Chemistry*, 04(01), 44–53. <https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008>
- Gilhotra, R. M., Ikram, M., Srivastava, S., & Gilhotra, N. (2014). A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *Journal of Biomedical Research*, 28(2), 81–97. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20120136>
- 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>
- Goodarzi, F., & Zendejboudi, S. (2019). A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(1), 281–309. <https://doi.org/10.1002/cjce.23336>
- 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>
- Grassin-Delye, S., Buenestado, A., Naline, E., Faisy, C., Blouquit-Laye, S., Couderc, L.-J., ... Devillier, P. (2012). Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacology & therapeutics*, 134(3), 366–379. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.003>
- Habet, K. A., Kolli, S. S., Pona, A., & Feldman, S. R. (2019). A review of topical corticosteroid sprays for the treatment of inflammatory dermatoses. *Dermatology Online Journal*, 25(8). <https://doi.org/10.5070/D3258045123>
- Hill, N. S., Preston, I. R., & Roberts, K. E. (2015). Inhaled therapies for pulmonary hypertension. *Respiratory Care*, 60(6), 794–802. <https://doi.org/10.4187/respcare.03927>
- Hua, S. (2019). Advances in nanoparticulate drug delivery approaches for sublingual and buccal administration. *Frontiers in Pharmacology*, 10(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01328>
- Iqbal, Z., & Dilnawaz, F. (2019). Nanocarriers For Vaginal Drug Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 13(1), 3–15. <https://doi.org/10.2174/18722211313666190215141507>
- Jacob, S., Nair, A. B., Boddu, S. H. S., Gorain, B., Sreeharsha, N., & Shah, J. (2021). An Updated Overview of the Emerging Role of Patch and Film-Based Buccal Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 13(8), 1206. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081206>
- Jain, K. K. (2020). An Overview of Drug Delivery Systems. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2059, 1–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_1
- Júlio, A., Antunes, C., Mineiro, R., Raposo, M., Caparica, R., M. Araújo, M. E., ... Santos de Almeida, T. (2018). Influence of two choline-based ionic liquids on the solubility of caffeine. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(1), 96–102.

<https://doi.org/10.19277/BBR.15.1.178>

- Kaminsky, B. M., Bostwick, J. R., & Guthrie, S. K. (2015). Alternate Routes of Administration of Antidepressant and Antipsychotic Medications. *Annals of Pharmacotherapy*, 49(7), 808–817. <https://doi.org/10.1177/1060028015583893>
- Kawamoto, M., Matsuda, T., & Ito, Y. (2018). Photochemical Processed Materials. Em *Photochemistry for Biomedical Applications* (pp. 25–50). https://doi.org/10.1007/978-981-13-0152-0_2
- Korani, S., Bahrami, S., Korani, M., Banach, M., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2019). Parenteral systems for statin delivery: A review. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1139-8>
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Albuhaydar, A. R., Mayer, W., De Luca, C., & Korkina, L. (2018). Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. *Rejuvenation Research*, 21(2), 91–101. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1931>
- Kovács, A., Csóka, I., Kónya, M., Csányi, E., Fehér, A., & Erős, I. (2005). Structural analysis of w/o/w multiple emulsions by means of DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 82(2), 491–497. <https://doi.org/10.1007/s10973-005-0922-0>
- Ku, M. S. (2008). Use of the Biopharmaceutical Classification System in Early Drug Development. *The AAPS Journal*, 10(1), 208–212. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9020-0>
- Lam, J. K. W., Cheung, C. C. K., Chow, M. Y. T., Harrop, E., Lapwood, S., Barclay, S. I. G., & Wong, I. C. K. (2020). Transmucosal drug administration as an alternative route in palliative and end-of-life care during the COVID-19 pandemic. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 160(January), 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.10.018>
- Lane, J. C., & Guimarães, H. P. (2008). Acesso venoso pela via intra-óssea em urgências

- médicas. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 20(1), 63–67.
<https://doi.org/10.1590/s0103-507x2008000100010>
- Li, X., Ma, N., Zhang, L., Ling, G., & Zhang, P. (2021). Applications of Choline-based Ionic Liquids in Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 121366.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121366>
- Light, K., & Karboune, S. (2021). Emulsion, hydrogel and emulgel systems and novel applications in cannabinoid delivery: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–31. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1926903>
- Lins, T. L. B. G., Barberino, R. S., Monte, A. P. O., Pinto, J. G. C., Campinho, D. S. P., Palheta, R. C., & Matos, M. H. T. (2021). Rutin promotes activation and reduces apoptosis of primordial follicles by regulating Akt phosphorylation after in vitro culture of ovine ovarian tissue. *Theriogenology*, 173(2), 64–72.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.018>
- MacFarlane, D. R., Chong, A. L., Forsyth, M., Kar, M., Vijayaraghavan, R., Somers, A., & Pringle, J. M. (2018). New dimensions in salt–solvent mixtures: a 4th evolution of ionic liquids. *Faraday Discussions*, 206, 9–28. <https://doi.org/10.1039/C7FD00189D>
- Malamed, S. F. (2010). Sublingual, Transdermal, and Intranasal Sedation. Em S. F. Malamed (Ed.), *Sedation* (5.^a ed., pp. 124–131). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-05680-9.00011-4>
- Marquez, R., Forgiarini, A. M., Langevin, D., & Salager, J.-L. (2018). Instability of Emulsions Made with Surfactant–Oil–Water Systems at Optimum Formulation with Ultralow Interfacial Tension. *Langmuir*, 34(31), 9252–9263.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01376>
- Mayba, J. N., & Gooderham, M. J. (2018). A Guide to Topical Vehicle Formulations. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 22(2), 207–212.

<https://doi.org/10.1177/1203475417743234>

Melo, C. I., Bogel-Lukasik, R., Nunes da Ponte, M., & Bogel-Lukasik, E. (2013). Ammonium ionic liquids as green solvents for drugs. *Fluid Phase Equilibria*, 338(3), 209–216.

<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2012.11.029>

Mizuuchi, H., Jaitely, V., Murdan, S., & Florence, A. T. (2008). Room temperature ionic liquids and their mixtures: Potential pharmaceutical solvents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(4–5), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.01.002>

Moniruzzaman, M., Tamura, M., Tahara, Y., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: Characterization and cytotoxicity evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 400(1–2), 243–250.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.034>

Morton, M. D., & Hamer, C. K. (2018). Ionic liquids – The beginning of the end or the end of the beginning? – A look at the life of ionic liquids through patent claims. *Separation and Purification Technology*, 196, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.023>

Nassiri-Asl, M., Nikfarjam, B. A., Adineh, M., & Hajiali, F. (2017). Treatment with Rutin - A Therapeutic Strategy for Neutrophil-Mediated Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Journal of Pharmacopuncture*, 20(1), 52–56. <https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.003>

Patel, V. F., Liu, F., & Brown, M. B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 153(2), 106–116.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.027>

Pedriali, C. A., Fernandes, A. U., Bernusso, L. D. C., & Polakiewicz, B. (2008). The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. *Química Nova*, 31(8), 2147–2151. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800039>

Pinzaru, I., Tanase, A., Enatescu, V., Coricovac, D., Bociort, F., Marcovici, I., ... Dehelean, C. (2021). Proniosomal Gel for Topical Delivery of Rutin: Preparation, Physicochemical

- Characterization and In Vitro Toxicological Profile Using 3D Reconstructed Human Epidermis Tissue and 2D Cells. *Antioxidants*, 10(1), 85.
<https://doi.org/10.3390/antiox10010085>
- Pratibha Kumar, D. V. V. and G. S. (2020). Formulation and Development of Rutin and Gallic Acid Loaded Herbal Gel for The Treatment of Psoriasis and Skin Disease. *Journal of Science and Technology*, 5(5), 191–203.
- Rosen, J., Landriscina, A., & Friedman, A. J. (2014). Principles and approaches for optimizing therapy with unique topical vehicles. *Journal of Drugs in Dermatology*, 13(12), 1431–1435. Obtido de <https://jddonline.com/articles/principles-and-approaches-for-optimizing-therapy-with-unique-topical-vehicles-S1545961614P1431X/>
- 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>
- Schalka, S., & Addor, F. (2008). Protetores solares. *Revista Brasileira de Medicina*, 65(SPEC. ISS. OCT.), 6–11.
- Silva, W., Zanatta, M., Ferreira, A. S., Corvo, M. C., & Cabrita, E. J. (2020). Revisiting Ionic Liquid Structure-Property Relationship: A Critical Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7745. <https://doi.org/10.3390/ijms21207745>
- Singh Malik, D., Mital, N., & Kaur, G. (2016). Topical drug delivery systems: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(2), 213–228.

<https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1131267>

Sweeta Akbari, & Abdurahman Hamid Nour. (2018). Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *International Journal of Innovative Research and Scientific Studies*, 1(1), 14–21. Obtido de https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3324905

Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., & Dobrogosz, W. J. (2012). Crude Oil Emulsions- Composition Stability and Characterization. *Crude Oil Emulsions- Composition Stability and Characterization*. <https://doi.org/10.5772/2677>

Targhotra, M., & Chauhan, M. K. (2020). An Overview on Various Approaches and Recent Patents on Buccal Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Design*, 26(39), 5030–5039. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200614182013>

Tucker, C., Tucker, L., & Brown, K. (2018). The Intranasal Route as an Alternative Method of Medication Administration. *Critical care nurse*, 38(5), 26–31. <https://doi.org/10.4037/ccn2018836>

Vollrath, M., Engert, J., & Winter, G. (2017). Long-term release and stability of pharmaceutical proteins delivered from solid lipid implants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 117, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.04.017>

Wahib, S. A., Da'na, D. A., Zaouri, N., Hijji, Y. M., & Al-Ghouti, M. A. (2022). Adsorption and recovery of lithium ions from groundwater using date pits impregnated with cellulose nanocrystals and ionic liquid. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126657. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126657>

Wang, C., Luo, H., Luo, X., Li, H., & Dai, S. (2010). Equimolar CO₂ capture by imidazolium-based ionic liquids and superbase systems. *Green Chemistry*, 12(11), 2019. <https://doi.org/10.1039/c0gc00070a>

- Wei, P., Pan, X., Chen, C.-Y., Li, H.-Y., Yan, X., Li, C., ... Yan, B. (2021). Emerging impacts of ionic liquids on eco-environmental safety and human health. *Chemical Society Reviews*, 50(24), 13609–13627. <https://doi.org/10.1039/d1cs00946j>
- Yaqoob Khan, A., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Jalees Ahmed, F., & Krishan Khar, R. (2006). Multiple Emulsions: An Overview. *Current Drug Delivery*, 3(4), 429–443. <https://doi.org/10.2174/156720106778559056>
- Zandu, S. K., Chopra, H., & Singh, I. (2020). Ionic Liquids for Therapeutic and Drug Delivery Applications. *Current Drug Research Reviews*, 12(1), 26–41. <https://doi.org/10.2174/2589977511666191125103338>
- Zhang, X., Xing, H., Zhao, Y., & Ma, Z. (2018). Pharmaceutical Dispersion Techniques for Dissolution and Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*, 10(3), 74. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030074>

6. Scientific Outputs

Artigos publicados em revistas internacionais com revisão

R. Caparica, A. Júlio, **F. Fernandes**, M.E.M. Araújo, J.G. Costa, T. Santos de Almeida, *"Upgrading the topical delivery of poorly soluble drugs using ionic liquids as a versatile tool"*, International Journal of Molecular Sciences, 22, 4438-4460, 2021. DOI: 10.3390/ijms22094338.

Comunicações por Pannel

A. Júlio, R. Caparica, **F. Fernandes**, J.G. Costa, T. Santos de Almeida, *"Ionic liquids to upgrade the performance of O/W emulsions containing sparingly soluble phenolic compound"*s, Encontro Ciência 2021, Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., 28-30 Junho 2021, Lisboa, Portugal.

A. Júlio, R. Caparica, **F. Fernandes**, J. G. Costa, T. Santos de Almeida, *"Glycine-based IL to improve the performance of O/W emulsions containing rutin"*, Fascination of Plants Day Event, ECTS-ULHT, 18 Maio 2021, Lisboa, Portugal.

F. Fernandes, A. Júlio, T. Santos de Almeida, *"Impact of amino acid ionic liquids on the stability of O/W emulsions containing rutin"*, III Jornadas CBIOS, Lisboa, Portugal, Novembro 2020.

A. Júlio, R. Caparica, **F. Fernandes**, C. Pereira-Leite, J. Portugal Mota, T. Santos de Almeida, *"Development of rutin delivery systems assisted by a choline-amino acid ionic liquid"*, Encontro Ciência 2020, Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., 3-4 novembro 2020, Lisboa, Portugal.

Resumos internacionais com revisão

Júlio, A., Caparica, R., **Fernandes, F.**, Costa, J.G., Santos de Almeida, T. (2021).
“*Glycine-based IL to improve the performance of O/W emulsions containing rutin*”. Biomedical and Biopharmaceutical Research, 18(1), Supplement Fascination of Plants Day Event, pp S154. DOI:10.19277/bbr.18.1.260.