

ANAISA SULTANE

**IMPLANTES LIPÍDICOS CONTENDO CAFEÍNA:
O IMPACTO DE LÍQUIDOS IÓNICOS E DE OUTROS
MODIFICADORES DE LIBERTAÇÃO**

Orientadora: Professora Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2020

ANAISA SULTANE

**IMPLANTES LIPÍDICOS CONTENDO CAFEÍNA:
O IMPACTO DE LÍQUIDOS IÓNICOS E DE OUTROS
MODIFICADORES DE LIBERTAÇÃO**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 5 de junho de 2020, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação nº64/2020 de 19 de fevereiro de 2020, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^a. Doutora Joana Portugal Mota

Orientador:

Prof^a. Doutora Tânia Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2020

*All our dreams can come true, if we have the
courage to pursue them*

Walt Disney

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde (CBIOS) por ser um centro de excelência que permite aos que o integram ser mais e melhor no que fazem, por abrir portas a várias oportunidades e por todo o material e equipamento de excelência que disponibiliza e que potencia o trabalho realizado.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Tânia Santos de Almeida, por me ter dado a oportunidade de descobrir mais sobre a área de investigação. A sua calma e confiança têm sido fundamentais para o meu percurso não só enquanto aluna de projeto, como também enquanto pessoa.

Em terceiro lugar, gostaria de demonstrar a minha profunda gratidão à Ana Júlio, que sempre me acompanhou e me ajudou em alturas nas quais me senti perdida e ansiosa. Obrigada pela disponibilidade, por estares sempre pronta a ajudar, por nunca me teres largado a mão, pelo apoio, pela calma e paciência que sempre tiveste para mim. Obrigada, acima de tudo, pela tua amizade.

Queria agradecer também à Rita Caparica que me acompanhou nesta jornada, que me acalmou quando eu precisava e tinha sempre o conselho certo nas ocasiões mais difíceis.

Aos meus pais, que são o meu pilar. Sem vocês nada disto seria possível. Vocês que são os melhores do mundo, que fizeram e fazem tudo por mim. Que estiveram sempre comigo nos bons e nos maus momentos, que me limpavam as lágrimas e me arrancaram sorrisos. Nunca vão chegar os “obrigadas” e faltarão sempre palavras. Amo-vos mais que o mundo.

À minha Mel, por todos aqueles abraços e beijinhos que me deram força para continuar nos piores momentos e por todas as vitórias festejadas em conjunto.

À minha dadi e ao meu dada, por serem o meu exemplo, por serem a força da minha fé, por serem tudo aquilo que são para mim. Cuidaram de mim desde sempre, agora é a minha vez de cuidar de vocês.

À minha madrinha, que foi o motor deste curso. Ela é a razão de eu estar aqui e agora. Um dos meus maiores orgulhos e a pessoa que mais admiro nesta vida.

Ao meu Miguel, por me acalmar nos meus momentos mais difíceis, pelas palavras de apoio, por não ter perdido a paciência e pelo eterno amor e companheirismo que me transmite todos os dias.

À Inês pela amizade de 17 anos, por ter sempre uma palavra amiga para dizer, por ter estado comigo nos períodos mais difíceis da minha vida e nos mais felizes também. Impossível resumir em poucas palavras o que 17 anos significam.

Aos meus melhores amigos que estão comigo antes de eu embarcar no mestrado: Vasco, Filipa, Yasmin, Jasmim e Ivo. Obrigada pela amizade, pela força e pelos sorrisos que arrancaram quando eu mais precisava.

E por fim, aos amigos que eu ganhei com a faculdade. Que estiveram e estão comigo desde o primeiro dia, até ao dia de hoje. De facto, estes 5 anos foram incríveis e isso também se deve à vossa companhia, ao vosso trabalho, espírito de equipa e amizade.

A terminar, gostava de agradecer à minha estrelinha que me acompanhou nestes 5 anos, tenho a certeza que seria um dos mais orgulhosos neste momento e que me esteve sempre a iluminar nos dias mais escuros. Obrigada avô.

Abstract

The pharmaceutical industry has dealt with several obstacles with regard to the development of new drug delivery systems, due to low drug solubility, permeability and stability, thus conditioning the efficiency of these systems.

Additionally, within the scope of the development of delivery systems, controlled delivery systems have acquired an increasing interest by the scientific community, as they present numerous advantages, such as the reduction of the frequency of administration and allowing some flexibility in the choice of excipients to be used for their development.

However, in their development, it is essential to guarantee its biostability, a good incorporation of the drug and an adequate release profile. For this purpose, different release adjuvants can be used, such as Gelucire 50/02 ® and Sucrose, which can contribute to the modification of the lipid implant release profiles. Additionally, due to the countless valuable properties of ionic liquids, they can also be potential functional excipients, by promoting the solubility and permeability of drugs or even by contributing to the stability of the developed delivery systems.

Thus, this work aimed to evaluate not only the impact of the presence of two release adjuvants, Gelucire® 50/20 or Sucrose, in lipid implants, but also of the incorporation of two ionic liquids, [Cho][Phe] and [Cho][Glu], derived from choline. In the production of implants, caffeine was used as a model asset.

The performance evaluation of the developed implants allowed to demonstrate that each prepared batch showed an uniform content as well as homogeneity in the caffeine content (greater than 95 %), demonstrating that the incorporation of IL does not affect these parameters. The results also demonstrated that the presence of the IL can model the release of the active, with IL [Cho][Glu] allowing greater release of caffeine and a faster degradation of the implants over time in contrast to IL [Cho][Phe].

Keyword: Lipid Implants; Ionic liquids; Caffeine; Content Uniformity, Release and Asset Dosing.

Resumo

A indústria farmacêutica tem lidado com vários obstáculos no que diz respeito ao desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos, devido à baixa solubilidade, permeabilidade e estabilidade dos fármacos, condicionando assim a eficiência desses sistemas.

Adicionalmente, no âmbito do desenvolvimento de sistemas de veiculação, os sistemas de veiculação controlada têm adquirido um crescente interesse por parte da comunidade científica, por apresentarem inúmeras vantagens, como a redução da frequência de administração e permitirem alguma flexibilidade na escolha de excipientes a utilizar para o seu desenvolvimento.

No entanto, aquando do seu desenvolvimento, é fundamental garantir a sua bioestabilidade, uma boa incorporação do fármaco e um perfil de liberação adequado. Com esta finalidade poderão ser usados diferentes adjuvantes de liberação, como o Gelucire® 50/02 e a Sacarose, que poderão contribuir para a modificação dos perfis de liberação de implantes lipídicos. Adicionalmente, devido às inúmeras propriedades valiosas dos líquidos iônicos, estes também poderão ser potenciais excipientes funcionais, ao promoverem a solubilidade e permeação dos fármacos ou até mesmo ao contribuir para a estabilidade dos sistemas de veiculação desenvolvidos.

Assim, com este trabalho pretendeu-se avaliar não só o impacto da presença de dois adjuvantes de liberação, o Gelucire® 50/02 ou a Sacarose, nos implantes lipídicos, mas também da incorporação de dois líquidos iônicos, [Cho][Phe] e [Cho][Glu], derivados de colina. Na produção dos implantes foi utilizado como ativo modelo a cafeína.

A avaliação da performance dos implantes desenvolvidos permitiu demonstrar que se obteve uniformidade de conteúdo entre cada lote preparado e homogeneidade no teor de cafeína contido (superior a 95 %), demonstrando que a incorporação dos LI não afecta estes parâmetros. Os resultados demonstraram ainda que a presença dos LI pode modelar a liberação do ativo, sendo o LI [Cho][Glu] o que permite uma maior liberação de cafeína e uma degradação dos implantes mais rápida ao longo do tempo contrariamente ao LI [Cho][Phe].

Palavra-chave: Implantes Lipídicos; Líquidos Iónicos; Cafeína; Uniformidade de conteúdo, Liberação e doseamento do ativo.

Lista de siglas e acrônimos

% m/m	Porcentagem massa por massa
%	Porcentagem
[Cho][Glu]	(2-hidroxi-etil)-trimetilamônio-L-glutaminato
[Cho][Phe]	(2-hidroxi-etil)-trimetilamônio-L-fenilalaninato
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de variância
CBIOS	Research Center for Biosciences & Health Technologies
DP	Desvio Padrão
Dynasan® 118	Gliceroma triestearato
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
LI	Líquidos Iônicos
mL	Mililitros
n	Número de amostras
nm	Nanômetros
PEG	Polietilenoglicol
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Radiação Ultravioleta

Índice

ÍNDICE DE TABELAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO	2
1.2. SISTEMAS DE VEICULAÇÃO	5
1.3. IMPLANTES LIPÍDICOS.....	8
1.4. SOLUBILIDADE DE FÁRMACOS	10
1.5. LÍQUIDOS IÓNICOS	12
1.6. CAFEÍNA	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1. REAGENTES.....	19
2.2. PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES	19
2.3. ENSAIO DA UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO	20
2.4. DOSEAMENTO DA CAFEÍNA NO IMPLANTE.....	20
2.5. ENSAIO DE LIBERTAÇÃO	21
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1. DESENVOLVIMENTO DOS IMPLANTES LIPÍDICOS.....	23
3.1.1. Uniformidade de Conteúdo.....	23
3.1.2. Ensaio de Doseamento	26
3.1.3. Ensaio de Libertação in vitro	26
4. CONCLUSÃO	30
5. BIBLIOGRAFIA.....	33
6. SCIENTIFIC OUTPUTS	41
COMUNICAÇÕES POR PAINEL	41

Índice de Tabelas

TABELA 1: Composição, % m/m, de implantes lipídicos com e sem cafeína e com ou sem o LI [Cho][Phe] ou o LI [Cho][Glu].....	20
--	----

Índice de Figuras

FIGURA 1: Esquema da classificação dos LI em 3 gerações	13
FIGURA 2: Estrutura da cafeína.	16
FIGURA 3: Implantes lipídicos após a execução do ensaio de uniformidade de conteúdo com o corante lipofílico – sudan III.	24
FIGURA 4: Implantes lipídicos após a execução do ensaio de uniformidade de conteúdo com o corante hidrofílico – azul de metileno..	24
FIGURA 5: Conteúdo de fármaco nos implantes preparados.....	26
FIGURA 6: Efeito da composição dos implantes na libertação da cafeína.....	27

1. Introdução

A veiculação de fármacos tem sido um dos principais problemas para a indústria farmacêutica, isto porque a baixa solubilidade, permeabilidade e a estabilidade dos fármacos tem dificultado o desenvolvimento de novos sistemas de veiculação, quer seja para novas substâncias activas, quer para outras já existentes (Caparica, Júlio, Baby, et al., 2018; Huang et al., 2018; Frauke Kreye, Siepmann, & Siepmann, 2008). Outro factor fundamental a considerar além da forma farmacêutica é a via de administração a utilizar, uma vez que esta também vai depender do tipo de fármaco. Por exemplo, se for um fármaco em que a substância activa é uma proteína, a via de administração oral não é uma opção viável pois as proteínas são degradadas a nível do trato gastrointestinal e ainda a mucosa deste estrato não é permeável a moléculas com um tamanho mais elevado e largo (Frauke Kreye et al., 2008). Pelo que a via de administração a considerar depende de inúmeros factores.

1.1. Vias de administração

Como referido anteriormente os fármacos podem ser administrados por diferentes vias, como por exemplo as vias oral, intravenosa, subcutânea, intramuscular e tópica, entre outras. No que diz respeito à via oral, os fármacos podem ser administrados através de cápsulas ou comprimidos para serem engolidos. Nesta via, o fármaco é libertado da forma sólida no estômago e é absorvido nos intestinos para a corrente sanguínea. No entanto, existem alguns fármacos em que a via preferencial é a injeção direta para o sangue (via intravenosa) ou nos tecidos (subcutânea, intramuscular), devido à necessidade de haver um início rápido de acção do fármaco ou porque o fármaco é instável no sistema gastrointestinal ou ainda porque não é absorvido nos intestinos. Os fármacos também podem ser administrados através da zona ocular, pulmões, nariz, reto e vagina (Gregoriadis & Florence, 1993; J.D.Rodwell, 1989; S.S.Davis, 2010).

São diversas as vias de administração possíveis e cada uma destas afecta a absorção, distribuição e metabolismo do fármaco, bem como as respostas fisiológicas ao mesmo. No entanto, todas as vias de administração têm as suas vantagens e desvantagens.

A administração oral é a mais conveniente, a mais comum e acessível para o paciente. Contudo, esta tem uma acção lenta e, adicionalmente, esta acção pode ir diminuindo devido à degradação ao longo do trato intestinal e esta via de administração pode ser mais difícil para

algumas populações em particular, como crianças, idosos e doentes que sofrem de mucosite (Hines et al., 2019; F. Kreye, Siepmann, & Siepmann, 2011; Patel, Liu, & Brown, 2011; Satheesh Madhav, Semwal, Semwal, & Semwal, 2012).

A via oral inclui as vias, bucal, sublingual, gengival, palatal e labiais. As vantagens da via oral são a elevada adesão por parte do paciente, a absorção na mucosa oral de certos fármacos proporciona um efeito mais rápido dos mesmos, é não invasiva e menos intimidante do que outras vias, como a intravenosa e intramuscular. Normalmente, os tratamentos locais são para tratar gengivites, candidíases orais, lesões orais, cáries dentárias e xerostomia. Os sistemas de veiculação por via oral compreendem os sprays, pastilhas, bioadesivos, geles, entre outros (Satheesh Madhav, Semwal, Semwal, & Semwal, 2012). No entanto tem várias limitações como: o ácido do estômago e as enzimas presentes no trato gastrointestinal podem degradar algumas substâncias activas antes de elas serem absorvidas. Desta forma, a via oral convencional não é usada para substâncias biológicas, como as proteínas e também várias macromoléculas não conseguem permear a membrana dos intestinos (Jain, 2008). Não chegando à corrente sanguínea algumas substâncias activas ficam insolúveis com o pH baixo ao longo do trato gastrointestinal, podem sofrer efeito de primeira passagem e ficarem inactivadas no fígado, podem provocar irritação no trato gastrointestinal e, por fim, os níveis de absorção e, consequentemente, das concentrações no plasma são imprevisíveis. Assim, a impossibilidade de controlar o nível de fármacos por um longo período de tempo constituiu uma desvantagem importante nesta via (Coelho et al., 2010; Madhav, Shakya, Shakya, & Singh, 2009).

Uma outra via de administração muito considerada é a administração parenteral (Korani et al., 2019). Esta via é a mais eficaz na liberação controlada e prolongada de fármacos, pois atinge rapidamente a circulação sanguínea devido à sua rápida absorção. A administração parenteral inclui a injeção intravenosa, intramuscular, intra-arterial e subcutânea. No entanto, apesar da rápida absorção e, consequentemente, a elevada concentração de fármaco em circulação, há uma brusca descida destes níveis de concentração. Assim, no caso de doenças crónicas, em que é necessário uma terapêutica prolongada, ou seja, várias injeções por semana ou até mesmo diárias, esta via pode resultar numa fraca adesão por parte do paciente (Vollrath, Engert, & Winter, 2017). Assim, a via de administração intravenosa é conhecida por ter efeitos terapêuticos rápidos e, também, por permitir a chegada ao sistema nervoso mais rapidamente. Porém, esta via é limitada pois tem uma baixa adesão a

nível dos utentes, dado ser considerada dolorosa (Patel, Liu, & Brown, 2011; Rathbone & Hadgraft, 1991; Spain, Wright, Hahn, Wivel, & Martin, 2016; Yellela, 2010).

A via de administração transdérmica é outra opção para que os fármacos cheguem ao local de acção pretendido. Esta via engloba as formulações de medicamentos administradas topicamente, quer tenha como objectivo chegar à circulação sanguínea ou atuar a nível local. Desde há milhares de anos que se coloca várias substâncias sob a pele, em forma de cremes ou pomadas, com o objectivo de chegar a um efeito terapêutico para tratar problemas dermatológicos (Malamed, 2010; Prausnitz & Langer, 2008).

O primeiro sistema transdérmico criado para alcançar a circulação sanguínea, foi um adesivo de três dias que continha escopolamina para tratar o enjoo. Posteriormente surgiram os adesivos de nicotina, estradiol, fentanilo, testosterona, entre outros (Prausnitz & Langer, 2008). Atualmente, esta via de administração é uma das que é equacionada quando a via oral não está disponível. Esta via apresenta várias vantagens, tais como, evitar o efeito de primeira passagem, evitar a contaminação por parte dos resíduos (como é o caso das agulhas), não ser uma via invasiva, possuir poucos efeitos adversos e os sistemas poderem ser auto-administrados (Malamed, 2010; Prausnitz & Langer, 2008). Adicionalmente, este tipo de via de administração tem um custo baixo e é uma via de fácil utilização, o que aumenta a adesão do paciente, e possibilita a libertação do fármaco por longos períodos de tempo (Prausnitz & Langer, 2008). No entanto, a pele funciona como uma barreira semipermeável e, por isso, não é possível administrar alguns fármacos através desta via. Por exemplo, os fármacos hidrofílicos e as macromoléculas, como as proteínas, devido ao seu tamanho, dificilmente penetram as camadas da pele (Malamed, 2010; Prausnitz & Langer, 2008).

Outra via de administração é a via de administração intranasal. Este tipo de via, foi utilizada primeiramente para os pacientes pediátricos, para evitar a administração oral e injeções (Malamed, 2010). A via intranasal está associada à produção de um efeito local. Um exemplo muito comum é o tratamento de doenças alérgicas, como a rinite, com anti-histamínicos, corticóides e /ou vasoconstritores. No entanto, a zona intranasal é altamente vascularizada, com uma mucosa nasal muito permeável e por estes motivos, esta via de administração permite a administração sistémica de fármacos (Grassin-Delyle et al., 2012; Malamed, 2010). As principais vantagens desta via são o início rápido de acção, evitar o efeito de primeira passagem e ser uma via de grande interesse para substâncias activas com baixa biodisponibilidade oral. No entanto, apresenta várias desvantagens, tais como, a

necessidade de atravessar a mucosa nasal, as propriedades da mesma poderem alterar a absorção do medicamento, a actividade enzimática na região nasal e, também, a possibilidade de intolerância local por parte dos pacientes (Grassin-Delyle et al., 2012).

Adicionalmente, a via de administração pulmonar tornou-se uma via com muito interesse na comunidade científica pois o pulmão é capaz de absorver fármacos para atuarem a nível local ou a nível sistémico. É uma das vias que apresenta uma administração não invasiva, com uma grande área de superfície para absorção e com alta permeabilidade. Outras vantagens são a capacidade de absorção rápida, presença relativamente pequena de enzimas e evitar o efeito de primeira passagem (Patil & Sarasija, 2012). Contudo, tem algumas desvantagens como, a possibilidade de haver efeitos irritantes, limitar a quantidade de fármaco em cada administração, para não haver efeitos adversos, e ter um custo elevado (Hill, Preston, & Roberts, 2015).

A via retal também é uma das opções para que o fármaco entre no organismo. A vantagem desta via é o facto de evitar o efeito de primeira passagem. No entanto, não é a via preferencial dos pacientes. A biodisponibilidade dos medicamentos quando administrados por via retal depende de vários factores, como a taxa de dissolução do fármaco, a área superficial, o tempo de retenção e a quantidade de medicamento no local de absorção. Por esta razão, a absorção é pouco previsível, não havendo um total controlo do efeito que o fármaco faz no organismo (Kaminsky, Bostwick, & Guthrie, 2015).

Assim, fica claro que são diversas as vias de administração a considerar para uma possível terapêutica. No entanto, além da via de administração, o sistema de veiculação escolhido é outro factor essencial para garantir uma terapêutica eficaz. Neste âmbito, têm sido inúmeros os esforços por parte da comunidade científica para desenvolver novos e mais eficazes sistemas de veiculação.

1.2. *Sistemas de Veiculação*

A introdução de novos fármacos no organismo humano pode ser feita por várias vias anatómicas. A via de administração mais adequada para um determinado fármaco vai depender do objectivo terapêutico desejado, das propriedades do fármaco que vai ser administrado, da doença a ser tratada, dos efeitos desejados e do tempo que irá levar até à obtenção destes mesmos efeitos. A forma como um fármaco chega ao seu local de acção, ou

seja a forma, como este vai ser veiculado, tem um importante significado na sua eficácia (Allen & Cullis, 2004; Bhagwat, 2013; Coelho et al., 2010; Patel et al., 2011; Tiwari et al., 2012).

Alguns fármacos têm uma percentagem óptima de concentração e outros podem ter concentrações demasiado elevadas, que vão levar a efeitos tóxicos. Por outro lado, os fármacos também podem ter concentrações demasiado baixas, não proporcionando o efeito necessário. Posto isto, no desenvolvimento de novos sistemas de veiculação é necessário conhecer e controlar a farmacocinética, a farmacodinâmica, a toxicidade e a eficácia dos fármacos. Neste âmbito, têm sido vários os estudos desenvolvidos no âmbito da área farmacêutica com o intuito de desenvolver novos sistemas de veiculação de fármacos mais eficientes e inovadores. Estes baseiam-se no estudo de um conjunto de estratégias para melhorar a forma farmacêutica e a eficiência e estabilidade do fármaco, de forma a que este chegue ao seu local de acção com a maior eficácia possível (Allen & Cullis, 2004). O principal objectivo de um Sistema de Veiculação de Fármacos é entregar uma substância activa de uma maneira controlada, mas também permitir que esta substância seja libertada dentro das suas doses terapêuticas. Estes sistemas também podem direccionar o fármaco para um órgão ou tecido específico. Adicionalmente, como consequência de muitas vezes o custo envolvido no desenvolvimento de novos fármacos ser muito elevado, opta-se por melhorar as estratégias para a veiculação de fármacos já existentes. Apesar do desenvolvimento destes novos sistemas de veiculação também ter um custo elevado, esta é uma área que, nas últimas décadas, tem sido alvo de muita atenção por parte dos investigadores. Existem vários sistemas de veiculação a serem desenvolvidos neste momento de modo a que seja possível diminuir a degradação dos fármacos e as suas perdas, bem como para prevenir reacções adversas, aumentar a adesão do paciente e aumentar a biodisponibilidade e a concentração do fármaco num certo local (Bhagwat, 2013; Coelho et al., 2010; Patel et al., 2011; Tiwari et al., 2012).

O tipo de sistema de veiculação que é seleccionado depende de vários factores, tais como propriedades físico-químicas do fármaco, a dose, a doença que se está a tratar, o local onde o fármaco deve atuar no organismo, a via de administração preferencial, se o tratamento é agudo ou crónico, os custos associados e, ainda, a necessidade de controlo da concentração do fármaco (Gregoriadis & Florence, 1993; J.D.Rodwell, 1989; S.S.Davis, 2010).

Um dos maiores desafios está relacionado com a capacidade do medicamento chegar ao seu local de acção. Para isso, é necessário primeiramente que na sua veiculação, o ativo

seja solúvel e estável nas formas farmacêuticas. Neste âmbito, existe um sistema de classificação biofarmacêutico que caracteriza vários fármacos de acordo com a sua solubilidade e com a sua permeabilidade. Mais de 70% das substâncias activas têm baixa solubilidade e estão incluídas nas classes II e IV deste sistema. Este tipo de substâncias apresenta várias desvantagens quando incorporadas em formulações, tais como a sua restrita dissolução e permeabilidade. Consequentemente é também fundamental encontrar soluções para aumentar a solubilidade desses fármacos e facilitar a sua incorporação nos respectivos sistemas de veiculação. Para ultrapassar este obstáculo, existem várias estratégias, como, por exemplo, o uso de nanopartículas, lipossomas e implantes lipídicos (Hines et al., 2019; Frauke Kreye et al., 2008).

As nanopartículas estão no estado sólido e podem ser amorfas ou cristalinas. Têm a capacidade de adsorver e/ou encapsular um fármaco e, desta forma, protegem-no contra degradações enzimáticas e químicas que possam ocorrer, por exemplo, na via de administração oral. Nos últimos anos, têm sido utilizadas nanopartículas com polímeros biodegradáveis, devido às suas possibilidades de aplicação, tais como permitir o controlo da libertação do fármaco, localizar a acção do fármaco, transportar moléculas de DNA na terapia génica e, ainda, transportar proteínas (Bhagwat, 2013).

Outro exemplo de sistemas de veiculação são os lipossomas. Uma das extremidades de cada lipossoma é hidrofílica e por isso solúvel em água, enquanto a outra extremidade é hidrofóbica. Com isto, podemos fazer com que fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos sejam transportados dentro do lipossoma ou na sua superfície, protegendo o fármaco, de modo a que este seja posteriormente libertado. Muitas vezes os lipossomas ligam-se às membranas das células, difundindo-se com as mesmas, libertando assim o fármaco dentro da célula. Uma das vantagens deste tipo de sistema, que é recente e ainda se encontra em vários estudos, é a possibilidade de direccioná-lo para algum órgão ou tecido específico (Bhagwat, 2013).

Apesar de protegerem o fármaco e fazerem com que o mesmo chegue ao local de acção sem sofrer degradação e, consequentemente, haver uma elevada concentração de fármaco em circulação, há uma brusca descida dos níveis de concentração, pelo que, em caso de doenças crónicas, em que é necessário uma terapêutica prolongada, ou seja, várias injeções ou tomas por semana ou até mesmo diárias podem resultar numa fraca adesão por parte do paciente. Como forma de ultrapassar essas desvantagens podem ser usados sistemas de veiculação com libertação controlada, como os implantes lipídicos (Amaral, 2016). Estes

sistemas destinam-se a reduzir a frequência de administração, proteger o medicamento contra a degradação durante a administração e controlar com maior precisão a taxa de libertação do fármaco, permitindo a otimização dos efeitos terapêuticos pretendidos, ao possibilitar uma libertação mais localizada do fármaco (Vollrath et al., 2017). Estes parâmetros permitem a utilização de dosagens menores e uma menor toxicidade (E.Golan, David, Armen H.Tashjian Jr, Ehrin J. Armstrong, 2009; Kreye et al., 2008; S.S.Davis, 2010).

No entanto, a eficácia dos fármacos não depende só do tipo de sistema de veiculação utilizado. Adicionalmente, e como referido anteriormente, a baixa solubilidade dos fármacos pode ser um obstáculo ao desenvolvimento de novos sistemas de veiculação. A solubilidade e a incorporação dos fármacos nos sistemas de veiculação, nomeadamente em implantes lipídicos, dependem dos diversos excipientes selecionados, que têm que ser capazes de permitir a incorporação do fármaco e modelar a sua libertação (Santos de Almeida, Júlio, Portugal Mota, Rijo, & Reis, 2017).

Os sistemas baseados em polímeros biodegradáveis, como os implantes lipídicos, permitem a libertação controlada e prolongada dos fármacos e podem ser uma estratégia inovadora e valiosa nos casos de necessidade de tratamentos prolongados.

1.3. Implantes Lipídicos

Os implantes lipídicos podem representar uma vantagem por providenciarem a protecção do fármaco e uma libertação deste no local alvo, se assim for o desejado (Koennings et al., 2006; Frauke Kreye et al., 2008; Schwab, Sax, Schulze, & Winter, 2009). Se o implante for colocado no local de acção ou perto do mesmo, uma das maiores vantagens é o aumento da concentração do fármaco no local de acção e, ao mesmo tempo, a diminuição da concentração do fármaco noutros locais do organismo, reduzindo, assim, os efeitos adversos. O fármaco é libertado por longos períodos de tempo, atingindo concentrações elevadas no local de acção (Kaurav & Kapoor, 2017; Frauke Kreye et al., 2008; S.S.Davis, 2010).

Além disso, permitem a libertação do fármaco de uma forma prolongada e controlada (Amaral, 2016), o que também representa uma vantagem. Uma das problemáticas que poderá ser evitada, com o uso de implantes lipídicos, é a variação das concentrações da substância activa no plasma. Esta variação de concentrações pode levar tanto a toxicidade como a doses

subterapêuticas, que podem resultar em resistência do fármaco. Os implantes podem ser inseridos subcutaneamente quando pretendemos um efeito sistêmico ou colocados no órgão alvo, se o efeito pretendido for localizado. Assim, estes sistemas apresentam vantagens como a boa adesão à terapêutica, permitir uma terapêutica dirigida e conduzir à existência mínima de interferências, como por exemplo a barreiras biológicas. Permitem ainda que os fármacos não sofram degradação antes de chegar ao local pretendido, que os efeitos adversos sejam menores, permitindo ainda a seleção dos excipientes mais apropriados à veiculação pretendida, aquando da sua produção (Kaurav & Kapoor, 2017; Frauke Kreye et al., 2008)

No entanto, na produção de implantes devem ser consideradas algumas características fundamentais, nomeadamente estes devem apresentar bioestabilidade, devem ser biocompatíveis, ter baixa toxicidade e, ainda, apresentar um bom perfil de liberação do fármaco (Amaral, 2016). No caso de doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), como tumores cerebrais ou doenças neurodegenerativas (por exemplo, Doença de Parkinson e Alzheimer), os implantes lipídicos podem ser administrados diretamente no tecido-alvo, superando efetivamente a barreira hematoencefálica. A barreira hematoencefálica é um grande obstáculo para muitos tipos de fármacos que seriam altamente eficientes, para várias doenças do SNC, se fossem capazes de alcançar o seu local de ação (Kreye et al., 2008). O uso de implantes lipídicos como sistema de veiculação parenteral oferece várias vantagens para alguns tipos de fármacos. Como por exemplo, fármacos que sejam quimicamente instáveis podem ser incorporados em implantes lipídicos e, assim, ficam protegidos contra as agressões químicas (ex: degradação enzimática) que ocorrem no organismo humano. Outro exemplo é a incorporação de proteínas nos implantes lipídicos. Desta forma, evita-se as mudanças de estrutura a que a proteína pode estar exposta (Frauke Kreye et al., 2008; Vollrath et al., 2017). A possibilidade de incorporar nos implantes a insulina para pacientes que sofrem de diabetes seria igualmente muito vantajosa. No caso de diabetes tipo I, é necessário a injeção de insulina pelo menos uma vez por dia. Isto leva à diminuição da adesão dos pacientes e, ainda, à possibilidade de esquecimento por parte dos mesmos (Spain et al., 2016). Adicionalmente, a forma de administração desses fármacos, ou a sua veiculação, não é a única barreira a ultrapassar quando o objetivo é que estes atinjam o local pretendido durante o tempo de tratamento. Assim, as substâncias utilizadas para os mesmos têm de ter como propriedade a degradação lenta no organismo. Foram propostos vários tipos de lípidos para a preparação dos implantes, muitos deles de origem natural, como compostos do próprio organismo humano, triglicéridos e colesterol. Muitos destes tipos de lípidos são usados na

cosmética e na indústria alimentar, no entanto, não quer dizer que sejam seguros para a administração parenteral (Schwab, Sax, Schulze, & Winter, 2009). Os lípidos que compõem os implantes têm que ser inertes, biodegradáveis e biocompatíveis com o organismo humano. Além disso, têm que ser altamente seguros e permitir incorporar vários tipos de fármacos (Kaurav & Kapoor, 2017; Frauke Kreye et al., 2008; S.S.Davis, 2010; Zhang, Xing, Zhao, & Ma, 2018).

O mecanismo de controlo da liberação do fármaco dos implantes lipídicos pode ser complexo e depende de vários factores como a quantidade de lípido usado, o tipo e a quantidade de fármaco a incorporar, a distribuição do fármaco pelo implante, a técnica de preparação dos implantes, os excipientes presentes e a estabilidade do sistema desenvolvido (Zhang et al., 2018).

A utilização de excipientes funcionais que permitam colmatar algumas destas problemáticas pode ser outra estratégia útil. No entanto, é crucial que estes excipientes sejam biocompatíveis e que permitam a veiculação dos fármacos a concentrações não tóxicas para o organismo humano (Hines et al., 2019).

Contudo, existem certos fármacos difíceis de incorporar nos implantes devido à sua solubilidade e permeação. A baixa solubilidade e permeação de alguns desses princípios ativos podem também representar obstáculos de elevada relevância no desenvolvimento de sistemas de veiculação mais eficazes. Assim, é necessário encontrar excipientes ecológicos e compatíveis com o organismo humano, de modo a promover a solubilidade e incorporação dos fármacos em sistemas de veiculação.

1.4. Solubilidade de fármacos

Como referido esta baixa solubilidade de muitos fármacos, é um dos principais obstáculos a ultrapassar, isto porque é a maior causa para uma baixa disponibilidade da substância activa no organismo humano.

A solubilidade é a propriedade de um sólido, líquido ou gás de uma substância química, que ao dissolver-se num solvente sólido, líquido ou gasoso, forma uma solução homogénea. A solubilidade de uma substância depende fundamentalmente do solvente utilizado, da temperatura e da pressão utilizada (L. Lachman, 1986).

A nível dos sistemas parenterais, a solubilidade também é um parâmetro importante. É, de facto, um dos parâmetros mais importantes para atingir as concentrações sistémicas desejadas de modo a alcançar a resposta farmacológica pretendida (Savjani, Gajjar, & Savjani, 2012; V. R. Vemula, V. Lagishetty, 2010). Os fármacos pouco solúveis, por vezes, necessitam de doses muito elevadas para atingir concentrações plasmáticas terapêuticas. A baixa solubilidade aquosa é o principal problema encontrado no desenvolvimento de novos fármacos e vias de administração. Qualquer fármaco a ser absorvido deve estar presente na forma de solução aquosa no local de absorção. Mais de 40% das novas substâncias activas desenvolvidas na indústria farmacêutica são praticamente insolúveis em água, o que faz com que haja posteriormente uma biodisponibilidade inadequada. A melhoria da solubilidade do medicamento e, consequentemente, da sua biodisponibilidade oral continua a ser um dos aspectos a melhorar no desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos (Chen, Okuda, Lu, & Chan, 2016; Di, Fish, & Mano, 2012; Feng et al., 2018; Huang et al., 2018; Lauer et al., 2018; Savjani et al., 2012; Singh & Van den Mooter, 2016).

Assim, algumas substâncias activas representam um maior desafio para veicular devido à sua dissolução limitada e pouca permeabilidade. É necessário aplicar várias técnicas de formulação para aumentar a solubilidade ou a dissolução desses fármacos pouco solúveis de modo a que haja um aprimoramento da biodisponibilidade (Zhang et al., 2018).

A baixa solubilidade e a baixa dissolução de fármacos pouco solúveis nos fluídos aquosos no sistema gastrointestinal causa, por vezes, uma biodisponibilidade insuficiente. São muitos os desafios aquando do desenvolvimento de sistemas com este tipo de fármacos, tais como o aumento do tempo e custo deste processo, pelo que é essencial encontrar novas formas de aumentar a solubilidade e a incorporação destes fármacos pouco solúveis, em sistemas de veiculação.

Neste âmbito, os líquidos iónicos podem ser componentes promissores para actuar como excipientes funcionais em sistemas de veiculação de fármacos, nomeadamente de sistemas lipídicos, podendo permitir o aumento da solubilidade, permeabilidade e da incorporação de activos pouco solúveis nesses sistemas (Antunes, 2019).

1.5. Líquidos Iônicos

Os Líquidos Iônicos são sais, com um catião orgânico e com um anião inorgânico, que estão na forma líquida a temperaturas abaixo de 100 °C ou até à temperatura ambiente (Caparica, Júlio, Rosado, & Santos de Almeida, 2018; Ferraz, Branco, Prudêncio, Noronha, & Petrovski, 2011; Kubota, Shibata, & Yamaguchi, 2016; Torimoto, Tsuda, Okazaki, & Kuwabata, 2010).

As principais propriedades dos líquidos iônicos são as suas baixas pressões de vapor (Balk, Holzgrabe, & Meinel, 2015; Dobler et al., 2012), a possibilidade de serem reciclados (Ghandi, 2014), a baixa volatilidade (Earle et al., 2006), o facto de não serem inflamáveis (Balk et al., 2015; Ghandi, 2014; Romero, Santos, Tojo, & Rodríguez, 2008), a sua elevada condutividade iónica, elevada estabilidade térmica e química (Moniruzzaman, Kamiya, & Goto, 2010) e o facto de possuírem uma boa condução eléctrica (Mizuuchi et al., 2008). Duas grandes vantagens dos LI, para a sua aplicabilidade na área farmacêutica, são a sua capacidade de dissolução de materiais orgânicos, inorgânicos e poliméricos (Caparica, 2017; Dobler et al., 2012; Mizuuchi et al., 2008) e a possibilidade destes poderem ser alterados estruturalmente através da sua síntese, de acordo com as propriedades pretendidas (Caparica, 2017; Moniruzzaman, Tamura, Tahara, Kamiya, & Goto, 2010). Estas características permitem que os LI possam ser colocados em soluções oleosas, aquosas ou hidroalcoólicas e que possam ser miscíveis, imiscíveis ou parcialmente miscíveis com a água, dependendo da sua estrutura (Czekanski, Santos de Almeida, Portugal Mota, Rijo, & Araújo, 2014). Estas características são muito importantes quando se tem como objectivo o uso dos LI como excipientes para estruturar e modificar sistemas de veiculação (Júlio et al., 2018; Romero et al., 2008; Santos de Almeida, Júlio, Portugal Mota, et al., 2017). A sua utilização como excipiente pode melhorar propriedades como viscosidade, polaridade, hidrofiliicidade entre outras propriedades físicas e químicas (Romero et al., 2008). Adicionalmente, pode ajudar a resolver alguns problemas relacionados com as substâncias activas como, mudanças polimórficas, problemas de estabilidade e, ainda, permite a utilização para vários tipos de sistemas de veiculação de fármacos (Mizuuchi et al., 2008). Adicionalmente, são conhecidas as propriedades antimicrobianas, antifúngicas e a ecotoxicidade, que podem funcionar como vantagens no uso dos LI (Czekanski et al., 2014; Santos de Almeida, Júlio, Portugal Mota, et al., 2017).

Por apresentarem estas características, os LI têm recebido muita atenção por parte da comunidade científica, sendo várias as suas aplicações descritas devido às suas propriedades tão vantajosas. Podem ser utilizados como solventes e catalisadores de ingredientes activos, como substitutos de óleo ou água, como aditivos ou como surfactantes em emulsões e micro-emulsões e como electrólitos (Almeida, Júlio, Mota, Rijo, & Reis, 2017; Marrucho et al., 2014; Shamshina et al., 2013). Têm utilizações em química sintética, em catálise, tecnologia de separação, síntese orgânica, extracção cromatográfica, preparação de nanomateriais, formulações de *patch* transdérmicos e reacções bio-enzimáticas (Mizuuchi et al., 2008).

Os LI podem ser divididos em três gerações (**Figura 1**): primeira geração, que contém os catiões diaquilimidazólio e alquilpiridínio, a segunda geração que é constituída pelos catiões diaquilimidazólio, alquilpiridínio, amónio e fosfónio e por fim, a última geração constituída pelos iões naturais e biodegradáveis ou iões com actividades biológicas conhecidas (Egorova, Gordeev, & Ananikov, 2017a). Nesta última geração, estão incluídos os LI à base de colina, que têm sido descritos como menos tóxicos (Júlio et al., 2018).

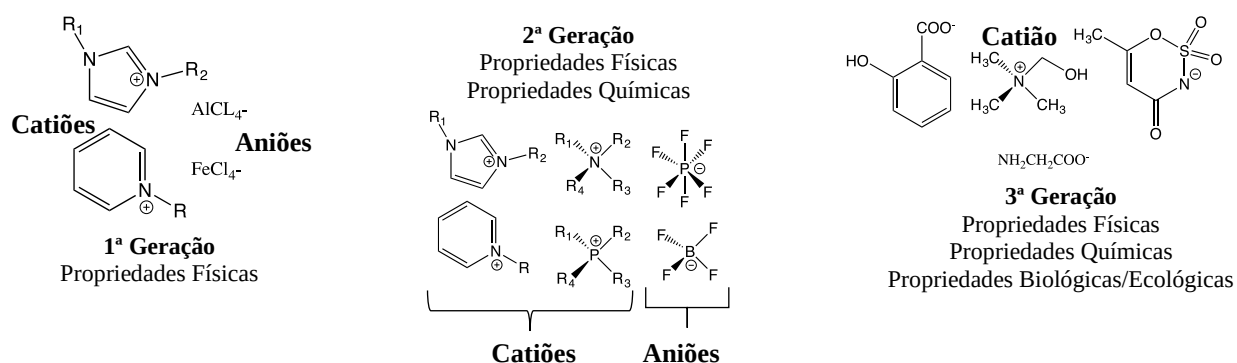


Figura 1: Esquema da classificação dos LI em 3 gerações.

A maior parte dos LI da primeira geração resulta da combinação dos catiões diaquilimidazólio e alquilpiridínio com aniões metálicos. Esta geração atrai muita atenção devido às suas propriedades físicas, sensíveis à água e ao ar (Egorova, Gordeev, & Ananikov, 2017a). Na segunda geração os catiões mais utilizados são os diaquilimidazólio, alquilpiridínio, amónio e fosfónio e os aniões mais utilizados são os haletos, tetrafluoroborato e hexafluorofosfato. Os LI desta segunda geração são referidos como mais estáveis em contacto

com o ar e com a água (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017). Por fim, a terceira geração, constituída pelos íons naturais e biodegradáveis, como os à base de colina. O estudo desta geração é de muito interesse devido às suas propriedades químicas e possibilidade do seu uso em diferentes áreas como a biologia e farmacêutica (Egorova, Gordeev, & Ananikov, 2017b; Santos de Almeida, Júlio, Portugal Mota, et al., 2017).

Adicionalmente, os LI também podem ser divididos em quatro categorias com base nos catiões que os constituem: Os LI do catião diaquilimidazólio, do catião *N*-alquilpiridínio, do catião aquilamónio e do catião fosfónio (Ghandi, 2014).

Os LI à base de imidazólio são os mais estudados devido à sua baixa viscosidade, facilidade para sintetizar e à capacidade para se manterem estáveis em condições oxidativas ou redutivas (Wang, Luo, Luo, Li, & Dai, 2010). Têm várias aplicações como solventes, catalisadores em sínteses e também promotores de solubilidade. No entanto, foram relatadas reacções inesperadas que demonstram a possibilidade dos LI não serem totalmente seguros (Ghandi, 2014).

Os LI à base de piridínio são mais recentes, demonstraram regioselectividade na telomerização, catalizada por paládio, do butadiene com o metanol e um efeito negativo em algumas reacções Diels-Alder (Biswas & Rao, 2007). Apesar disto, a utilização deste tipo de LI demonstrou ser sucedida nas reacções Friedel-Crafts (Ghandi, 2014) e Grignard (Busetti et al., 2010). Adicionalmente, mostraram também bons resultados como catalisadores em reacções de síntese.

Por sua vez, os LI à base do catião amónio quaternário, têm demonstrado utilidade a nível industrial devido à sua bioactividade e à sua actividade antimicrobiana. Adicionalmente, estes LI têm sido descritos como menos tóxicos para o organismo, quando comparados com as duas classes referidas anteriormente (Melo, Bogel-Lukasik, Nunes da Ponte, & Bogel-Lukasik, 2013; Santos de Almeida, Júlio, Portugal Mota, et al., 2017).

Finalmente os LI à base de fosfónio são os mais recentes, sendo mais termoestáveis e, por isso, muito utilizados a temperaturas maiores a 100 °C e, também, muito utilizados em várias reacções como catalisadores (Ghandi, 2014; Santos de Almeida, Júlio, Portugal Mota, et al., 2017).

São variadas as áreas onde se podem utilizar os diferentes tipos de líquidos iónicos, visto que as suas propriedades podem ser tão diferentes e podem ser alteradas de acordo com

o objectivo que se quer alcançar. E muitas destas propriedades são muito relevantes ao nível do desenvolvimento de novos sistemas de veiculação mais eficazes, visto que os LI podem ser incorporados em vários tipos de sistemas. Na realidade, actualmente têm surgido alguns estudos que têm demonstrado a utilidade dos LI para aumentar a solubilidade e a incorporação de ativos em diferentes sistemas de veiculação. Nomeadamente, em emulsões óleo/água para a incorporação de cafeína (Almeida et al., 2017) ou de ácido ferúlico ou rutina (Almeida et al., 2017). Mais recentemente, foi ainda demonstrada a aplicabilidade de LI em sistemas híbridos de nanopartículas onde estes saís demonstraram ser fundamentais para permitir a incorporação de rutina, um ativo de muito baixa solubilidade, em nanopartículas, permitindo uma veiculação controlada e direccionada (Júlio et al., 2019). Assim, estes estudos já demonstraram o potencial promissor dos LI como excipientes funcionais em sistemas de veiculação controlada, podendo nomeadamente ser úteis como moduladores da liberação de ativos neste tipo de sistemas. Desta forma, salienta-se o interesse, no âmbito deste trabalho, de demonstrar a aplicabilidade dos LI em sistemas lipídicos.

No âmbito do nosso grupo de investigação, foi efectuado um estudo preliminar sobre o desenvolvimento de sistemas lipídicos contendo cafeína, na presença de um LI (Antunes, 2019). Este estudo demonstrou que o LI em estudo, o (2-hidroxiethyl)-trimetilamónio-Lfenilalaninato [Cho][Phe], teve influência na liberação do activo modelo cafeína. No entanto, ainda muito ficou por fazer relativamente a este tipo de sistema, nomeadamente avaliar a uniformidade de conteúdo dos sistemas desenvolvidos na presença e ausência do LI, bem como estudar diferentes LI. Assim, o presente trabalho pretende dar seguimento ao trabalho inicialmente desenvolvido, aplicando a incorporação de mais um LI, bem como de um novo adjuvante de liberação (a sacarose, além do gelucire® utilizado no primeiro estudo) e avaliar a uniformidade de conteúdo dos implantes preparados, na presença e ausência dos LI em estudo. Para este efeito, foi fundamental continuar a utilizar como ativo modelo a cafeína, para dar continuidade ao trabalho iniciado.

1.6. Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetil-1H-purino-2,6(3H,7H)-diona segundo a nomenclatura IUPAC), uma substância hidrofílica, (**Figura 2**) é um dos alcalóides que pode ser encontrada no café, chá, nozes, cacau e noutras plantas (Alstadhaug & Andreou, 2019; Herman & Herman, 2012; Turnbull, Rodricks, Mariano, & Chowdhury, 2017). É descrita como a

substância activa farmacêutica mais ingerida no mundo (Ferré, 2016; Herman & Herman, 2012). O nível típico de consume é uma chávena de café que varia entre 50 a 100 mg. Pode ser utilizada na comida, em suplementos alimentares e em várias preparações farmacêuticas (Alstadhaug & Andreou, 2019; Turnbull et al., 2017).

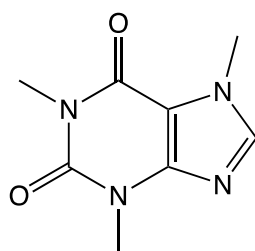


Figura 1: Estrutura da Cafeína.

Após a ingestão oral, a cafeína é rapidamente absorvida no estômago e no intestino (99%). Com um pico de concentração plasmática atingido normalmente dentro de uma hora. A cafeína passa através de todas as barreiras biológicas, incluindo a barreira hematoencefálica (Alstadhaug & Andreou, 2019; Herman & Herman, 2012). É transportada pelo sangue para o Sistema Nervoso Central, sendo muito conhecida por ser um estimulante do mesmo. A cafeína liga-se no cérebro, ao recetor A1 (adenosina) bloqueando-o e ao A2. Tanto a cafeína como a adenosina têm estruturas similares. Ambos podem afetar a liberação dos neurotransmissores como a acetilcolina, a dopamina, a noradrenalina e a serotonina. Ao afetar a liberação destes neurotransmissores, vão estimular o organismo, melhorando a concentração e eliminando a fadiga. A cafeína também inibe a atividade da fosfodiesterase, enzima que é responsável pela degradação do ciclo da adenosina monofosfato. Diminuindo esta molécula, aumenta a pressão sanguínea. No fígado, a cafeína é metabolizada pelo Sistema Oxidativo do Citocromo P450 em 3 derivados da dimetilxantinas: a paraxantina, que aumenta a lipólise, teobromina, que dilata os vasos sanguíneos e a teofilina, que relaxa os músculos lisos dos brônquios. A cafeína é excretada do organismo humano pelos rins em apenas 10% (Herman & Herman, 2012).

Sabe-se, ainda, que o consumo moderado de cafeína não provoca efeitos negativos a nível cardiovasculares, não provoca o desequilíbrio no fluxo e quantidade de moléculas dentro

das células (como o cálcio), não é responsável pela mudança de comportamento nos adultos e não tem efeito na incidência de cancro e na fertilidade masculina (Turnbull et al., 2017).

A cafeína tem demonstrado interesse tanto do ponto de vista farmacêutico como cosmético, sendo vários estudos realizados sobre o efeito da cafeína no organismo humano. Nomeadamente, um estudo demonstrou que uma dose oral de 250 mg de cafeína aumentou 30% a circulação de sangue no cérebro, e que uma dose oral de 100 mg aumentou a microcirculação de sangue na zona ocular (Cameron, Oliver G., Jack G. Modell, 1990). Demonstrando uma aplicabilidade diferente deste composto, um outro estudo demonstrou que uma solução de cafeína a 7% afetou a redução da celulite e melhorou a microcirculação do fluxo sanguíneo em todas as mulheres que fizeram parte do estudo (Herman & Herman, 2012). Assim, a cafeína é usada como analgésico adjuvante da dor, em cosméticos anticelulíticos (Herman & Herman, 2012; Velasco et al., 2008), mas também como antioxidante (Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011) e tem efeitos no crescimento do cabelo (através da inibição da enzima fosfodiesterase, estimulando assim o metabolismo celular para o crescimento de novas células (Vignoli et al., 2011)).

Deste modo, fica claro que a cafeína pode ter inúmeras aplicações relevantes do ponto de vista farmacêutico, sendo uma boa escolha como ativo modelo em diversos estudos, nomeadamente no âmbito do presente trabalho. Assim, neste estudo foram desenvolvidos diversos implantes lipídicos, com diferentes composições e na presença e ausência de LI, com o intuito de avaliar como a presença dos LI irá influenciar a *performance* dos sistemas desenvolvidos, nomeadamente do ponto de vista do perfil de liberação da cafeína e da uniformidade de conteúdo dos sistemas desenvolvidos.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes

Para a preparação da base dos implantes foram utilizados vários reagentes, nomeadamente Dynasan® 118, Tristearato de glicerilo, (Cremer Oleo GmbH, Hamburgo, Alemanha) e Gelucire® 50/02 (GatteFossé, Saint-Priest, França) ou Sacarose (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha). Relativamente aos líquidos iónicos, foram utilizados dois LI derivados de colina, o (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-glutaminato [Cho][Glu] e o (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-fenilalaninato [Cho][Phe], utilizados na preparação dos implantes. Este LI foram sintetizados no âmbito de um outro trabalho decorrer no mesmo grupo de investigação. A substância activa modelo utilizada foi a cafeína da Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, Estados Unidos da América (EUA)).

No que diz respeito à realização do ensaio de uniformidade conteúdo, foram ainda utilizados dois corantes, um de carácter hidrofílico e outro de carácter lipofílico, o azul de metileno (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o sudan III (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) respetivamente.

Aquando da realização do ensaio de libertação foi utilizado, como meio de recolha para os implantes, tampão fosfato pH 7,4 com azida de sódio 0,01 % (m/V), previamente preparado. Já para a realização do ensaio de doseamento, foi ainda usado éter dietílico (PanReac AppliChem® ITW Reagents, Barcelona, Espanha).

2.2. Preparação dos implantes

Todos os implantes lipídicos foram preparados por fusão e moldagem, baseado num método previamente descrito por (Frauke Kreye et al., 2008) com algumas modificações efectuadas pelo nosso grupo (Antunes, 2019) e descritas de seguida.

O lípido foi aquecido até à sua fusão em banho-maria. O fármaco foi dissolvido completamente no lípido fundido, com agitação contínua, após ter sido previamente pulverizado e peneirado com um diâmetro inferior a 100 µm. De seguida, o implante foi pipetado, usando uma pipeta de plástico descartável estéril. Os implantes foram retirados da pipeta após arrefecerem à temperatura ambiente e foram armazenados no exsiccador para remover o excesso de água que poderiam conter. Por fim, os implantes foram cortados em

porções de 0,5 cm cada. A relação lípido:fármaco nos implantes preparados foi de 90:10 % (m/m). A composição dos implantes encontra-se descrita na **Tabela 1**.

Tabela 1: Composição, % m/m, de Implantes Lipídicos com e sem cafeína e com ou sem o LI [Cho][Phe] ou o LI [Cho][Glu].

Formulação	% m/m					
	Dynasan® 118	Gelucire® 50/02	Sacarose	[Cho][Phe]	[Cho][Glu]	Cafeína
A	90,0	-	-	-	-	-
B	89,8	-	-	0,2	-	
C	80,0	10,0	-	-	-	
D	79,8	10,0	-	0,2	-	
E	80,0	-	10,0	-	-	
F	79,8	-	10,0	0,2	-	
G	89,8	-	-	-	0,2	
H	79,8	10,0	-	-	0,2	
I	79,8	-	10,0	-	0,2	
J	100,0	-	-	-	-	10.0
K	99,8	-	-	0,2	-	
L	90,0	10,0	-	-	-	
M	89,8	10,0	-	0,2	-	
N	90,0	-	10,0	-	-	
O	89,8	-	10,0	0,2	-	
P	99,8	-	-	-	0,2	
Q	89,8	10,0	-	-	0,2	
R	89,8	-	10,0	-	0,2	

2.3. Ensaio da uniformidade de conteúdo

O ensaio da uniformidade de conteúdo foi realizado para todos os implantes descritos na **Tabela 1**, utilizando um corante lipofílico a 1% , sudan III (Asmus, Gurny, & Möller, 2011), e um hidrofílico a 1 % (m/m), o azul de metileno (Hyun, 2015).

2.4. Doseamento da cafeína no implante

Para a realização do ensaio de doseamento da cafeína no implante, n=3, efectuou-se a completa dissolução de um implante em 1,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 com azida de sódio 0,01% (m/m) e 0,5 mL de éter dietílico. Colocou-se os implantes em frascos rolhados, sob

agitação e aquecimento a 37 °C numa placa multipontos da IKA® RT 15 P (Staufen, Alemanha).

Retiraram-se alíquotas da fase aquosa, em tempos pré-definidos (90 minutos e 180 minutos) após a mistura dos componentes da formulação, que posteriormente foram analisadas por espectrofotometria UV-visível no espectrofotómetro Evolution® 300 (Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra), ao comprimento de onda de absorção máxima da cafeína, 273 nm.

2.5. Ensaio de libertação

Os implantes, n=5, foram colocados em 1,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 com 0,01 %(m/V) de azida de sódio a 37 °C a 100 rpm, na incubadora Heidolph 1000® com agitação Heidolph Unimax 1010® (Schwabach, Alemanha). Após a preparação dos implantes, seguiu-se o início do ensaio.

Este ensaio de libertação teve uma duração de 140 dias e consistia na recolha e substituição do meio por um meio fresco. Foram efectuadas recolhas todos os dias na primeira semana. Na segunda e terceira semana executaram-se recolhas bissemanais e nos 30 dias que se seguiram foram efetuadas recolhas semanais. Por fim, foram realizadas recolhas bimensais até à última recolha. Durante o ensaio, foi feita a quantificação do ativo no meio de libertação recolhido em cada tempo por espectrofotometria UV-visível a 273 nm. As condições *sink* foram mantidas durante todo o decorrer do ensaio.

2.6. Análise Estatística

As diferenças nos valores médios dos resultados foram avaliadas por análise de variância one-way, ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, DP. As diferenças entre médias individuais foram significativas com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Todas as análises foram realizadas usando o GraphPad Prism 5® da GraphPad Software, EUA.

3. Resultados e Discussão

Neste trabalho foram produzidos implantes contendo a cafeína como substância activa hidrofílica modelo. Os implantes produzidos apresentam diversas constituições, de acordo com o estudo em vista, podendo conter adjuvantes hidrofílicos ou lipofílicos, a Sacarose e o Gelucire® 50/02, respectivamente, e dois líquidos iónicos derivados colina, [Cho][Phe] e [Cho][Glu]. Com a finalidade de avaliar a performance dos diferentes implantes desenvolvidos, foi estudada a uniformidade de conteúdo dos diversos implantes preparados, bem como o perfil de liberação e o doseamento da cafeína dos implantes.

3.1. Desenvolvimento dos Implantes Lipídicos

No âmbito deste trabalho foram preparados diversos sistemas lipídicos, com diferentes composições (**Tabela 1**). De salientar que a percentagem de LI incorporada nos diferentes LI é a percentagem máxima onde é mantida a viabilidade celular (Santos de Almeida, Júlio, Portugal Mota, et al., 2017), uma vez que para comprovar se os LI em estudo poderão funcionar como excipientes funcionais, nestes sistemas lipídicos, essa funcionalidade terá que ser comprovada a percentagens não tóxicas.

De seguida, pretendeu-se avaliar como as diferentes composições das formulações, nomeadamente as que contêm LI na sua composição, irão afetar a uniformidade dos implantes preparados, bem como a liberação da cafeína, o ativo modelo em estudo. Para este efeito, procedeu-se inicialmente à análise da uniformidade de conteúdo dos diversos implantes preparados.

3.1.1. Uniformidade de Conteúdo

O estudo da uniformidade de conteúdo é de extrema relevância, uma vez que permite avaliar a capacidade da composição do implante de incorporar, de forma homogénea, quer ativos hidrofílicos, quer ativos lipofílicos. Para isso, foram utilizados dois corantes, um com propriedades hidrofílicas — o azul de metileno —, e outro com propriedades lipofílicas — o sudan III —. Estes corantes foram incorporados nos diferentes sistemas lipídicos em estudo (**Figuras 3 e 4**).

Dado o objetivo do ensaio ser a avaliação da distribuição de ativos lipofílicos ou hidrofílicos, este ensaio é realizado sem a incorporação de ativos.

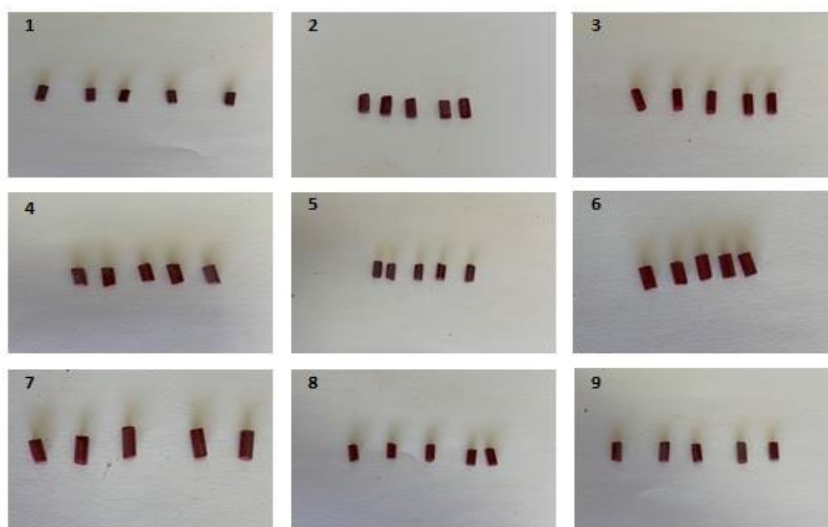


Figura 2: Implantes lipídicos após a execução do ensaio de uniformidade de conteúdo com o corante lipofílico – Sudan III. **a)** Dynasan® 118; **b)** Dynasan® 118 + [Cho][Phe]; **c)** Dynasan® 118 + [Cho][Glu]; **d)** Dynasan® 118 + Sacarose; **e)** Dynasan® 118 + Gelucire® 50/02; **f)** Dynasan® 118 + [Cho][Phe] + Sacarose; **g)** Dynasan® 118 + [Cho][Phe] + Gelucire® 50/02; **h)** Dynasan® 118 + [Cho][Glu] + Sacarose; **i)** Dynasan® 118 + [Cho][Glu] + Gelucire® 50/02.

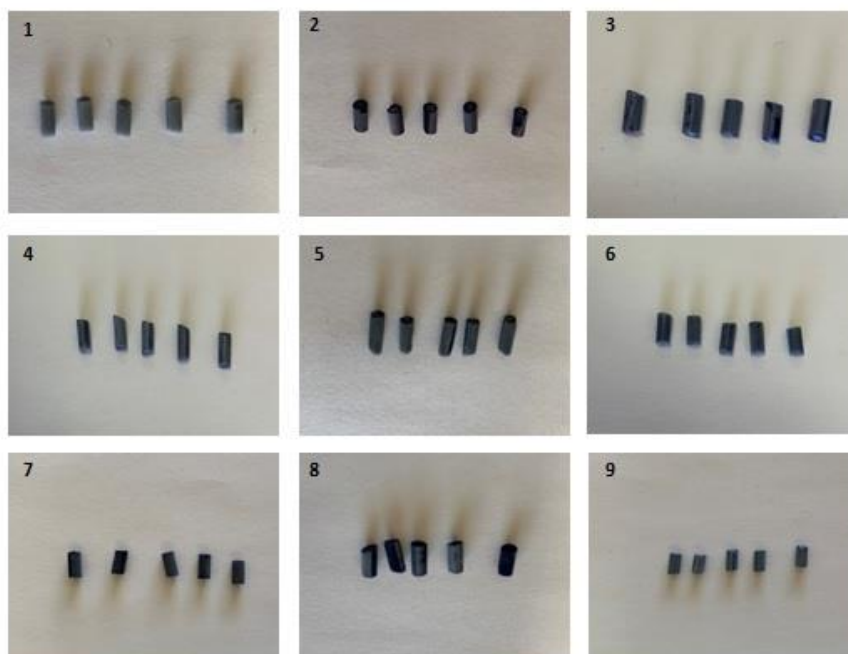


Figura 3: Implantes lipídicos após a execução do ensaio de uniformidade de conteúdo com o corante hidrofílico – Azul de Metileno. **a)** Dynasan® 118; **b)** Dynasan® 118 + [Cho][Phe]; **c)** Dynasan® 118 + [Cho][Glu]; **d)** Dynasan® 118 + Sacarose; **e)** Dynasan® 118 + Gelucire® 50/02; **f)** Dynasan® 118 + [Cho][Phe] + Sacarose; **g)** Dynasan® 118 + [Cho][Phe] + Gelucire® 50/02; **h)** Dynasan® 118 + [Cho][Glu] + Sacarose; **i)** Dynasan® 118 + [Cho][Glu] + Gelucire® 50/02.

Após a realização do ensaio com ambos os corantes, procedemos à análise dos diversos implantes e verificámos que tanto os implantes contendo o corante sudan III, como os implantes contendo azul de metileno na sua constituição apresentam uma cor uniforme entre si.

É ainda relevante referir que em termos da preparação dos implantes foi possível observar uma maior facilidade na mistura dos diversos componentes para os implantes contendo LI, o que pode indicar que a presença dos LI facilita a incorporação dos ativos nos sistemas em estudo.

Adicionalmente, pudemos ainda observar (**Figura 3**), que a intensidade da cor dos diferentes lotes varia, nomeadamente no que diz respeito aos implantes contendo os LI, o que se pode dever ao facto de os próprios LI terem uma coloração. De qualquer forma, e mais relevante, é o facto que entre cada lote existe homogeneidade, ou seja, observa-se uma distribuição uniforme entre os diversos implantes de cada lote, comprovando a uniformidade de conteúdo para cada lote em estudo.

Posto isto, os resultados deste ensaio permitiram demonstrar que usando ambos os corantes e para todas as formulações preparadas se obteve uma distribuição uniforme dos corantes por todo o implante.

Isto significa que existe a possibilidade de incorporar uniformemente substâncias lipofílicas e hidrofílicas.

Na sequência de se demonstrar que o método utilizado para a preparação dos implantes, bem como que os diversos componentes escolhidos, permitem alcançar sistemas uniformes, em termos da incorporação de elementos hidrofílicos ou lipofílicos, procedeu-se de seguida à incorporação do ativo modelo, cafeína, que é uma substância hidrofílica (logP: -0.07; (Pubchem, 2020)). Posteriormente, procedeu-se à avaliação da libertação deste ativo a partir de cada um dos diferentes implantes preparados, na tentativa de compreender como os diferentes constituintes dos implantes influenciam o perfil de libertação da cafeína.

3.1.2. Ensaio de Doseamento

No ensaio de doseamento obteve-se um teor de cafeína superior a 95 % em todos os implantes preparados (**Figura 5**). O teor obtido experimentalmente não apresenta diferenças estatísticas entre as diferentes formulações, o que indica que o ativo foi incorporado uniformemente em todos os implantes, tendo assim uma distribuição homogênea, como pretendido.

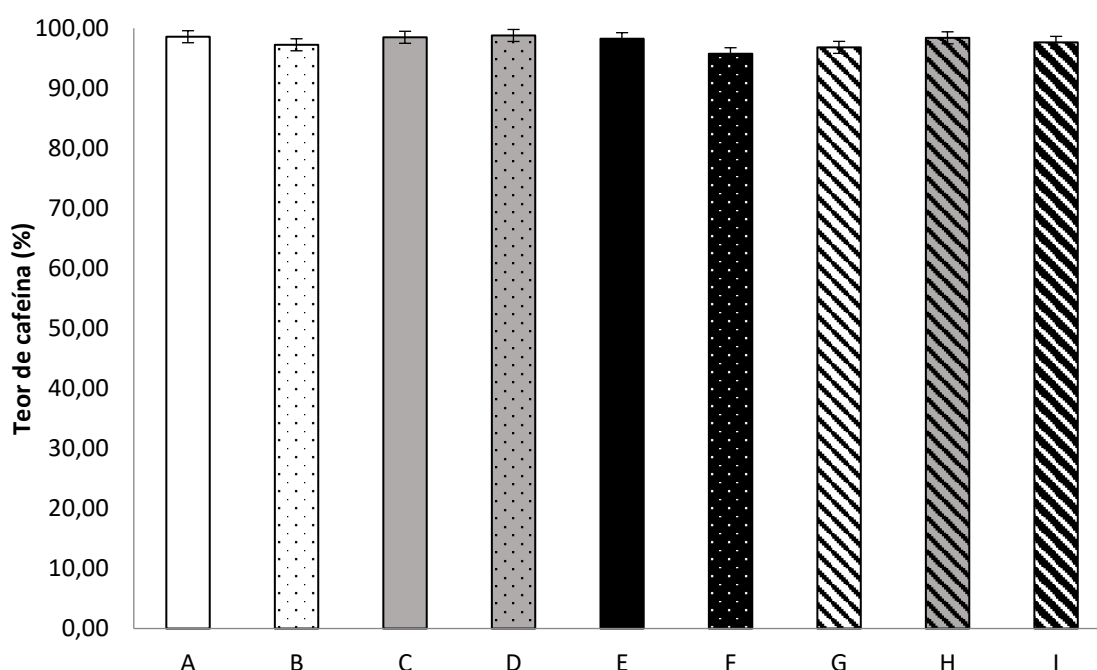


Figura 4: Conteúdo de fármaco nos implantes preparados com **A.:** Dynasan 118, **B.:** Dynasan 118; [Cho][Phe], **C.:** Dynasan 118; Gelucire 50/02, **D.:** Dynasan 118; Gelucire 50/02; [Cho][Phe], **E.:** Dynasan 118; Sacarose e **F.:** Dynasan 118; Sacarose; [Cho][Phe], **G.:** Dynasan 118; [Cho][Glu], **H.:** Dynasan 118; Gelucire 50/02; [Cho][Glu], **I.:** Dynasan 118; Sacarose; [Cho][Glu] ; (média $\pm$ DP, n = 3). Analisado estatisticamente por ANOVA, teste de Tukey.

3.1.3. Ensaio de Libertação *in vitro*

Por fim, procedemos ao estudo dos resultados do ensaio de libertação *in vitro* (**Figura 6**). Este ensaio teve como objectivo avaliar a influência das diferentes constituições dos implantes na libertação da cafeína. Nomeadamente, avaliou-se como a presença de gelucire® e a sacarose poderiam influenciar a libertação do ativo em estudo. E, finalmente, o impacto dos

dois LI estudados. O gelucire® 50/02 é conhecido por aumentar a libertação de fármacos através da formação de ligações por pontes de hidrogénio com a substância activa, originando sólidos estáveis. Este adjuvante é uma mistura de glicéridos e PEG (polietilenoglicol), e a quantidade relativa destes dois componentes é responsável pelas propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas, respectivamente, do veículo (Priyanka D.Dabir, 2018). Por sua vez, sabe-se que aumentar a concentração de sacarose nos implantes lipídicos aumenta o número de poros presentes, aumentando assim a taxa de libertação de ativo (Guse et al., 2006), pelo que será interessante, comparar o impacto de cada um destes componentes na eficiência dos implantes desenvolvidos neste estudo.

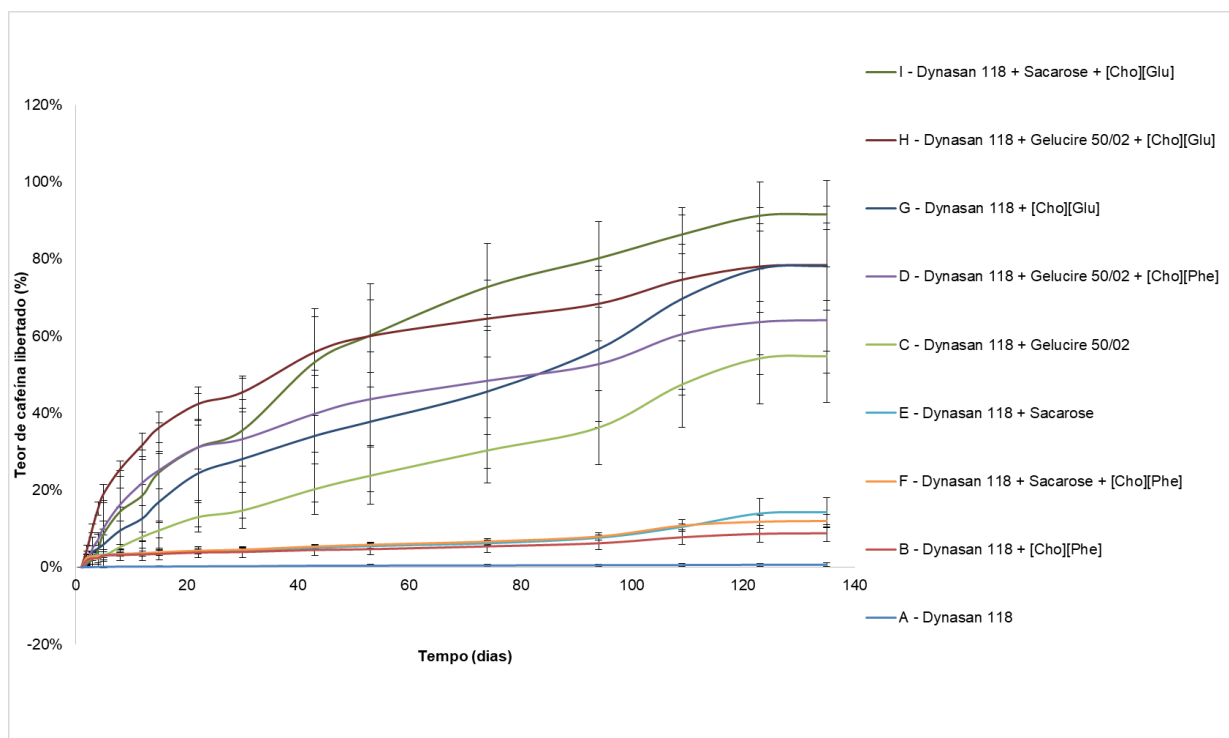


Figura 5: Efeito da composição dos implantes na libertação da cafeína, média $\pm$ DP e n = 5.

Os resultados permitem observar que o **lote A**, que contém somente Dynasan® 118, é o que apresenta um perfil de libertação mais baixo. Este perfil de libertação pode ser explicado pelo facto do Dynasan® 118, ser uma substância muito lipofílica (F. Kreye, Siepmann, & Siepmann, 2011), pode tornar o implante mais compacto, após o arrefecimento do lípido fundido e, dessa forma, não permitir tão facilmente a libertação do activo, mesmo este sendo hidrofílico.

Por outro lado, o **lote I** (Dynasan® 118, Sacarose e [Cho][Glu]) é o que apresenta o perfil de libertação mais rápido ao longo do tempo. Logo de seguida, os **lotes H** (Dynasan® 118, Gelucire® 50/02 e [Cho][Glu]) e **G** (Dynasan® 118 e [Cho][Glu]), também apresentam um perfil de libertação elevado comparativamente aos outros lotes.

Este resultado está de acordo com o esperado uma vez que os lotes dos implantes que contém o LI [Cho][Glu] apresentam uma maior degradação associada. Este fenómeno ocorre pois estes implantes sofreram uma maior fragmentação ao longo do tempo, aumentando a superfície de contacto com o meio e libertando mais cafeína. No entanto e apesar de ambos conterem o mesmo LI, a diferença do perfil de libertação entre o **lote I** e **H**, é significativa, cerca de 20 % de diferença. Estes resultados indicam que, na presença do LI [Cho][Glu], os implantes contendo Sacarose apresentam uma maior degradação comparativamente aos implantes contendo Gelucire® 50/02, havendo uma maior área de contacto e, consequentemente, uma libertação maior do activo no **lote I**.

No que diz respeito à presença de sacarose nos implantes, quando comparado com o Gelucire® 50/02, este componente tem características mais hidrofílicas. Assim, seria de esperar que uma substância hidrofílica, como a cafeína, apresentasse maior afinidade por este meio, conduzindo a uma libertação mais lenta do activo. Efectivamente é isto que se verifica na generalidade dos implantes contendo sacarose, onde a libertação de cafeína é mais baixa, quando comparado com os implantes contendo Gelucire® 50/02. No entanto, nos lotes contendo o LI [Cho][Glu] e sacarose, o perfil de libertação esperado não acontece, como explicado anteriormente. Este facto dever-se-á, possivelmente, à maior tendência para o implante contendo simultaneamente sacarose, que aumenta a porosidade dos sistemas lipídicos (Guse et al., 2006), bem como do LI [Cho][Glu] que parece contribuir para uma maior fragmentação dos implantes, aumentando consequentemente a libertação do ativo.

Adicionalmente, podemos também comprovar que os diferentes LI podem originar perfis de libertação distintos. Efectivamente, ao comparar os **lotes I** e **F**, ambos contendo sacarose, mas com um LI diferente, [Cho][Glu] e [Cho][Phe], respectivamente. Sendo que a diferença do perfil de libertação entre ambos é cerca de 80%, com o LI [Cho][Glu] a originar uma maior libertação de cafeína, provavelmente em consequência de uma maior degradação dos implantes contendo este LI, como referido anteriormente.

Relativamente aos implantes contendo gelucire® 50/02 e cada um dos LI em estudo (**lote D** e **H**), foi mais uma vez possível verificar que os dois LI originam perfis de libertação

distintos. Mais uma vez, o **lote H**, contendo [Cho][Glu], originou um perfil de libertação superior (cerca de 70 %) quando comparado com o **lote D**, na presença do LI [Cho][Phe] (abaixo dos 60 %). É ainda importante salientar que ao comparar os diferentes lotes contendo Gelucire®, na presença de LI (**lotes D e H**) ou na ausência de LI (**lote C**), ambos os lotes contendo LI demonstraram um maior perfil de libertação, comprovando que a presença dos LI em estudo aumenta a libertação da cafeína dos implantes.

Em suma, entre os LI estudados, é perceptível que o que contém o aminoácido glutamina, de alguma forma poderá contribuir para uma maior degradação dos implantes e, consequentemente, para uma maior libertação de cafeína. Pelo contrário, os lotes contendo o LI [Cho][Phe] apresentam uma libertação mais baixa.

A formulação mais apropriada, na presença de LI [Cho][Phe], parece ser a do **lote D**, composta por Dynasan® 118, Gelucire® 50/02 e [Cho][Phe], uma vez que permite uma libertação do fármaco mais controlada ao longo do tempo, ou seja, nem demasiado imediata, nem muito baixa. Neste lote, foi possível obter uma libertação de cafeína superior a 60 %, ao fim de 140 dias, de uma forma mais controlada e homogénea ao longo do tempo, quando comparado com os restantes lotes em estudo.

Com este estudo, foi possível verificar que a presença de líquidos iónicos nos implantes influenciou o perfil de libertação da cafeína, podendo representar uma estratégia relevante para modelar a libertação do ativo. Por esta razão, os LI podem ser excelentes ferramentas para a modificação dos perfis de libertação dos implantes desenvolvidos.

4. Conclusão

No âmbito do presente trabalho pretendeu-se incorporar em implantes lipídicos dois adjuvantes de libertação diferentes, o Gelucire® 50/0 e a sacarose, bem como dois LI, [Cho][Phe] e [Cho][Glu], e avaliar como as diferentes constituições destes sistemas afectariam a performance dos implantes, contendo cafeína.

Neste âmbito, foi avaliada a homogeneidade dos implantes através de um ensaio de uniformidade de conteúdo, utilizando dois corantes, um hidrofílico (azul de metileno) e outro lipofílico (sudan III). Os resultados demonstraram que, para ambos os corantes, foi possível obter implantes com uma distribuição homogénea para as diferentes constituições, demonstrando a robustez do método de preparação.

Adicionalmente, foi também realizado o doseamento da cafeína nos implantes preparados, tendo-se obtido um teor de cafeína superior a 95 %, para todos os implantes. Este teor não apresenta diferenças estatísticas entre as diferentes formulações, o que indica que o activo foi incorporado uniformemente em todos os implantes, tendo assim uma distribuição homogénea, como pretendido.

De seguida, foi efectuado um ensaio de libertação *in vitro* e em condições que mimetizam o organismo humano e controladas ao longo do tempo em que o ensaio decorreu. A análise dos perfis de libertação da cafeína obtidos, permitiu concluir que de um modo geral, os implantes que contendo Gelucire® 50/02, apresentam uma libertação superior comparados aos que contém Sacarose. Isto deve-se ao facto de que o Gelucire® 50/02 tem propriedades lipofílicas, e o activo modelo (a cafeína), tem propriedades hidrofílicas, não tendo afinidade para a formulação e libertando-se mais rapidamente. A única exceção a este acontecimento ocorre para o **lote I**, contendo sacarose, mas que apresentou um perfil de libertação maior devido à presença do LI [Cho][Glu].

Os resultados demonstram que os LI têm influência no perfil de libertação do fármaco, com os implantes contendo o LI [Cho][Glu] a permitir uma maior libertação do ativo quando comparados com os implantes contendo o LI [Cho][Phe]. Nomeadamente, dos implantes contendo LI [Cho][Phe], a formulação contendo Dynasan, Gelucire® 50/02 e [Cho][Phe] parece ser a mais adequada em termos de libertação.

Assim, este estudo permite demonstrar a potencial utilidade de incorporar LI em sistemas de veiculação controlada, com o intuito de modelar o perfil de libertação do ativo.

Seria bastante relevante, de futuro, estudar a incorporação de outros activos nos diferentes implantes, na presença e ausência de LI, bem como incorporar outros LI.

5. Bibliografia

- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*, 303(5665), 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>
- Almeida, T. S. de, 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*, 6(8), 461–473. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0002>
- Alstadhaug, K. B., & Andreou, A. P. (2019). Caffeine and Primary (Migraine) Headaches — Friend or Foe ?, 10(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01275>
- Amaral, V. S. F. (2016). *Implantes Lipídicos: desenvolvimento, liberação in vitro de fármacos e estabilidade*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Antunes, A. M. S. (2019). *Incorporação de Gelucire e de um Líquido Iônico em Implantes Lipídicos*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Asmus, L. R., Gurny, R., & Möller, M. (2011). Solutions for lipophilic drugs: A biodegradable polymer acting as solvent, matrix, and carrier to solve drug delivery issues. *International Journal of Artificial Organs*, 34(2), 238–242. <https://doi.org/10.5301/IJAO.2011.6392>
- 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>
- Bhagwat, R. R. (2013). Novel drug delivery systems: an overview R.R. Bhagwat* and I.S. Vaidhya Department of Quality Assurance, Dr. L.H. Hiranandani College of Pharmacy, C.H.M. College Campus, Opp. Rly Stn., Ulhasnagar- 421003, Maharashtra, India, 4(3), 970–982.
- Biswas, K., & Rao, C. N. R. (2007). Use of ionic liquids in the synthesis of nanocrystals and nanorods of semiconducting metal chalcogenides. *Chemistry - A European Journal*, 13(21), 6123–6129. <https://doi.org/10.1002/chem.200601733>
- Busetti, A., Crawford, D. E., Earle, M. J., Gilea, M. A., Gilmore, B. F., Gorman, S. P., ... Seddon, K. R. (2010). Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids. *Green Chemistry*, 12(3), 420–425. <https://doi.org/10.1039/b919872e>
- Cameron, Oliver G., Jack G. Modell, M. H. (1990). Caffeine and human cerebral blood flow: a positron emission tomography study Oliver G . Cameron , M . D ., Ph . D ., Jack G .

- Modell, M. D., M. Hariharan, Ph. D Department of Psychiatry, University of Michigan Medical Center Summary Positron emiss, 47(c), 1141–1146.
- 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., Baby, A. R., Araújo, M. E. M., Fernandes, A. S., Costa, J. G., & de Almeida, T. S. (2018). Choline-amino acid ionic liquids as green functional excipients to enhance drug solubility. *Pharmaceutics*, 10(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040288>
- Caparica, R., Júlio, A., Rosado, C., & Santos de Almeida, T. (2018). Applicability of ionic liquids in topical drug delivery systems: a mini review. *Journal of Pharmacology & Clinical Research*, 4(5), 555649–555655. <https://doi.org/10.19080/JPCR.2018.04.555649>
- Chen, L., Okuda, T., Lu, X. Y., & Chan, H. K. (2016). Amorphous powders for inhalation drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 100, 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.002>
- Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Góis, J. R., & Gil, M. H. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, 1(1), 164–209. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0001-x>
- Czekanski, L., Santos de Almeida, T., Portugal Mota, J., Rijo, P., & Araújo, M. E. M. (2014). Synthesis of benzoazole ionic liquids and evaluation of their antimicrobial activity. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 11(2), 227–235.
- Di, L., Fish, P. V., & Mano, T. (2012). Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 17(9–10), 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.11.007>
- Dobler, D., Schmidts, T., Klingenhoefer, I., & Runkel, F. (2012). 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>
- E. Golan, David, Armen H. Tashjian Jr, Ehrin J. Armstrong, A. W. A. (2009). *Princípios Fundamentais da Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia* (2ª).
- Earle, M. J., Esperança, J. M. S. S., Gilea, M. A., Lopes, J. N. C., Rebelo, L. P. N., Magee, J. W., Seddon, Kenneth R., Widegren, J. A. (2006). The distillation and volatility of ionic

- liquids. *Nature*, 439(7078), 831–834. <https://doi.org/10.1038/nature04451>
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017a). 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>
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017b). Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chemical Reviews*, acs.chemrev.6b00562. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>
- Feng, D., Peng, T., Huang, Z., Singh, V., Shi, Y., Wen, T., ... Wu, C. (2018). Polymer–surfactant system based amorphous solid dispersion: Precipitation inhibition and bioavailability enhancement of itraconazole. *Pharmaceutics*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020053>
- 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>
- Ferré, S. (2016). Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. *Psychopharmacology*, 233(10), 1963–1979. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4212-2>
- Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids , Their Limits and Applications. *Green and Sustainable Chemistry*, 4(February), 44–53. <https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008>
- Grassin-Delyle, S., Buenestado, A., Naline, E., Faisy, C., Blouquit-Laye, S., Couderc, L. J., Le Guen, M., Fischeler, M., Devillier, P. (2012). Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration - Focus on opioids. *Pharmacology and Therapeutics*, 134(3), 366–379. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.003>
- Gregoriadis, G., & Florence, A. T. (1993). Liposomes in Drug Delivery. *Drugs*, 45(1), 15–28. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345010-00003>
- 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>
- Herman, A., & Herman, A. P. (2012). Caffeine’s mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26(1), 8–14. <https://doi.org/10.1159/000343174>
- 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>

- Hines, R. M., Khumnark, M., Macphail, B., & Hines, D. J. (2019). Administration of Micronized Caffeine Using a Novel Oral Delivery Film Results in Rapid Absorption and Electroencephalogram Suppression. *Frontiers in Pharmacology*, 10(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00983>
- Huang, W., Yang, Y., Zhao, B., Liang, G., Liu, S., Liu, X. L., & Yu, D. G. (2018). Fast dissolving of ferulic acid via electrospun ternary amorphous composites produced by a coaxial process. *Pharmaceutics*, 10(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030115>
- Hyun, D. C. (2015). A Polymeric Bowl for Multi-Agent Delivery. *Macromolecular Rapid Communications*, 36(16), 1498–1504. <https://doi.org/10.1002/marc.201500134>
- J.D.Rodwell. (1989). Antibody mediated delivery systems. *Immunology Today*, 10(2), 68. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(89\)90313-7](https://doi.org/10.1016/0167-5699(89)90313-7)
- Jain, K. K. (2008). Drug Delivery Systems – An Overview. In *Drug Delivery Systems* (Vol. 437, p. 251). <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-210-6>
- 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>
- Júlio, A., Caparica, R., Costa Lima, S. A., Fernandes, A. S., Rosado, C., Prazeres, D. M. F., Reis, S., De Almeida, T., Fonte, P. (2019). Ionic liquid-polymer nanoparticle hybrid systems as new tools to deliver poorly soluble drugs. *Nanomaterials*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/nano9081148>
- 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>
- Kaurav, H., & Kapoor, D. N. (2017). Implantable systems for drug delivery to the brain. *Therapeutic Delivery*, 8(12), 1097–1107. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0082>
- 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>
- Kreye, F., Siepmann, F., & Siepmann, J. (2011). Drug release mechanisms of compressed lipid implants. *International Journal of Pharmaceutics*, 404(1–2), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.048>

- Kreye, Frauke, Siepmann, F., & Siepmann, J. (2008). Lipid implants as drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, 291–307. <https://doi.org/10.1517/17425247.5.3.291>
- Kubota, K., Shibata, A., & Yamaguchi, T. (2016). The molecular assembly of the ionic liquid/aliphatic carboxylic acid/ aliphatic amine as effective and safety transdermal permeation enhancers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.03.002>
- L. Lachman, H. L. and J. L. K. (1986). *The Theory And Practise of Industrial Pharmacy* (3rd editio).
- Lauer, M. E., Maurer, R., De Paepe, A. T., Stillhart, C., Jacob, L., James, R., ... Page, S. (2018). A miniaturized extruder to prototype amorphous solid dispersions: Selection of plasticizers for hot melt extrusion. *Pharmaceutics*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020058>
- Madhav, N. V. S., Shakya, A. K., Shakya, P., & Singh, K. (2009). Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release*, 140(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.016>
- Malamed, S. F. (2010). Sublingual, Transdermal, and Intranasal Sedation. *Sedation*, 124–131. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-05680-9.00011-4>
- Marrucho, I. M., Branco, L. C., & Rebelo, L. P. N. (2014). Ionic liquids in pharmaceutical applications. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 5, 527–546. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060713-040024>
- 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., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). Ionic liquid based microemulsion with pharmaceutically accepted components: Formulation and potential applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 352(1), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.08.035>
- 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>
- 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>
- Patil, J. S., & Sarasija, S. (2012). Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. *Lung India*, 29(1), 44–49. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.92361>
- Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1261–1268. <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>
- Priyanka D.Dabir, P. Y. P. (2018). Gelucire : a Novel Tool in Formulation of Poorly, 7(11), 471–481. <https://doi.org/10.20959/wjpr201811-12497>
- Pubchem. (2020). Caffeine Database. Retrieved January 24, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>
- Rathbone, M. J., & Hadgraft, J. (1991). Absorption of drugs from the human oral cavity. *International Journal of Pharmaceutics*, 74(1), 9–24. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90403-B](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90403-B)
- Romero, A., Santos, A., Tojo, J., & Rodríguez, A. (2008). Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.079>
- S.S.Davis. (2010). Drug delivery systems. *Photochemistry for Biomedical Applications: From Device Fabrication to Diagnosis and Therapy*, 0188(March), 231–275. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0152-0_9
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Portugal Mota, J., Rijo, P., & Reis, C. P. (2017). An emerging integration between ionic liquids and nanotechnology: general uses and future prospects in drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 6(8), 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., Rosado, C., 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>
- Satheesh Madhav, N. V., Semwal, R., Semwal, D. K., & Semwal, R. B. (2012). Recent trends in oral transmucosal drug delivery systems: An emphasis on the soft palatal route. *Expert*

- Opinion on Drug Delivery*, 9(6), 629–647.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2012.679260>
- 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>
- Schwab, M., Sax, G., Schulze, S., & Winter, G. (2009). Studies on the lipase induced degradation of lipid based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 140(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.008>
- Shamshina, J. L., Barber, P. S., & Rogers, R. D. (2013). Ionic liquids in drug delivery. *Exper. Opin. Drug Deliv.*, 10(10).
- Singh, A., & Van den Mooter, G. (2016). Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 100, 27–50.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>
- Spain, C. V., Wright, J. J., Hahn, R. M., Wivel, A., & Martin, A. A. (2016). Self-reported Barriers to Adherence and Persistence to Treatment With Injectable Medications for Type 2 Diabetes. *Clinical Therapeutics*, 38(7), 1653-1664.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.05.009>
- Tiwari, G., Tiwari, R., Bannerjee, S., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Sriwastawa, B. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
- Torimoto, T., Tsuda, T., Okazaki, K. I., & Kuwabata, S. (2010). New frontiers in materials science opened by ionic liquids. *Advanced Materials*, 22(11), 1196–1221.
<https://doi.org/10.1002/adma.200902184>
- Turnbull, D., Rodricks, J. V., Mariano, G. F., & Chowdhury, F. (2017). Caffeine and cardiovascular health. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 89, 165–185.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.025>
- V. R. Vemula, V. Lagishetty, S. L. (2010). Solubility enhancement techniques. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5, 41–55.
- Velasco, M. V. R., Tano, C. T. N., Machado-Santelli, G. M., Consiglieri, V. O., Kaneko, T. M., & Baby, A. R. (2008). Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: Histological evaluation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7(1), 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00357.x>
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols,

- caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3), 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.008>
- 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>
- 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), 2019–2023. <https://doi.org/10.1039/c0gc00070a>
- Yellela, S. R. K. (2010). Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, 2, 28–36.
- 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). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030074>

6. *Scientific Outputs*

Comunicações por Painel

Raposo, M.⁺, Sultane, A.⁺, Júlio, A., Caparica, R., Portugal Mota, J.*, Santos de Almeida, T.*, (⁺ Equal contribution; *Shared senior authorship) (2018). *Applicability of ionic liquids as functional ingredients in lipidic implants*. Comunicação por painel apresentada no 27th EuCheMSil Conference on Molten Salts and Ionic Liquids, Lisboa.