

NADIA AIAZ AMIRALY REMTULA

**IMPACTO DE LÍQUIDOS IÓNICOS NA
SOLUBILIDADE DO ÁCIDO CAFEICO E NA SUA
INCORPORAÇÃO EM GÉIS**

Orientadora: Prof^ª. Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2021

NADIA AIAZ AMIRALY REMTULA

**IMPACTO DE LÍQUIDOS IÓNICOS NA
SOLUBILIDADE DO ÁCIDO CAFEICO E NA SUA
INCORPORAÇÃO EM GÉIS**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 07 de Abril de 2021, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação N.º: 73/2021 de 18 de Março, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof.^a. Doutora Maria Catarina Leite

Orientadora: Prof.^a. Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2021

*Keep your eyes on the stars, and your feet on the
ground.*

Theodore Roosevelt

Agradecimentos

A dissertação de mestrado representa o final de uma das etapas académicas mais importantes. O resultado só foi possível graças ao apoio incondicional de várias pessoas, a quem deixo o meu maior agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Tânia Almeida, por ter acreditado nas minhas capacidades, dentro e fora da sala de aula. Obrigada por me ter acompanhado nesta etapa e por me ter transmitido os seus conhecimentos, de modo a que fosse possível todo o trabalho realizado para a concretização da dissertação.

Seguidamente, gostava de agradecer à Mestre Ana Júlio por todo o trabalho que desenvolveu comigo no laboratório e por me ter ajudado ao longo das diferentes etapas desta dissertação. Deixo um grande agradecimento por tudo o que me ensinaste, e por toda a paciência que tiveste no laboratório, dentro e fora da faculdade.

Deixo também o meu agradecimento a todos os meus colegas. O caminho nem sempre foi fácil. Foram anos de muito estudo e trabalho, mas foram sem dúvida os melhores anos – errei e aprendi, cresci e fiz amizades que levo para o futuro.

Agradeço também a todos os meus amigos, pelo apoio incondicional ao longo destes anos.

Por fim, agradeço ao meu maior pilar – a minha família!

Obrigada por me apoiarem em todas as decisões, e por terem sempre uma palavra de força e conforto nos dias mais difíceis. Obrigada por me darem sempre os melhores conselhos para vencer os obstáculos com sucesso e por caminharem sempre comigo, lado-a-lado.

A todos os que mencionei acima, o meu obrigado! Obrigada por me terem ajudado a preparar-me para o futuro e, acima de tudo, obrigada por me terem ajudado a crescer.

Resumo

A indústria farmacêutica tem desenvolvido novos sistemas de veiculação eficientes, para fazer face a problemas como a baixa solubilidade aquosa, permeação e dificuldades na incorporação de alguns ativos em sistemas de veiculação de fármacos.

Neste âmbito, têm sido estudadas alternativas, como a utilização de líquidos iônicos (LI) como solventes promotores da solubilidade de alguns fármacos e até como estabilizadores das formulações desenvolvidas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se os três LI estudados poderiam aumentar a solubilidade aquosa do ácido cafeico, um composto fenólico com baixa solubilidade, e posteriormente incorporá-lo numa formulação de gel aquosa, na presença de cada um dos LI. Os LI estudados foram os derivados de colina, (2-hidroxiethyl)-trimetilamónio-L-fenilalaninato [Cho][Phe], (2-hidroxiethyl)-trimetilamónio-L-glutamato [Cho][Glu] e (2-hidroxiethyl)-trimetilamónio-glicinato [Cho][Gly].

Os resultados obtidos permitiram concluir que a presença dos LI aumenta a solubilidade do ácido cafeico, sendo o [Cho][Gly] o que teve maior impacto e permitindo um aumento quatro vezes superior.

Relativamente aos géis, as formulações desenvolvidas quer na presença ou ausência do ativo e/ou do LI [Cho][Gly], demonstraram ser estáveis nos estudos de estabilidade preliminar e os resultados demonstraram que o LI aumenta a viscosidade da formulação e permite a incorporação de maior quantidade de ativo no sistema desenvolvido.

Palavra-Chave: Líquidos iónicos; Ácido cafeico; Aumento da solubilidade; Excipiente funcional.

Abstract

The Pharmaceutical Industry has been developing efficient delivery systems to overcome some problems, such as the low water solubility, permeability, and incorporation of poorly soluble drugs.

In this context, some alternatives have been studied, namely the use of ionic liquids (IL), as solubility promoters for some drugs and, even, as stabilizers of the developed formulations.

Thus, the present work aimed at evaluating if the three ILs under study increase the aqueous solubility of caffeic acid, a poorly water-soluble phenolic compound and then incorporate it in aqueous gel formulations, in the presence of each IL. The studied ILs were the choline derivatives, (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-phenylalaninate [Cho][Phe], (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-glutamate [Cho][Glu] and (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-glycinate [Cho][Gly].

The obtained results showed that the studied ILs allowed to enhance the solubility of the caffeic acid, with [Cho][Gly] having the greatest impact allowing a solubility of the active four times superior.

Regarding gels, all formulations developed in the presence or absence of the active substance and / or the IL [Cho][Gly], demonstrated to be stable in the stability studies and the results also showed that the IL enhances the viscosity of the formulations and allows the incorporation of a higher amount of active in the developed system.

Keywords: Ionic liquids; Caffeic acid; Solubility enhancement; Functional excipient.

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

[C₁mim][$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PO}_2$]: Dimetilimidazólio-dimetilfosfato

[Cho][Glu]: (2-hidroxietyl)-trimetilamónio-L-glutamato

[Cho][Gly]: (2-hidroxietyl)-trimetilamónio- glicinato

[Cho][Phe]: (2-hidroxietyl)-trimetilamónio-L-fenilalaninato

[EtNH₃][NO₃]: Nitrato de etilamónio

CAGE: Líquido iónico de colina e geranato

LI: Líquido iónico

ME: Micro-emulsões

mPa: MiliPascal

n: Número de amostras

Índice Geral

Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras	viii
1. Introdução	1
1.1. Introdução geral	2
1.2. Líquidos iônicos	2
1.2.1. Classificação e síntese de líquidos iônicos.....	3
1.2.2. Aplicação de líquidos iônicos em sistemas de veiculação	6
1.2.3. Vantagens e desvantagens dos líquidos iônicos	12
1.3. Compostos fenólicos	14
1.3.1. Ácido Cafeico.....	15
1.3.1.1 Interesse farmacêutico	16
1.3.1.2 Problemática.....	18
2. Material e Métodos.....	20
2.1. Reagentes.....	21
2.2. Estudos de solubilidade	21
2.3. Desenvolvimento do gel aquoso.....	22
2.4. Estudos de estabilidade preliminar	22
2.4.1. Teste de aquecimento gradual ou stress térmico	23
2.4.2. Teste de centrifugação.....	23
2.5. Análise estatística	23
3. Resultados e Discussão	24
3.1. Estudos de solubilidade	25
3.2. Desenvolvimento das formulações gel	27
4. Conclusão	32
5. Referências	34

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de algumas formas farmacêuticas contendo líquidos iônicos como excipientes funcionais e respectivos ativos estudados.	8
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos líquidos iônicos	12
Tabela 3 - Algumas atividades do ácido cafeico descritas na literatura.	16
Tabela 4 - Composição qualitativa e quantitativa dos géis preparados, % m/m, com e sem o LI, [Cho][Gly], e com e sem o ativo, ácido cafeico.	22
Tabela 5 – Imagens macroscópicas das formulações em gel, na ausência ou presença de ativo e ou do LI [Cho][Gly].....	28
Tabela 6 - Resultados obtidos nos testes de estabilidade preliminar (aquecimento gradual e centrifugação).	29
Tabela 7 - Resultados de viscosidade (mPas) apresentada pelo gel sem ativo e sem LI, quando incorporado ativo, o LI [Cho][Gly] e ambos.	30

Índice de Figuras

Figura 1 - Catiões e aniões mais comumente usados nos Líquidos Iónicos.....	3
Figura 2 – Estrutura química do ácido cafeico.....	15
Figura 3 - Solubilidade do ácido cafeico em água ou misturas de água:LI (99,8:0,2, %v/v) a 25 ± 2 °C. n=3, média \pm DP, *** $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Tukey). LI estudados [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly].	26

1. Introdução

1.1. Introdução geral

O desenvolvimento de novos sistemas de veiculação eficientes e inovadores tem sido uma das maiores preocupações da Indústria Farmacêutica, com o objetivo de ultrapassar algumas problemáticas, como a baixa solubilidade aquosa, permeação e incorporação de muitos ativos nestes sistemas de veiculação. Outro desafio que é fundamental considerar está associado ao facto de muitos solventes utilizados nesse desenvolvimento, serem considerados inapropriados e prejudiciais ao meio ambiente e à saúde, tornando-se essencial encontrar novas alternativas (Welton, 1999). Tudo isto resulta numa menor eficiência terapêutica e biodisponibilidade, levando à necessidade de incorporar doses superiores de fármaco para atingir o efeito terapêutico (Júlio et al., 2018; Egorova, Gordeev, & Ananikov, 2017; Ferraz, Branco, Prudêncio, Noronha, & Petrovski, 2011). Assim, a Indústria Farmacêutica tem vindo a desenvolver novos conceitos e abordagens, no sentido de aumentar a eficiência e solubilidade de muitos fármacos, e encontrar novos métodos para a sua formulação (Adawiyah, Moniruzzaman, Hawatulaila, & Goto, 2016).

Atualmente, e com base em diversos estudos realizados, chegou-se à conclusão de que os líquidos iônicos (LI) podem ser muito vantajosos na área farmacêutica, apresentando inúmeras aplicações, nomeadamente como solventes ou como catalisadores na síntese de ativos e, conseqüentemente, o interesse na sua aplicação nesta área tem aumentado consideravelmente. Relativamente a este interesse, os LI podem ainda ser adaptados para alcançar as propriedades físicas e químicas desejáveis à sua aplicação (Júlio et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Mota, Rijo, & Reis, 2017; Ghandi, 2014). Neste sentido, os LI têm sido uma estratégia muito estudada para colmatar alguns destes desafios, devido às suas características e estruturas particulares (Júlio et al., 2018; Welton, 2018; Adawiyah et al., 2016).

1.2. Líquidos iônicos

Os LI têm sido definidos como sais com pontos de fusão inferiores a 100 °C, sendo o primeiro LI, o nitrato de etilamónio - $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$, que possui uma temperatura de fusão de 12 °C, e foi descrito em 1914 (MacFarlane, Kar, & Pringle, 2017; Bicak, 2004; Welton, 1999).

Estes sais são constituídos por catiões, de grande volume e assimétricos, e aniões, desestabilizadores da estrutura dos cristais, que podem ser de origem orgânica ou inorgânica. Alguns deles constituem uma alternativa verde aos solventes orgânicos, podendo ser usados em diversas reações químicas. Adicionalmente, apesar de serem inúmeras as combinações possíveis destes aniões e catiões, existem alguns iões que são mais comumente usados na sua preparação (**Figura 1**) (Egorova et al., 2017; X. Chen, Liu, & Wang, 2010).

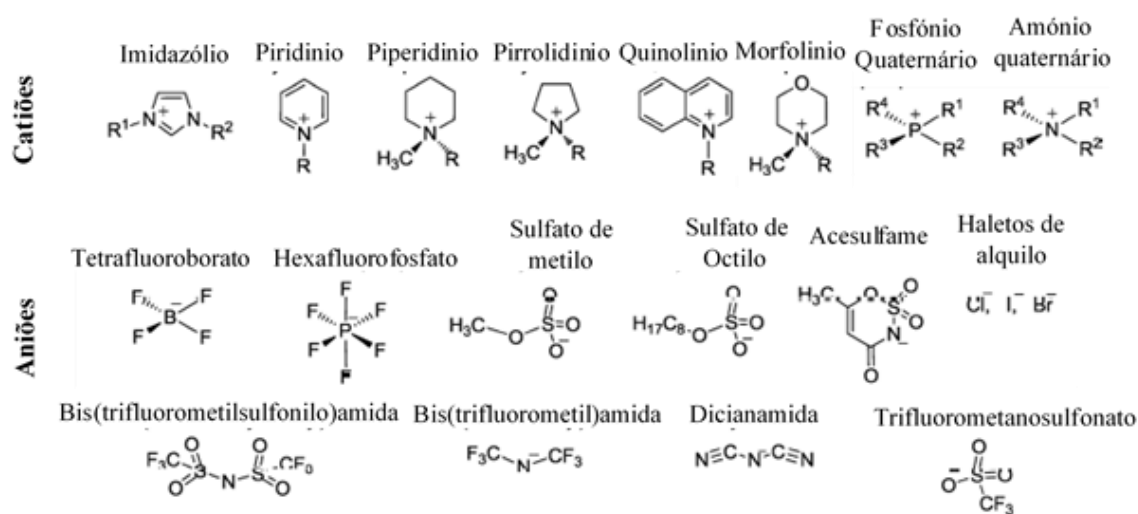


Figura 1 - Catiões e aniões mais comumente usados nos Líquidos Iônicos (Egorova et al., 2017).

1.2.1. Classificação e síntese de líquidos iônicos

No que diz respeito à sua classificação, têm sido divididos em LI próticos (LI de Brönsted) ou apróticos. A diferença entre ambos reside na sua forma de obtenção e na sua estrutura química (Javed, Ullah, Zakaria, & Akil, 2018; Ghandi, 2014; Austen Angell, Ansari, & Zhao, 2012).

O primeiro caso diz respeito a LI obtidos por síntese quando ocorre a transferência de prótons de um ácido de Brönsted para uma base de Brönsted, ou seja, quando são obtidos a partir de reações de neutralização entre ácidos e bases de Brönsted (Greaves & Drummond, 2015, 2008). As características que apresentam, nomeadamente a ionicidade e baixa pressão de vapor, dependem fortemente da relação de forças entre o ácido e a base que determinam a

extensão da transferência de prótons (MacFarlane, Kar, et al., 2017; Greaves & Drummond, 2015, 2008; Ghandi, 2014).

Por outro lado, os LI denominados de apróticos, são assim denominados quando estes são obtidos a partir de outras reações, que não as ácido-base utilizadas para a obtenção dos LI próticos (Santos de Almeida, Júlio, Mota, et al., 2017; Ghandi, 2014; Franco-Vega, Palou, Ramírez-Corona, & López-Malo, 2014). Estes LI caracterizam-se por serem constituídos por catiões não protonados e aniões que se caracterizam por apresentarem uma baixa pressão de vapor, dada a sua ionicidade. Os LI apresentam duas fases de síntese: a formação do catião e a reação de troca iónica (Castillo Borja, 2015; Freemantle, 2010). A síntese destes LI inicia-se com a formação de um catião por meio de uma reação de quaternização, seguida de uma reação de troca iónica que ocorre por metátese - uma reação de troca de iões em dissolução contendo dois pares de iões, com o objetivo de obter um par de iões com maior estabilidade térmica. Esta etapa também pode ocorrer por reação com um ácido de Lewis (Singh & Savoy, 2020; Castillo Borja, 2015; ; Ratti, 2014; Freemantle, 2010).

No que diz respeito a estas classificações e mais especificamente a estas duas vertentes de síntese para a obtenção de LI, o número de estudos sobre os LI próticos têm aumentado ao longo dos anos (Greaves & Drummond, 2015, 2008, Freemantle, 2010) uma vez que de um modo geral estes apresentam uma síntese mais simples, com menos custos de produção, apresentando um melhor perfil toxicológico e melhor biodegradabilidade (Castillo Borja, 2015).

Relativamente à síntese dos LI, esta pode ser descritas em dois métodos (Singh & Savoy, 2020; Ratti, 2014):

(1) **Formação do catião:** A formação do catião que posteriormente irá constituir o LI pode ser por protonação com um ácido ou por reação de quaternização de uma amina com um haloalcano. Esta etapa apresenta vantagens, como o facto de existir um elevado número de haloalcanos a baixo custo, e o facto de as reações ocorrem a temperaturas baixas (Singh & Savoy, 2020; Ratti, 2014).

(2) **Reações de troca iónica:** Estas podem ser divididas em dois tipos, nomeadamente as que dizem respeito ao tratamento dos sais de halogeneto com ácidos de Lewis ou às reações de metátese iónica. O primeiro caso, o tratamento com ácidos de Lewis, é a via mais comum. Estes

levam à formação de mais um anião, que consoante as proporções usadas de halogeneto quaternário, originam LI ácidos, neutros ou básicos. As reações de metátese, são um método de síntese para obtenção de LI estáveis ao ar. Consiste na troca do anião da reação de quaternização por outro, de maior interesse, com o uso de diferentes sais. É um método mais eficiente para a síntese de LI miscíveis com a água, no entanto, apresenta elevados custos e forma uma quantidade substancial de produto secundário, o que limita a sua utilização (Singh & Savoy, 2020; Ratti, 2014).

Deste modo, são diversos os LI que se podem obter por síntese e no que diz respeito à funcionalidade, têm sido várias as propriedades descritas dos LI, sendo estes sais denominados de '*designer solvents*', uma vez que algumas das suas propriedades, como por exemplo a viscosidade, polaridade e a hidrofobicidade, entre outras, podem ser modificadas, aquando da sua síntese, de acordo com uma aplicação específica (Balk, Holzgrabe, & Meinel, 2015; X. Chen et al., 2010; Sowmiah, Srinivasadesikan, Tseng, & Chu, 2009).

Em consequência, a potencial utilidade dos LI deve-se a algumas destas valiosas e manipuláveis propriedades (Singh & Savoy, 2020; Welton, 1999), nomeadamente o facto de estes sais apresentarem:

1. estabilidade química e térmica;
2. baixa pressão de vapor;
3. elevada solubilidade em diversos solventes;
4. incorporação em diferentes tipos de soluções;
5. facilidade de serem alterados estruturalmente de acordo com a aplicação pretendida.

Como resultado das inúmeras combinações possíveis de iões, obtidos por síntese, existe uma grande variedade de possíveis líquidos iónicos que se podem preparar, sendo que já foi descrito que o possível número de diferentes combinações se aproxima de 10^{18} (Egorova et al., 2017). Desta forma, são também inúmeras as propriedades valiosas que poderão ser consideradas aquando do desenvolvimento destes sais e que poderão ser fundamentais no que diz respeito à sua aplicação na área farmacêutica. Nomeadamente, os LI têm sido estudados na síntese química, com a vantagem de permitir que se atinjam rendimentos mais elevados (Cannalire, Tiecco, Cecchetti, Germani, & Manfroni, 2018), na extração de compostos

farmacêuticos em soluções aquosas (Júlio et al., 2018; Álvarez, Esperança, Deive, Sanromán, & Rodríguez, 2015; Marrucho, Branco, & Rebelo, 2014), como solventes e catalisadores de reações químicas para a obtenção de compostos ativos (Júlio et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017; Marrucho et al., 2014; Shamshina, Barber, & Rogers, 2013), como surfactantes em emulsões e microemulsões (Júlio et al., 2018; Dobler, Schmidts, Klingenhöfer, & Runkel, 2012; Zech et al., 2009) e ainda como excipientes funcionais em sistemas de veiculação, para melhorar a sua performance.

1.2.2. Aplicação de líquidos iônicos em sistemas de veiculação

Nos últimos anos, os líquidos iônicos têm atraído uma maior atenção na área farmacêutica, nomeadamente pelas suas propriedades biológicas e pela sua capacidade de poderem funcionar como excipientes funcionais em formulações farmacêuticas. Neste âmbito, diversos estudos têm mostrado a sua eficiência, nomeadamente, para promover a solubilidade e a permeação de fármacos pouco solúveis e na estabilização dos mesmos (Júlio et al., 2019; Egorova et al., 2017; Jain, Patel, & Lin, 2014; Savjani, Gajjar, & Savjani, 2012) e dos sistemas de veiculação em que estes são incorporados (Júlio et al., 2019; Egorova et al., 2017). Para permitir a incorporação destes sais em diferentes sistemas de veiculação, a sua modificação estrutural, de modo a permitir que estes sejam incorporados em diferentes tipos de soluções - aquosas, oleosas ou hidroalcoólicas - pode ser uma característica determinante e consequentemente, têm sido cada vez mais estudados como excipientes em diversas formulações farmacêuticas (Caparica, Júlio, Araújo, et al., 2020; Caparica, Júlio, et al., 2018; Alves et al., 2017; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017; Castillo Borja, 2015; Goindi, Kaur, & Kaur, 2015; Zhou, Luo, & Fu, 2014; W. Tang et al., 2013).

É também de referir que a ação terapêutica de um ativo, implica a sua dissolução no organismo, o que significa que quanto menor a sua solubilidade, menor são as taxas de dissolução e absorção (Jain et al., 2014; Savjani et al., 2012), o que representa um problema no que diz respeito à sua aplicabilidade farmacêutica e à sua formulação (Egorova et al., 2017). Ou seja, a baixa solubilidade em água bem como a baixa taxa de dissolução no trato gastrointestinal são fatores limitantes da biodisponibilidade do ativo (Adawiyah et al., 2016). Outra problemática no desenvolvimento de novos sistemas de veiculação é o facto de as formas

sólidas poderem ser afectadas pelo polimorfismo, ou seja, a ocorrência de cristalização em mais do que uma forma, irá influenciar a eficiência do ativo. Diferentes polimorfos poderão possuir diferenças de solubilidade, absorção e outras diferenças na suas propriedades físicas e químicas (Adawiyah et al., 2016).

Para contornar alguns destes problemas, como a baixa solubilidade e o polimorfismo de alguns ativos, têm sido aplicadas várias estratégias, tais como a formação de sais e derivados – pró-fármacos (Adawiyah et al., 2016; Huttunen, Raunio, & Rautio, 2011), a cristalização controlada para aumentar a probabilidade de descobrir cocristais com potencial atividade (Adawiyah et al., 2016; Dean, Turanjanin, Yoshizawa-Fujita, MacFarlane, & Scott, 2009; Childs et al., 2004), e a trituração para diminuir o tamanho da partícula e consequentemente aumentar a taxa de solubilidade e dissolução pela expansão da área de superfície (Adawiyah et al., 2016; Savjani et al., 2012; Serajuddin, 2007; Berge, Bighley, & Monkhouse, 1997). Como referido anteriormente, os líquidos iônicos têm sido outra estratégia para colmatar algumas destas problemáticas na sequência da sua possível aplicabilidade como excipientes funcionais.

Assim, os líquidos iônicos têm sido utilizados como co solventes, emulsificantes, co polímeros e solventes para a síntese e purificação de compostos farmacêuticos (Adawiyah et al., 2016; Marrucho et al., 2014). Adicionalmente, e uma vez que os LI podem ser aplicados em soluções hidrofílicas ou lipofílicas (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017; Q. Zhao & Anderson, 2012) estes podem ser vantajosos como materiais a incorporar em diferentes sistemas de veiculação. É de referir que é necessário ter em atenção as suas concentrações, para garantir a utilização de concentrações não tóxicas (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Para além disso, os catiões e aniões que constituem o LI influenciam a solubilidade do princípio ativo, sendo que os fármacos hidrofílicos demonstram ter melhor solubilidade nos LI hidrofílicos (Egorova et al., 2017; Mizuuchi, Jaitely, Murdan, & Florence, 2008), enquanto os fármacos hidrofóbicos demonstram-no nos solventes hidrofóbicos (Egorova et al., 2017; Mizuuchi et al., 2008). Esta propriedade faz com que os LI sejam excelentes candidatos para aumentar a solubilidade e a incorporação de ativos menos solúveis em sistemas de veiculação.

Nesse sentido, têm sido realizados diversos estudos considerando diferentes tipos de formulações como géis, nanopartículas, emulsões e microemulsões, de modo a avaliar a aplicabilidade dos LI para facilitar a incorporação de fármacos pouco solúveis em água e melhorar a performance dos sistemas desenvolvidos (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Exemplos de algumas formas farmacêuticas contendo líquidos iônicos como excipientes funcionais e respectivos ativos estudados.

Tipo de formulação	Princípio ativo	LI	Função do LI	Referências
Patches de gel	Insulina	CAGE	Promotor de absorção	(Peng, Shi, LaBarbiera, & Mitragotri, 2020)
Nanopartículas	Sorafenibe	CAGE	Promotor de absorção e solubilidade	(Shi et al., 2020)
Emulsões	Ácido ferúlico	[Cho][Phe] [Cho][Glu]	Promotores de solubilidade	(Caparica, Júlio, et al., 2018)
	Rutina	[Cho][Phe] [Cho][Glu]	Promotores de solubilidade	(Caparica, Júlio, et al., 2018)
	Cafeína	[Cho][Phe] [Cho][Glu]	Promotores de solubilidade	(Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017)
	Ácido salicílico	[Cho][Phe] [Cho][Glu]	Promotores de solubilidade	(Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017)
Géis	Cafeína	[Cho][Phe] [Cho][Glu]	Promotores de solubilidade	(Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017)
	Ácido salicílico	[Cho][Phe] [Cho][Glu]	Promotores de solubilidade	(Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017)
Microemulsões	Aciclovir	[C ₁ mim][(CH ₃ O) ₂ PO ₂]	Promotor de permeabilidade	(Moniruzzaman, Tahara, Tamura, Kamiya, & Goto, 2010)

Neste âmbito, um estudo realizado por Peng et al., utilizou o líquido iônico de colina e geranato (CAGE) como promotor da absorção de insulina num *patch* de gel. Neste estudo, demonstrou-se que a administração conjunta de insulina com CAGE, reduz a concentração de

açúcar no sangue, dada a capacidade do LI em quebrar as junções do epitélio permitindo a passagem de fármaco. Relativamente à sua atividade na absorção intestinal, esta atividade depende da concentração de fármaco. Assim, foram estudados os *patches* muco-adesivos incorporados com CAGE, de modo a compreender o desafio de encapsulação do LI num gel polimérico, com uma libertação controlada de fármaco e LI no intestino delgado. Os resultados permitiram concluir que os CAGE-adesivos apresentam potencial aplicabilidade na veiculação de fármacos (Peng et al., 2020).

Um outro estudo demonstrou novamente as vantagens da utilização do CAGE, neste caso na administração oral de um inibidor multiquinase que apresenta baixa biodisponibilidade oral, que é atribuída à sua baixa solubilidade em água. Concluiu-se que há uma melhoria da solubilidade de sorafenibe, o que aumenta os seus perfis de absorção. Assim, melhora o tempo de semivida, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do mesmo (Shi et al., 2020). A administração de fármacos em nanopartículas é também vantajosa na proteção da molécula, e permite também o ajuste da sua bio distribuição no organismo, o que é vantajoso na redução dos efeitos adversos e para atingir os efeitos terapêuticos desejados (Júlio et al., 2019).

Os sistemas de administração tópica podem apresentar vantagens comparativamente à administração oral e parenteral, nomeadamente pela capacidade de evitar o metabolismo sistémico, reduzindo as doses diárias necessárias, o que leva a uma melhor adesão à terapêutica pelo paciente, pelo que também tem havido um aumento considerável no número de estudos que consideram este tipo de administração. Neste âmbito, várias estratégias têm sido usadas para aumentar a administração de fármacos por esta via, como por exemplo os ultrassons, como promotor físico, os terpenos, glicóis, sulfóxidos, entre outros, como promotores químicos e ainda no que diz respeito a sistemas de veiculação, os lipossomas, as microemulsões, os tranferossomas e as nanopartículas lipídicas sólidas, têm também sido usadas neste âmbito. No entanto, encontra-se descrito que estas táticas poderão não ser adequadas para aplicação diária (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017; Moniruzzaman, Tamura, Tahara, Kamiya, & Goto, 2010).

Nos últimos anos, a aplicação dos líquidos iônicos nesta área, tem sido outra estratégia considerada, nomeadamente para a incorporação de ativos pouco solúveis em sistemas de administração tópica. Os LI de colina têm sido bastante estudados como promotores de solubilidade de várias substâncias pouco solúveis em água a concentrações não tóxicas (Caparica, Júlio, Araújo, et al., 2020).

Um estudo recente, considerou o ácido ferúlico e a rutina, ambos ativos com interesse farmacêutico e cosmético, mas com baixa solubilidade em água, o que se apresenta como fator limitante na sua aplicação farmacêutica. Apesar dessas limitações, o referido estudo considerou a aplicação destas substâncias em formulações tópicas. Para esse efeito, foram desenvolvidas emulsões óleo/água na presença e ausência dos LI [Cho][Glu] e [Cho][Phe]. Os resultados permitiram concluir que os LI estudados permitiram aumentar a solubilidade dos dois fármacos, às temperaturas de 25 °C e 32 °C, e em consequência, permitiram incorporar maiores quantidades de fármaco nos sistemas desenvolvidos (Caparica, Júlio, et al., 2018).

Adicionalmente, um outro estudo considerou a incorporação de cafeína que é hidrofílica e do ácido salicílico, de natureza lipofílica, em emulsões óleo/água e num gel, na presença dos mesmos LI a concentrações não tóxicas. Os resultados demonstraram que os LI de colina são eficientes como promotores de solubilidade de ambos os ativos, sendo que este efeito foi mais pronunciado para a cafeína (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017).

Para além da análise de LI como promotores de solubilidade, outro estudo avaliou a sua capacidade como promotores de permeabilidade na pele, na presença de aciclovir. O aciclovir é um fármaco antiviral, que atua no tratamento do *Herpes simplex* tipo 1 e 2, *Herpes zóster* e vírus *Epstein-Barr*, também ele pouco solúvel em água e em solventes orgânicos comuns. Este pode ser administrado por via tópica, em comprimidos e por via intravenosa. Apresenta pouca biodisponibilidade oral e a administração injetável leva a crises de pânico, o que pode levar a efeitos secundários indesejáveis. Esta molécula pode ser dissolvida em condições acídicas (ácido clorídrico) ou básicas (cloreto de sódio). No que diz respeito ao estudo que considera a aplicação de LI, este mostrou que o LI [C₁mim][[(CH₃O)₂PO₂] permite aumentar a permeabilidade da pele por via transdérmica. Assim, o estudo demonstrou aplicação da incorporação de LI numa microemulsão para a veiculação do aciclovir por via transdérmica (Moniruzzaman, Tahara, et al., 2010).

O facto de os LI apresentarem diversas aplicações, sendo que a maioria dos estudos realizados se focam na utilização destes como promotores de solubilidade, absorção e permeabilidade de ativos pouco ou moderadamente insolúveis em água, pode representar inúmeras vantagens em diferentes vias de administração de fármacos, permitindo contribuir para um aumento da eficácia terapêutica.

É fundamental salientar que as propriedades promissoras destes sais são largamente dependentes da sua estrutura e esta deve ser sempre um factor considerado aquando da sua

aplicação. No que diz respeito à estrutura dos LI, bem como às suas propriedades químicas, os LI têm sido descritos em quatro gerações diferentes.

A primeira geração refere-se à combinação de catiões dialquilimidazólio ou alquilpiridínio com aniões de iodetos metálicos, que chamou a atenção devido às suas propriedades físicas, nomeadamente baixa pressão de vapor e elevada estabilidade térmica, sendo aplicados como solventes (Egorova et al., 2017; Frizzo, P. et al., 2013).

Na segunda geração, os catiões mais usados são os dialquilimidazólio, alquilpiridínio, amónio, fosfónio e os aniões mais usados são halogenetos, tetrafluoroborato e hexafluorofosfato (Egorova et al., 2017). Esta geração demonstrou-se interessante devido às suas propriedades físicas e químicas (Egorova et al., 2017; Frizzo, P. et al., 2013), sendo que se foca no ajuste das características e adaptação das suas propriedades a aplicações específicas como meio reacional, catalisadores, lubrificantes (Balk et al., 2015; Bermúdez, Jiménez, Sanes, & Carrión, 2009) e em processos de separação e extração (Egorova et al., 2017; Balk et al., 2015; B. Tang, Bi, Tian, & Row, 2012). Assim, esta geração apresenta uma potencial utilização em materiais energéticos, lubrificantes, e agentes complexantes de iões metálicos (Balk et al., 2015; Bermúdez et al., 2009) e também em processos de separação e extração (Egorova et al., 2017; Balk et al., 2015; B. Tang et al., 2012).

A terceira geração é composta por iões naturais e biodegradáveis, como por exemplo os aminoácidos e a colina, ou iões com atividade biológica conhecida. Nesta categoria, encontram-se os LI de colina, que têm sido descritos como os que possuem menor toxicidade. Parte do interesse nesta última geração deve-se à sua possível aplicação nos campos da biologia e ecologia (Egorova et al., 2017; Balk et al., 2015).

Finalmente, no que diz respeito à quarta geração, esta diz respeito a líquidos iônicos com propriedades únicas, quando em solução ou em misturas com líquidos iônicos moleculares. As suas propriedades únicas, nomeadamente atividade antimicrobiana e energia livre negativa que é vantajosa a nível de solubilidade/miscibilidade, dependem do equilíbrio na interação entre os iões e o solvente (Gomes, Silva, & Reis, 2019; MacFarlane, Chong, et al., 2017).

Apesar de estes sais apresentarem inúmeras vantagens e propriedades valiosas, resultantes das suas estruturas, estes também apresentam algumas desvantagens que devem sempre que ser igualmente ponderadas em qualquer aplicação, nomeadamente no desenvolvimento de novos sistemas de veiculação.

1.2.3. Vantagens e desvantagens dos líquidos iónicos

Tal como referido anteriormente, os líquidos iónicos dividem-se em quatro gerações. Cada geração apresenta vantagens e desvantagens, tal como mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos líquidos iónicos (Caparica, Julio, Mota, Rosado, & Santos de Almeida, 2018; Tavares, Rodríguez, & Macedo, 2013).

	Vantagens	Desvantagens
Geração 1	- Elevada estabilidade térmica - Baixa volatilidade	- Sensibilidade ao ar e à água - Toxicidade derivada dos catiões e aniões que os constituem
Geração 2	- Estabilidade ao ar e à água	- Elevada toxicidade - Baixa biodegradabilidade - Custo elevado
Geração 3	- Baixa toxicidade - Elevada biodegradabilidade - Baixo custo	- Líquidos iónicos biologicamente ativos são menos apropriados como solventes
Geração 4	- Abordagem inovadora para a química sustentável	- Custo elevado em comparação com os solventes orgânicos

Em relação à primeira geração, os LI apresentam sensibilidade ao ar e à água, que é uma desvantagem, pois a sua reatividade e toxicidade na presença de água, não permite que sejam usados em certas reações químicas a nível biológico. Também é de referir que o facto desta geração ser constituída por aniões cloro-aluminato e catiões dialquilimidazólio e alquilpiridínio, leva a problemas de toxicidade nesta geração (Santos de Almeida, Caparica, Julio, & Reis, 2020; Tavares et al., 2013).

A segunda geração é, ao contrário da primeira, estável ao ar e à água, o que significa que estes LI podem ser usados em áreas como a catálise enzimática, que se refere à utilização de enzimas para catalisar reações químicas. No entanto, a sua elevada toxicidade é desvantajosa, uma vez que nos diferentes sistemas de veiculação, poderá representar um risco para o organismo e consequentemente para a saúde. Também a sua baixa biodegradabilidade é uma desvantagem, uma vez que ao não sofrer rápida decomposição estes LI apresentam um risco para o ambiente, sendo poluentes e não ecológicos. É ainda de referir outra desvantagem que apresentam, nomeadamente o custo elevado, derivado da utilização de fluorinatos e exigência

de purificação dos mesmos (Caparica, Julio, et al., 2018; Tavares et al., 2013; J. Gorke, Srienc, & Kazlauskas, 2010).

A terceira geração apresenta elevada biodegradabilidade e baixa toxicidade. Neste sentido, os LI são ecológicos e quando usados em concentrações seguras, não se apresentam como um risco para saúde. É de referir também os baixos custos, em relação à geração anterior (Santos de Almeida et al., 2020; Tavares et al., 2013).

A quarta e mais recente geração, apresenta-se como uma inovação no campo da química sustentável. O seu elevado custo em relação às gerações anteriores é uma desvantagem, no entanto, a capacidade de reciclagem é um argumento muito usado para contrapor os seus pontos menos favoráveis (Gomes et al., 2019; MacFarlane, Chong, et al., 2017).

No que diz respeito às possíveis desvantagens da aplicação destes sais, nomeadamente na área da saúde, a sua toxicidade é sem dúvida uma das características que deve ser considerada, uma vez que alguns LI podem apresentar elevada toxicidade (Gomes et al., 2019; Santos de Almeida, Júlio, Mota, et al., 2017; Adawiyah et al., 2016; Gouveia et al., 2014).

Por mais relevante que o *outcome* clínico possa ser, se o sistema de administração produzido se revelar tóxico, limita ou mesmo elimina um possível uso terapêutico. Assim, é necessário a realização de mais estudos que se debrucem sobre a toxicidade deste tipo de compostos e dos sistemas em que eles são incluídos.

No entanto, no que diz respeito à toxicidade dos LI, esta pode ser diminuída ao efetuar a escolha apropriada da combinação catião/anião (Adawiyah et al., 2016; Gouveia et al., 2014; Pernak et al., 2011), visto que esta toxicidade, bem como a biodegradabilidade dos LI, é altamente determinada pela sua estrutura (Adawiyah et al., 2016; Amde, Liu, & Pang, 2015; Frade & Afonso, 2010; Morrissey et al., 2009).

Por exemplo, tem sido descrito que, no que diz respeito aos catiões, a presença de uma cadeia lateral de alquilo curta representa uma menor toxicidade mas, no entanto, esses LI apresentam baixa biodegradabilidade enquanto que na presença de cadeias laterais alquilo mais longas, nomeadamente com um número de carbonos superior a 6, os LI apresentam melhor biodegradabilidade (Adawiyah et al., 2016).

Em relação aos aniões, os LI de cadeia linear mais curta, número de carbonos inferior a 3, não se degradam facilmente, ao contrário dos de cadeia linear superior, que apresentam biodegradação total. É ainda de referir que os aniões orgânicos baseados em grupos acetato, sulfato e fosfato são facilmente biodegradáveis (Adawiyah et al., 2016).

Neste âmbito, alguns estudos têm indicado que os LI à base de colina e aminoácido são menos tóxicos (Caparica, Júlio, et al., 2018; Júlio et al., 2018; Adawiyah et al., 2016) e por isso poderão ser mais indicados para uma aplicação na área da saúde, pelo que no presente trabalho foi estudada a aplicação destes LI.

Neste âmbito alguns estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram a aplicação de LI à base de colina, como promotores da solubilidade de compostos fenólicos com baixa solubilidade aquosa, como a rutina e o ácido ferúlico. Apesar destes e outros compostos fenólicos poderem ter potencial do ponto de vista da sua aplicação na área da saúde, a baixa solubilidade de muitos destes ativos limita grandemente a sua aplicação.

Neste sentido, é necessário encontrar estratégias para colmatar esta limitação.

1.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes em plantas e são metabolitos secundários, caracterizando-se como um grupo complexo e largo de substâncias orgânicas. Atuam como agentes de defesa em resposta ao stress, conferindo adstringência, cor, aroma e sabor. Estes estão associados à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, cancro entre outros (Magnani, Isaac, Correa, & Salgado, 2014; De Oliveira & Bastos, 2011).

Podem classificar-se em dois grupos: os polifenóis, no qual se inclui os taninos, os flavonoides e os compostos fenólicos simples, do qual fazem parte os ácidos fenólicos e as cumarinas (Caparica, Júlio, Baby, de Almeida, & Costa, 2020; Arnos, Da Costa, & Schmidt, 2019; Magnani et al., 2014; De Oliveira & Bastos, 2011). No âmbito do presente trabalho será estudado o ácido cafeico, outro ácido fenólico com baixa solubilidade aquosa como o ácido ferúlico.

1.3.1. Ácido Cafeico

O ácido cafeico pertence ao grupo dos compostos fenólicos simples, sendo também designado de ácido 3,4-dihidrohidroxicinâmico (Cizmarova, Hubkova, Bolerazska, Marekova, & Birkova, 2020; Li et al., 2020; Magnani et al., 2014). O ácido cafeico é constituído por um anel aromático 3,4-hidroxilado ligado a um ácido carboxílico por um *trans*-etileno (Monteiro Espíndola et al., 2019).

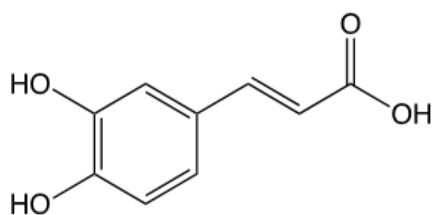


Figura 2 – Estrutura química do ácido cafeico.

A biossíntese do ácido cafeico ocorre pela via endógena do xiquimato, sendo este obtido por extração de solvente com metanol e acetato de etilo a temperaturas elevadas (Haslinger & Prather, 2020; Monteiro Espíndola et al., 2019; Lin & Yan, 2012). Este composto é produzido a partir do metabolismo secundário dos vegetais, nomeadamente azeitonas, grãos de café, fruta e cenouras (Monteiro Espíndola et al., 2019). Constitui o principal ácido hidroxicinâmico encontrado na dieta humana, estando presente na alimentação em frutas como a ameixa, a maçã, o kiwi, a pera e em outros elementos como o vinho, plantas, sementes de girassol, nozes, café, chá e em elevada concentração na casca da batata (Catauro et al., 2020; Monteiro Espíndola et al., 2019; Yilmaz, 2019; Gülçin, 2006; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004; J. H. Chen & Ho, 1997).

Sendo um ácido fenólico muito abundante, representa 75-100 % do conteúdo total de ácidos hidroxicinâmicos na fruta (Monteiro Espíndola et al., 2019; Manach et al., 2004). Este composto fenólico, é encontrado na forma de monómero como éster de ácidos gordos e açúcares, amido e glicosídeos ou em formas mais complexas como dímeros, trímeros e derivados dos flavonoides, encontrando-se ainda ligados a proteínas e outros polímeros na parede da célula vegetal (Catauro et al., 2020; Monteiro Espíndola et al., 2019).

Para além de este ácido fenólico estar presente na alimentação têm sido vários os estudos que têm demonstrado que este composto pode ter relevância farmacêutica.

1.3.1.1 Interesse farmacêutico

O ácido cafeico é um composto fenólico para o qual têm sido descritas diferentes atividades (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Algumas atividades do ácido cafeico descritas na literatura.

Atividades	Referências
Antimicrobiana	(Ani, Varadaraj, & Naidu, 2006)
	(Almajano, Carbó, Delgado, & Gordon, 2007)
	(Magnani et al., 2014)
	(Genaro-Mattos, Maurício, Rettori, Alonso, & Hermes-Lima, 2015)
	(Monteiro Espíndola et al., 2019)
Anticancerígena	(Yilmaz, 2019)
	(Monteiro Espíndola et al., 2019)
	(Haslinger & Prather, 2020)
Antioxidante	(Teng, Wang, Liao, & Lan, 2020)
	(J. H. Chen & Ho, 1997)
	(Gülçin, 2006)
	(Magnani et al., 2014)
	(Monteiro Espíndola et al., 2019)
Antiviral	(Asif & Imran, 2019)
	(Teng et al., 2020)
	(Ikeda et al., 2011)
Antidiabética	(Monteiro Espíndola et al., 2019)
	(Un, Lee, Yong, Jeon, & Choi, 2006)
Cardioprotetora	(Monteiro Espíndola et al., 2019)
	(Agunloye et al., 2019)

Mais concretamente, este composto apresenta capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogénicas, nomeadamente *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e leveduras.

Existem também vários estudos que se concentram na utilização do ácido cafeico no tratamento de doenças da pele (Santos, Spagnol, Guillot, Melero, & Corrêa, 2019; Magnani et al., 2014).

No que diz respeito à atividade anticancerígena, estudos têm referido que a ingestão de alimentos ricos em ácido cafeico pode prevenir o aparecimento de cancro, através do bloqueio da formação de nitrosaminas, conhecidos como indutores desta patologia. A atividade anticancerígena deste composto, apresenta também associação com a sua atividade antioxidante. Neste sentido, o ácido cafeico atua inibindo a formação de espécies reativas de oxigénio e a indução da oxidação do DNA de células cancerígenas (Haslinger & Prather, 2020; Teng et al., 2020; Asif & Imran, 2019; Monteiro Espíndola et al., 2019; Magnani et al., 2014; Gülçin, 2006; J. H. Chen & Ho, 1997).

Outra das atividades atribuídas a este ácido fenólico é a antiviral, que se prende com o facto deste composto ter a capacidade de inibir a multiplicação do vírus *Herpes simplex* (HSV-1), apesar de não o inativar (efeito virucida). Assim, o ácido cafeico interfere antes de o DNA viral completar o ciclo de replicação, tendo a capacidade de se ligar a algumas enzimas e inibir as proteínas necessárias para a interação vírus-hospedeiro (Teng et al., 2020; Haslinger & Prather, 2020; Monteiro Espíndola et al., 2019; Ikeda et al., 2011).

A sua capacidade de aumentar a secreção de insulina e diminuir a produção de glicose hepática, levando a um efeito supressor na progressão de *Diabetes mellitus* tipo 2, confere-lhe atividade antidiabética. É também vantajoso no combate ao *stress* oxidativo, retardando ou prevenindo o aparecimento de Diabetes e respetivas complicações (Monteiro Espíndola et al., 2019; Un et al., 2006).

Adicionalmente, tem também sido descrita atividade cardioprotetora, justificada pelo facto deste ativo ter a capacidade de baixar os valores de pressão arterial, e reduzir a atividade de enzimas envolvidas na hipertensão (enzima conversora de angiotensina, colinesterase, arginase), possuindo assim uma capacidade anti-hipertensiva mais eficiente (Agunloye et al., 2019; Monteiro Espíndola et al., 2019). Tem ainda a capacidade de prevenir as células contra danos oxidativos (Agunloye et al., 2019; Monteiro Espíndola et al., 2019).

Assim, fica claro a potencial aplicação deste ativo na área da saúde, justificando a relevância de continuar a estudar as possíveis aplicações deste composto nesta área.

1.3.1.2 Problemática

Tal como referido anteriormente, um dos desafios que a Indústria Farmacêutica enfrenta relaciona-se com as limitações apresentadas por alguns compostos farmacologicamente ativos, que apesar de poderem ter potencial interesse farmacêutico, apresentam algumas problemáticas como a baixa solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade, que são cruciais para a aplicação destes compostos.

A biodisponibilidade engloba vários processos, nomeadamente libertação da substância, absorção pelo organismo, distribuição, metabolismo e excreção (Cizmarova et al., 2020; Z. Zhao & Moghadasian, 2010; Manach et al., 2004). Estudos sugerem que os polifenóis podem ser absorvidos no trato gastrointestinal e metabolizados no lúmen intestinal, mucosa intestinal, fígado e rim (Cizmarova et al., 2020; Z. Zhao & Moghadasian, 2010; Manach et al., 2004). A família dos polifenóis apresenta baixa absorção no trato gastrointestinal, o que implica que estes não permaneçam um longo período no organismo, o que reduz a sua atividade terapêutica (Arnosso et al., 2019; De Oliveira & Bastos, 2011).

A solubilidade dos compostos fenólicos está relacionada com alguns fatores, nomeadamente a polaridade do solvente, o grau de polimerização, a composição do solvente, e a relação solvente: amostra. É também de referir que os estudos existentes se focam na solubilidade em água de alguns compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos hidroxibenzóicos, o ácido *trans*-cinâmico e o ácido ferúlico (Mira, Barros, Schiocchet, Noldin, & Lanfer-Marquez, 2008; Mota, Queimada, Pinho, & Macedo, 2008). Estes estudos referem que os ácidos hidroxibenzóicos apresentam uma solubilidade mais elevada em água, quando comparados com os ácidos *trans*-cinâmico, ferúlico e cafeico, cuja solubilidade é baixa. Neste sentido, a solubilidade do ácido cafeico apresenta valores na ordem dos $0,98 \pm 0,02$ mg/mL à temperatura de 25 °C (Mota et al., 2008).

Assim, apesar do ácido cafeico possuir diversas atividades com interesse farmacêutico, apresenta algumas limitações, devido à sua baixa solubilidade em água que limita a sua aplicação.

Tendo em conta o referido, o ácido cafeico apresenta um conjunto de propriedades, entre as quais a sua atividade antimicrobiana, que permitem a sua utilização no tratamento de doenças da pele.

Estudos referem a sua utilização no tratamento do acne, uma doença de pele que surge devido à inflamação causada pela bactéria *Propioniumbacterium acnes* (Santos et al., 2019; Magnani et al., 2014) e também na proteção da pele contra a radiação UV, que é responsável pelo aparecimento do eritema e pela destruição das células da pele (Chiang et al., 2015; Han, Ming, & He, 2011; He et al., 2003).

Em consequência, no âmbito deste trabalho, pretendeu-se estudar o impacto de três líquidos iônicos, derivados de colina, na solubilidade do ácido cafeico. Considerando o possível interesse na sua aplicação tópica, foram ainda efetuados estudos relativamente à incorporação do ácido cafeico em géis aquosos na presença e ausência de LI.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes

Na realização do trabalho experimental, foram utilizados três líquidos iónicos derivados de colina, mais especificamente o (2-hidroxiethyl)-trimetilamónio-L-fenilalaninato [Cho][Phe], o (2-hidroxiethyl)-trimetilamónio-L-glutamato [Cho][Glu] e o (2-hidroxiethyl)-trimetilamónio-glicinato [Cho][Gly], previamente sintetizados pelo nosso grupo (Caparica, Júlio, et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017). Como ativo em estudo, foi utilizado ácido cafeico proveniente de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos da América (EUA)).

Para além destes reagentes, no desenvolvimento do gel foi ainda usado Carbopol® 940 (José Vaz Pereira, Benavente, Portugal), propilenoglicol (Fragron, Barcelona, Espanha), trietanolamina (José Vaz Pereira, Benavente, Portugal) e concentrado de parabenos, preparado segundo a Farmacopeia Portuguesa VIII com metilparabeno e propilparabeno da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.2. Estudos de solubilidade

Os estudos de solubilidade foram realizados de acordo com o descrito na literatura (Caparica, Júlio, et al., 2018; Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017). Resumidamente, foram preparadas soluções saturadas de ácido cafeico em água e em misturas água:LI (99,8:0,2) para cada um dos LI em estudo, [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly]. Todas as soluções foram preparadas em triplicado.

De seguida, as soluções foram misturadas no agitador horizontal (IKA VIBRAX VXR®, LTF Labortechnik GmbH & Co., Bodensee, Alemanha) durante um período de 72 h, a uma temperatura de 25 ± 2 °C. As soluções foram filtradas, de seguida. Por fim, foram analisadas no espectrofotómetro UV-visível (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra), no comprimento de onda de absorção máxima (313 nm).

2.3. Desenvolvimento do gel aquoso

Foram preparadas formulações em gel de base aquosa, na presença e na ausência do LI, [Cho][Gly], e com e sem ativo, o ácido cafeico (**Tabela 4**). Todas as matérias-primas foram pesadas previamente. Colocou-se a água destilada e o LI num copo de precipitação. De seguida, o ácido cafeico foi dissolvido sob agitação. Após o ativo estar completamente dissolvido, foi adicionado à mistura o concentrado de parabenos e o propilenoglicol. Por fim, sob agitação vigorosa e em modo chuva, adicionou-se o Carbopol® 940, até se atingir uma formulação homogénea.

Tabela 4 - Composição qualitativa e quantitativa dos géis preparados, % m/m, com e sem o LI, [Cho][Gly], e com e sem o ativo, ácido cafeico.

Componentes	Controlo (sem ativo e sem LI)	Com ativo	Com LI	Com ativo e com LI
Carbopol® 940	0,5	0,5	0,5	0,5
Propilenoglicol	5	5	5	5
Concentrado de parabenos	1	1	1	1
[Cho][Gly]	-	-	0,2	0,2
Ácido Cafeico	-	0,05	-	0,2
Trietanolamina		q.b.p. pH = 5		
Água destilada		q.b.p. 100		

2.4. Estudos de estabilidade preliminar

Para a realização destes estudos, as formulações foram submetidas a um teste de aquecimento gradual ou *stress* térmico e teste de centrifugação. Após estes ensaios foi observada a existência ou inexistência de fenómenos de instabilidade, mais concretamente de separação de fases. Também neste estudo, as características organoléticas, pH e viscosidade de todas as formulações foram analisadas no tempo zero.

2.4.1. **Teste de aquecimento gradual ou stress térmico**

Para cada formulação foram pesados 5,0 g, que de seguida foram colocados num banho termostaticado, partindo de uma temperatura inicial de 40 °C até à temperatura final de 80 °C, sendo que a cada 30 minutos realizou-se um incremento de 10 °C. As amostras foram todas preparadas em triplicado.

2.4.2. **Teste de centrifugação**

Com recurso a um triplicado de amostras, 5 gramas de cada formulação foram centrifugadas, de seguida, durante 30 minutos a 7200 ×g, a 25 °C.

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi executada utilizando o GraphPad Prism 5® by GraphPad Software (San Diego, MO, EUA), através da análise de variância a um fator, ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey das diferenças nos valores médios dos resultados. Os valores encontram-se apresentados no formato de média ± desvio padrão. As diferenças entre as médias individuais foram significativas com * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

3. Resultados e Discussão

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o impacto de três LI derivados de colina, [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly], na solubilidade aquosa do ácido cafeico. Igualmente, pretendeu-se desenvolver uma formulação de administração tópica, nomeadamente um gel, na presença e ausência de LI e avaliar o impacto deste sal na incorporação do ativo estudado e na estabilidade das formulações desenvolvidas.

3.1. Estudos de solubilidade

Por forma a compreender a influência dos LI na solubilidade do ácido cafeico, foram realizados estudos de solubilidade em água e em diferentes misturas de água:LI com o objetivo de avaliar se os LI estudados teriam impacto na solubilidade do ativo. Adicionalmente, e uma vez que se pretende uma aplicação tópica, este estudo considerou resultados de toxicidade dos LI estudados, utilizando uma percentagem dos mesmos onde é mantida a viabilidade celular em células HaCaT, ou seja, queratinócitos humanos. Estes resultados foram obtidos no âmbito de estudos anteriores publicados pelo nosso grupo (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017) e de estudos no âmbito de um projeto de doutoramento a decorrer atualmente no nosso grupo de investigação. Assim, em virtude desses resultados, todos os LI foram incluídos nas misturas numa percentagem de 0,2 % (v/v), garantindo que foi considerada uma aplicação destes LI a percentagens não tóxicas em células HaCaT.

No que diz respeito aos resultados de solubilidade nas diferentes misturas estudadas, estes demonstraram que a solubilidade do ácido cafeico em água, determinada experimentalmente a 25 °C, foi de $0,50 \pm 0,01$ mg/mL (**Figura 3**). Este resultado está de acordo com o que se encontra descrito na literatura que descreve que a solubilidade aquosa do ácido cafeico apresenta um valor inferior a 1 mg/mL (Pubchem, 2020).

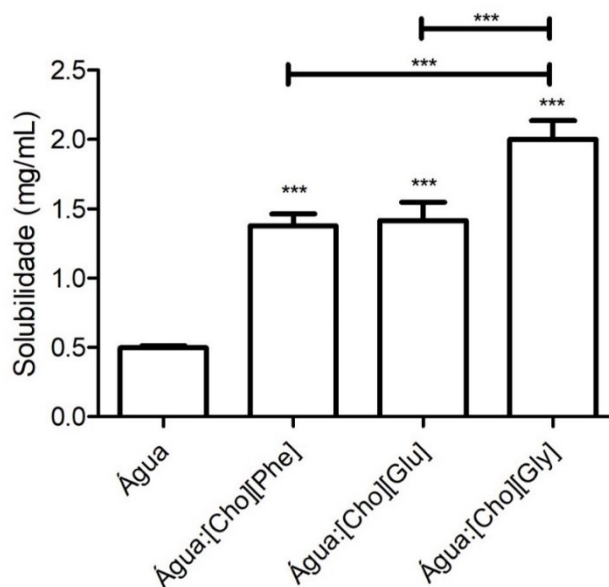


Figura 3 - Solubilidade do ácido cafeico em água ou misturas de água:LI (99,8:0,2, %v/v) a 25 ± 2 °C. $n=3$, média \pm DP, *** $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Tukey). LI estudados [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly].

Já no que diz respeito, à solubilidade do ácido cafeico nas misturas contendo LI, os resultados demonstraram um aumento da solubilidade do ativo na presença de todos os LI estudados, sendo o [Cho][Gly] aquele que permitiu um aumento mais acentuado. Concretamente, nas misturas de água:[Cho][Phe] e água:[Cho][Glu] as solubilidades obtidas foram de $1,38 \pm 0,07$ mg/mL e $1,42 \pm 0,11$ mg/mL, respetivamente (**Figura 3**). Estes resultados representam um aumento de cerca de três vezes na solubilidade do ácido cafeico em comparação com os resultados obtidos em água (**Figura 3**). Ambos os resultados têm diferenças estatisticamente significativas em relação à solubilidade em água. No que diz respeito aos resultados obtidos com estes dois LI não foram observadas diferenças estatísticas entre eles (**Figura 3**). De referir ainda que, outro estudo realizado com o ácido ferúlico, também ele um ácido hidroxicinâmico com baixa solubilidade em meio aquoso (0,64 mg/mL, 25 °C), permitiu concluir que na presença dos LI [Cho][Phe] e [Cho][Glu] foi igualmente possível obter valores de solubilidade superiores, nomeadamente 1,30 mg/mL na presença do LI de fenilalalinato e 1,20 mg/mL para o LI de glicinato (Caparica, Júlio, et al., 2018). Assim, os nossos resultados reforçam o facto que os LI à base de colina, podem ser vantajosos como promotores de solubilidade de ácidos fenólicos.

Finalmente, em relação à mistura de água:[Cho][Gly], o resultado obtido para a solubilidade do ativo estudado na presença deste último LI, foi de $2,0 \pm 0,11$ mg/mL (**Figura 3**). Este resultado é ainda mais promissor, uma vez que demonstra um valor de solubilidade 4x superior ao valor obtido em água.

De salientar ainda que este resultado apresenta uma diferença estatisticamente significativa, não só relativamente aos resultados obtidos em água, mas também relativamente aos resultados obtidos com os outros dois LI estudados.

Desta forma, este estudo permitiu concluir, não só que todos os LI estudados permitem aumentar a solubilidade do ácido cafeico, mas também distinguir o LI que tem um maior impacto no aumento da solubilidade do ativo em estudo.

Eventualmente, este resultado pode dever-se a uma maior afinidade entre o ativo e o LI à base de glicinato, contribuindo para o maior aumento na solubilidade observada.

Na sequência deste resultado e considerando que o ácido cafeico tem sido descrito como um composto com potencial aplicação tópica (Santos et al., 2019; Chiang et al., 2015; Magnani et al., 2014; Han et al., 2011; He et al., 2003), pretendeu-se desenvolver formulações em gel, na presença do LI que conduziu a um maior aumento na solubilidade do ácido cafeico ([Cho][Gly]), com o intuito de avaliar se este sal também teria impacto na incorporação do ácido cafeico em estudo e na estabilidade das formulações desenvolvidas.

3.2. Desenvolvimento das formulações gel

Para o desenvolvimento das formulações em gel, o ácido cafeico foi incorporado no gel, na presença e ausência do LI [Cho][Gly]. O ativo foi incorporado nas formulações à concentração máxima que este é solúvel em água ou na mistura água:[Cho][Gly] (99,8:0,2), ou seja, $0,50 \pm 0,01$ mg/mL e $2,0 \pm 0,11$ mg/mL, respetivamente, de acordo com os resultados obtidos nos estudos de solubilidade.

Para este estudo foram preparadas várias formulações, tal como descrito na **Tabela 4**, nomeadamente: um gel controlo, que não contém LI, nem ativo; um gel com ativo e sem o LI; um gel com o LI e sem o ativo; e um gel com o LI e o ativo.

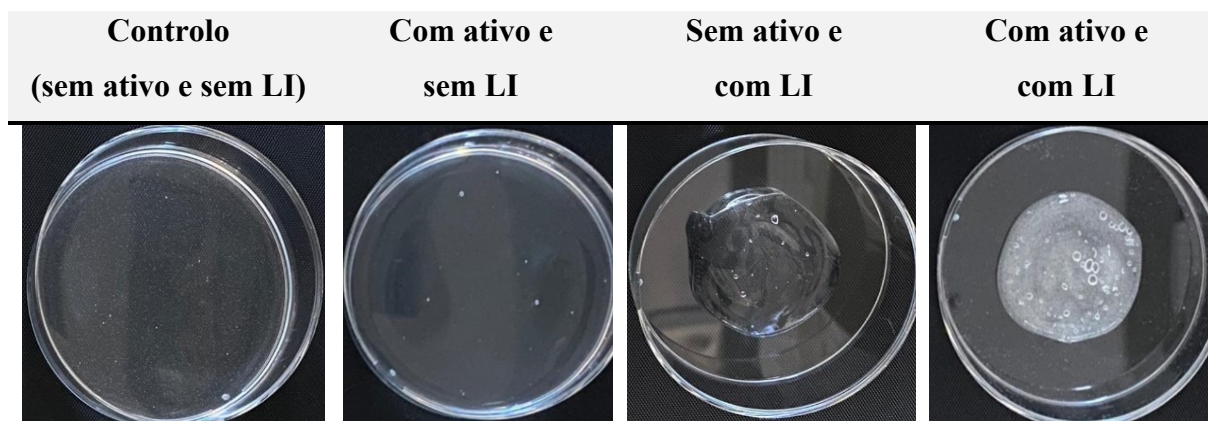
Após a produção das formulações, observou-se a olho nu as características organoléticas dos géis (**Tabela 5**), sendo possível perceber que no gel controlo, ou seja, sem

ativo e sem LI e no gel com ativo, também sem LI, as formulações apresentam-se com um aspeto muito fluido e translucido, pelo que se deduz que apresentarão um valor de viscosidade baixo. Isto indica que na presença de ácido cafeico, o gel parece não apresentar grandes variações em relação ao controlo, esperando-se assim que o ativo não influencie grandemente a viscosidade da formulação.

Já no gel preparado na presença de LI [Cho][Gly], foi possível verificar que este se encontra mais viscoso, uma vez que apresenta uma menor fluidez (**Tabela 5**). Por fim, quando o gel é incorporado com ativo e o LI é possível verificar igualmente uma formulação com menor fluidez.

Estes resultados parecem indicar macroscopicamente que a presença do LI contribui para um aumento da viscosidade do gel. No que diz respeito à coloração, a formulação com LI e ativo, apresenta uma cor visivelmente mais esbranquiçada (**Tabela 5**), que podia ser expectável uma vez que na presença do LI foi possível incorporar uma quantidade 4 vezes superior de ativo.

Tabela 5 – Imagens macroscópicas das formulações em gel, na ausência ou presença de ativo e ou do LI [Cho][Gly].



Para além das características organoléticas, também foram realizados estudos de estabilidade preliminar com o intuito de avaliar se a incorporação do LI nas formulações interfere com a estabilidade das mesmas. Estes estudos são relevantes, uma vez que a formulação é sujeita, num curto período, a condições preliminares extremas, permitindo revelar a estabilidade e o comportamento das formulações sob estas condições, do ponto de vista químico, físico e organolético. Assim, permitem prever possíveis alterações que podem ocorrer

após a comercialização do cosmético (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2004).

Neste sentido, as formulações foram sujeitas a condições extremas, através do teste de aquecimento gradual ou de *stress* térmico e do teste de centrifugação.

Todas as formulações se mostraram termicamente estáveis no teste de aquecimento gradual e fisicamente estáveis no teste de centrifugação (**Tabela 6**). Assim, estes resultados indicam que a introdução do LI, como promotor de solubilidade e da incorporação do ácido cafeico, não interfere com a estabilidade imediata do gel preparado. Em estudos anteriores, também referentes a formulações tópicas contendo LI, mas considerando emulsões O/A e na presença de ácido ferúlico, demonstrou-se que a presença de LI não afetou a estabilidade das formulações e contribuiu para uma maior incorporação de fármaco (Caparica, Júlio, et al., 2018).

Tabela 6 - Resultados obtidos nos testes de estabilidade preliminar (aquecimento gradual e centrifugação).

Teste de estabilidade preliminar	Controlo (sem ativo e sem LI)	Com ativo e sem LI	Com LI e sem ativo	Com ativo e com LI
Aquecimento gradual	Estável	Estável	Estável	Estável
Centrifugação	Estável	Estável	Estável	Estável

Ainda considerando a avaliação das propriedades dos géis desenvolvidos, a interação entre a superfície da pele e as formulações é um fator que deve ser ponderado quando se desenvolvem formulações tópicas. Neste sentido, e uma vez que as propriedades físicas e químicas de uma formulação têm impacto na superfície da pele, é relevante realizar estudos reológicos, a nível da textura e a nível sensorial, como por exemplo avaliar a viscosidade e a consistência. Assim, foram também avaliadas as viscosidades dos géis, procurando comprovar o que foi observado macroscopicamente e que indicou que a presença de LI deverá aumentar consideravelmente a viscosidade das formulações.

A viscosidade é uma característica reológica, que descreve a fluidez de um líquido, nomeadamente, a resistência que um fluido possui ao escoamento. Ou seja, uma viscosidade

mais elevada, indica uma elevada resistência ao escoamento, logo quanto maior a viscosidade, menor a velocidade com que o líquido se movimenta (Quinones & Ghaly, 2008; Corrêa, Junior, Ignácio, & Leonardi, 2005). Este parâmetro pode ser alterado de forma a tornar uma formulação mais apelativa para o consumidor, utilizando diferentes componentes para este efeito como surfactantes e estabilizadores da formulação, pois estes atuam como fatores tixotrópicos (Calixto, Infante, & Campos, 2018).

No caso concreto das formulações em gel desenvolvidas, a viscosidade reflete a sua consistência, tal como observado na **Tabela 5** (Dantas et al., 2016; Shinde, Pokharkar, & Modani, 2012). Mais concretamente, os resultados obtidos indicam que a formulação controlo – sem ativo e sem LI – apresenta uma viscosidade semelhante à da formulação com ativo e sem LI (sem diferenças estatísticas entre eles), quando comparadas com as formulações contendo o LI (**Tabela 7**). De facto, no que diz respeito aos géis na presença do LI [Cho][Gly], a viscosidade aumenta consideravelmente relativamente aos géis na ausência deste sal (**Tabela 7**). Estes dados estão de acordo com os resultados observados macroscopicamente (**Tabela 5**), onde é claramente visível que os géis na presença do LI apresentam uma aparência mais viscosa.

Tabela 7 - Resultados de viscosidade (mPas) apresentada pelo gel sem ativo e sem LI, quando incorporado ativo, o LI [Cho][Gly] e ambos.

	Controlo (sem ativo e sem LI)	Com ativo e sem LI	Com LI e sem ativo	Com ativo e com LI
Viscosidade (mPas)	1692,0 ± 23,1	1100,7 ± 58,5	14880,0 ± 256,4	11086,7 ± 81,4

Finalmente, torna-se fundamental salientar que na presença do LI foi possível incorporar uma maior quantidade de ácido cafeico, comparativamente com a formulação sem LI, devido à maior solubilidade deste ativo na presença deste sal. Mais uma vez, este estudo demonstra a capacidade dos LI à base de colina para aumentar a incorporação de ativos pouco solúveis em formulações tópicas, tal como tem sido descrito para outro tipo de formulações, como emulsões e microemulsões e considerando outros ativos como, ácido ferúlico

(Caparica, Júlio, et al., 2018), rutina (Caparica, Júlio, et al., 2018) ácido salicílico (Santos de Almeida, Júlio, Saraiva, et al., 2017), e o aciclovir (Moniruzzaman, Tahara, et al., 2010).

Deste modo, este estudo permitiu mais uma vez demonstrar que os LI à base de colina, a concentrações não tóxicas, podem funcionar como excipientes funcionais em sistemas de veiculação, nomeadamente, na aplicação de ácido cafeico em formulações tópicas, como géis, permitindo não só aumentar a solubilidade e a incorporação de ativos pouco solúveis nestas formulações, mas podendo ainda ter impacto em parâmetros físico-químicos dos sistemas, como a viscosidade.

4. Conclusão

O trabalho experimental realizado teve como objetivo avaliar o impacto de três líquidos iônicos à base colina, [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly], na solubilidade do ácido cafeico a 25 °C, um ativo com possível aplicabilidade farmacêutica, mas com baixa solubilidade aquosa. Os estudos de solubilidade foram efetuados em água e em misturas água:LI, utilizando estes sais a percentagens não citotóxicas. De seguida, foram também desenvolvidas formulações em gel na presença e ausência do ativo estudado e na presença e ausência de LI.

Relativamente aos estudos de solubilidade, os resultados permitiram concluir que a solubilidade do ativo aumenta na presença de todos os LI em estudo, mas apresenta um aumento mais significativo na presença de [Cho][Gly]. Considerando este resultado, as formulações em gel foram desenvolvidas na presença deste LI.

Todos os géis preparados apresentaram estabilidade, nomeadamente na ausência de ativo e de LI (controlo), na presença de ativo e sem LI, bem como na presença do LI e sem o ativo e na presença de ativo e de LI. Estes resultados demonstraram que o LI não afetou a estabilidade das formulações desenvolvidas.

A quantidade de ácido cafeico incorporada foi sempre a quantidade máxima desse ativo que é solúvel em água ou na mistura água:LI [Cho][Gly] (99,8:0,2). Deste modo, foi possível verificar que na presença de LI foi possível incorporar uma maior quantidade de ácido cafeico nas formulações, devido à sua maior solubilidade na presença do LI.

Adicionalmente, verificou-se ainda que os géis desenvolvidos na presença do LI demonstraram possuir uma maior viscosidade. Este resultado indica que o LI estudado tem impacto neste parâmetro, fator que poderá futuramente ser considerado no processo de formulação e possivelmente representar uma nova funcionalidade destes sais.

Assim, este estudo demonstra que os LI estudados podem ser úteis como excipientes funcionais, em formulações contendo ácido cafeico, mais concretamente como promotores da sua solubilidade. Finalmente, o LI [Cho][Gly] demonstrou ser o que permitiu um maior aumento na solubilidade do ácido cafeico estudado, permitindo de seguida a incorporação de uma quantidade 4 vezes superior deste ativo e permitindo obter formulações estáveis na sua presença.

5. Referências

- Adawiyah, N., Moniruzzaman, M., Hawatulaila, S., & Goto, M. (2016). Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems. *MedChemComm*, 7, 1881–1897. <https://doi.org/10.1039/c6md00358c>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2004). *Cosmetic Products Stability Guide. Quality in Cosmetics Series* (Social and, Vol. 1). Brasil. Retrieved from http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107922/guide_stability_series.pdf/5f90ee5b-c77b-4c1e-91f9-5fa680b05022
- Agunloye, O. M., Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Ademosun, A. O., Akindahunsi, A. A., Oyagbemi, A. A., ... Adedapo, A. A. (2019). Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.044>
- Almajano, M. P., Carbó, R., Delgado, M. E., & Gordon, M. H. (2007). Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *Journal of Food Science*, 72(5), 58–63. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00387.x>
- Álvarez, M. S., Esperança, J. M. S. S., Deive, F. J., Sanromán, M. Á., & Rodríguez, A. (2015). A biocompatible stepping stone for the removal of emerging contaminants. *Separation and Purification Technology*, 153, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.08.039>
- Alves, M., Vieira, N. S. M., Rebelo, L. P. N., Araújo, J. M. M., Pereira, A. B., & Archer, M. (2017). Fluorinated ionic liquids for protein drug delivery systems: Investigating their impact on the structure and function of lysozyme. *International Journal of Pharmaceutics*, 526, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.002>
- Amde, M., Liu, J. F., & Pang, L. (2015). Environmental Application, Fate, Effects, and Concerns of Ionic Liquids: A Review. *Environmental Science and Technology*, 49(21), 12611–12627. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03123>
- Ani, V., Varadaraj, M. C., & Naidu, K. A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology*, 224, 109–115. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0295-z>

- Arnos, B. J. de M., Da Costa, G. F., & Schmidt, B. (2019). Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. *Nutrição Brasil*, 18, 39–48. <https://doi.org/10.33233/nb.v18i1.1432>
- Asif, M., & Imran, M. (2019). Synthetic methods and pharmacological potential of some cinnamic acid analogues particularly against convulsions. *Progress in Chemical and Biochemical Research*, 2(4), 192–210. <https://doi.org/10.33945/sami/pcbr.2019.4.5>
- Austen Angell, C., Ansari, Y., & Zhao, Z. (2012). Ionic Liquids: Past, present and future. *Royal Society of Chemistry*, 9–27. <https://doi.org/10.1039/c1fd00112d>
- 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>
- Berge, M. S., Bighley, D. L., & Monkhouse, C. D. (1997). Pharmaceutical Salts. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(1), 1–19.
- Bermúdez, M. D., Jiménez, A. E., Sanes, J., & Carrión, F. J. (2009). Ionic liquids as advanced lubricant fluids. *Molecules*, 14, 2888–2908. <https://doi.org/10.3390/molecules14082888>
- Bicak, N. (2004). A new ionic liquid: 2-hydroxy ethylammonium formate. *Journal of Molecular Liquids*, 116, 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2004.03.006>
- Calixto, L. S., Infante, V. H. P., & Campos, P. M. B. G. M. (2018). Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. *AAPS PharmSciTech*. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0960-0>
- Cannalire, R., Tiecco, M., Cecchetti, V., Germani, R., & Manfroni, G. (2018). Advantageous Use of Ionic Liquids for the Synthesis of Pharmaceutically Relevant Quinolones. *European Journal of Organic Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800415>
- Caparica, R., Júlio, A., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., Fonte, P., Costa, J. G., & de Almeida, T. S. (2020). Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells. *Biomolecules*, 10. <https://doi.org/10.3390/biom10020233>
- Caparica, R., Júlio, A., Baby, A. R., Araújo, M. E. M., Fernandes, A. S., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2018). Choline-amino acid ionic liquids as green functional excipients to enhance drug solubility. *Pharmaceutics*, 10(288), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040288>

- Caparica, R., Júlio, A., Baby, A. R., de Almeida, T. S., & Costa, J. G. (2020). In vitro cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.19277/bbr.17.1.225>
- Caparica, R., Julio, A., Mota, J. P., 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), 1–7. <https://doi.org/10.19080/jpcr.2018.04.555649>
- Castillo Borja, F. (2015). Líquidos iónicos: métodos de síntesis y aplicaciones. *Conciencia Tecnológica*, (49), 52–56.
- Catauro, M., Barrino, F., Dal Poggetto, G., Crescente, G., Piccolella, S., & Pacifico, S. (2020). New SiO₂/Caffeic Acid Hybrid Materials: Synthesis, Spectroscopic Characterization, and Bioactivity. *Materials*, 13, 394. <https://doi.org/10.3390/ma13020394>
- Chen, J. H., & Ho, C. T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374–2378. <https://doi.org/10.1021/jf970055t>
- Chen, X., Liu, J., & Wang, J. (2010). Ionic liquids in the assay of proteins. *Analytical Methods*, 2, 1222–1226. <https://doi.org/10.1039/c0ay00342e>
- Chiang, H. M., Chen, C. W., Chen, C. C., Wang, H. W., Jhang, J. H., Huang, Y. H., & Wen, K. C. (2015). *Role of Coffea arabica Extract and Related Compounds in Preventing Photoaging and Photodamage of the Skin. Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00058-9>
- Childs, S. L., Chyall, L. J., Dunlap, J. T., Smolenskaya, V. N., Stahly, B. C., & Stahly, G. P. (2004). Crystal engineering approach to forming cocrystals of amine hydrochlorides with organic acids. Molecular complexes of fluoxetine hydrochloride with benzoic, succinic, and fumaric acids. *Journal of the American Chemical Society*, 126(41), 13335–13342. <https://doi.org/10.1021/ja048114o>
- Cizmarova, B., Hubkova, B., Bolerazska, B., Marekova, M., & Birkova, A. (2020). Caffeic acid: a brief overview of its presence, metabolism, and bioactivity. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 3(4), 81. <https://doi.org/10.31989/bchd.v3i4.692>

- Corrêa, N. M., Junior, F. B. C., Ignácio, R. F., & Leonardi, G. R. (2005). Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1). <https://doi.org/10.1590/s1516-93322005000100008>
- Dantas, M. G. B., Reis, S. A. G. B., Damasceno, C. M. D., Rolim, L. A., Rolim-Neto, P. J., Carvalho, F. O., ... Da Silva Almeida, J. R. G. (2016). Development and Evaluation of Stability of a Gel Formulation Containing the Monoterpene Borneol. *Scientific World Journal*, 2016, 4. <https://doi.org/10.1155/2016/7394685>
- Dean, P. M., Turanjanin, J., Yoshizawa-Fujita, M., MacFarlane, D. R., & Scott, J. L. (2009). Exploring an anti-crystal engineering approach to the preparation of pharmaceutically active ionic liquids. *Crystal Growth and Design*, 9(2), 1137–1145. <https://doi.org/10.1021/cg8009496>
- De Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de Ácidos fenólicos. *Quimica Nova*, 34(6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600023>
- Dobler, D., Schmidts, T., Klingenhöfer, 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>
- 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, 7132–7189. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>
- 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>
- Frade, R. F. M., & Afonso, C. A. M. (2010). Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview. *Human and Experimental Toxicology*, 29(12), 1038–1054. <https://doi.org/10.1177/0960327110371259>
- Franco-Vega, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N., & López-Malo, A. (2014). Líquidos iónicos: una alternativa “ verde ” para procesos de extracción en la industria de alimentos, 8(1), 15–26.
- Freemantle, M. (2010). *An Introduction to ionic liquids*. Royal Society of Chemistry.

- Frizzo, P., C., Gindri M., I., Tier Z., A., Buriol, L., Moreira N., D., & P. Martins, M. A. (2013). Pharmaceutical Salts: Solids to Liquids by Using Ionic Liquid Design. In *Ionic Liquids - New Aspects for the Future* (1st ed., pp. 557–579). <https://doi.org/10.5772/51655>
- Genaro-Mattos, T. C., Maurício, Â. Q., Rettori, D., Alonso, A., & Hermes-Lima, M. (2015). Antioxidant activity of Caffeic acid against iron-induced free radical generation-A chemical approach. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129963>
- Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *Green and Sustainable Chemistry*, *4*, 44–53. <https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008>
- Goindi, S., Kaur, R., & Kaur, R. (2015). An ionic liquid-in-water microemulsion as a potential carrier for topical delivery of poorly water soluble drug: Development, ex-vivo and in-vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, *495*(2), 913–923. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.066>
- Gomes, J. M., Silva, S. S., & Reis, R. L. (2019). Biocompatible ionic liquids : fundamental behaviours and applications. <https://doi.org/10.1039/c9cs00016j>
- Gorke, J., Srienc, F., & Kazlauskas, R. (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *15*, 40–53. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3079-z>
- Gorke, J. T., Srienc, F., & Kazlauskas, R. J. (2008). Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chemical Communications*, (10), 1235–1237. <https://doi.org/10.1039/b716317g>
- 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>
- Greaves, T. L., & Drummond, C. J. (2008). Protic Ionic Liquids : Properties and Applications. *Chemical Reviews*, *108*(1), 206–237.
- Greaves, T. L., & Drummond, C. J. (2015). Protic Ionic Liquids : Evolving Structure – Property Relationships and Expanding Applications. *Chemical Reviews*, *115*(20), 11379–11448. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00158>
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, *217*, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.011>

- Han, W., Ming, M., & He, Y. Y. (2011). Caffeine promotes ultraviolet B-induced apoptosis in human keratinocytes without complete DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 22825–22832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222349>
- Haslinger, K., & Prather, K. L. J. (2020). Heterologous caffeic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is affected by choice of tyrosine ammonia lyase and redox partners for bacterial Cytochrome P450. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01300-9>
- He, Z., Ma, W. Y., Hashimoto, T., Bode, A. M., Yang, C. S., & Dong, Z. (2003). Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Research*, 63, 4396–4401.
- Huttunen, K. M., Raunio, H., & Rautio, J. (2011). Prodrugs—from serendipity to rational design. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 750–771. <https://doi.org/https://doi.org/10.1124/pr.110.003459>
- Ikeda, K., Tsujimoto, K., Uozaki, M., Nishide, M., Suzuki, Y., Koyama, A. H., & Yamasaki, H. (2011). Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *International Journal of Molecular Medicine*, 28, 595–598. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.739>
- Jain, S., Patel, N., & Lin, S. (2014). Solubility and dissolution enhancement strategies: Current understanding and recent trends. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(6), 875–887. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.971027>
- Javed, F., Ullah, F., Zakaria, M. R., & Akil, H. M. (2018). An approach to classification and hi-tech applications of room-temperature ionic liquids (RTILs): A review. *Journal of Molecular Liquids*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.09.005>
- 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., ... Fonte, P. (2019). Ionic liquid-polymer nanoparticle hybrid systems as new tools to deliver poorly soluble drugs. *Nanomaterials*, 9. <https://doi.org/10.3390/nano9081148>

- Li, Y., Mao, J., Liu, Q., Song, X., Wu, Y., Cai, M., ... Qiao, M. (2020). De Novo Biosynthesis of Caffeic Acid from Glucose by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, *9*, 756–765. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00431>
- Lin, Y., & Yan, Y. (2012). Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microbial Cell Factories*, *11*(42), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-42>
- MacFarlane, D. R., Chong, A., Forysth, M., Kar, M., Vijayaraghavan, R., Somers, A., & Pringle, J. M. (2017). New Dimensions in Salt-Solvent mixtures: A 4th Evolution of Ionic Liquids. <https://doi.org/10.1039/C7FD00189D>
- MacFarlane, D. R., Kar, M., & Pringle, J. M. (2017). *Fundamentals of Ionic Liquids*. Germany.
- Magnani, C., Isaac, V. L. B., Correa, M. A., & Salgado, H. R. N. (2014). Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical Methods*, *6*(10), 3203–3210. <https://doi.org/10.1039/c3ay41807c>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- 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>
- Mira, N. V. M. de, Barros, R. M. C., Schiocchet, M. A., Noldin, J. A., & Lanfer-Marquez, U. M. (2008). Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, *28*(4), 994–1002. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000400036>
- 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*, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.01.002>
- Moniruzzaman, M., Tahara, Y., Tamura, M., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). Ionic liquid-assisted transdermal delivery of sparingly soluble drugs. *Chemical Communications*, *46*(9), 1452–1454. <https://doi.org/10.1039/b907462g>

- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.034>
- Monteiro Espíndola, K. M., Ferreira, R. G., Mosquera Narvaez, L. E., Rocha Silva Rosario, A. C., Machado Da Silva, A. H., Bispo Silva, A. G., ... Chagas Monteiro, M. (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, *9*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- Morrissey, S., Pegot, B., Coleman, D., Garcia, M. T., Ferguson, D., Quilty, B., & Gathergood, N. (2009). Biodegradable, non-bactericidal oxygen-functionalised imidazolium esters: A step towards “greener” ionic liquids. *Green Chemistry*, *11*, 475–483. <https://doi.org/10.1039/b812809j>
- Mota, F. L., Queimada, A. J., Pinho, S. P., & Macedo, E. A. (2008). Aqueous solubility of some natural phenolic compounds. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *47*, 5182–5189. <https://doi.org/10.1021/ie071452o> CCC:
- Peng, K., Shi, Y., LaBarbiera, A., & Mitragotri, S. (2020). Mucoadhesive Ionic Liquid Gel Patches for Oral Delivery. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01024>
- Pernak, J., Borucka, N., Walkiewicz, F., Markiewicz, B., Fochtman, P., Stolte, S., ... Stepnowski, P. (2011). Synthesis, toxicity, biodegradability and physicochemical properties of 4-benzyl-4-methylmorpholinium-based ionic liquids. *Green Chemistry*, *13*(10), 2901–2910. <https://doi.org/10.1039/C1GC15468K>
- Pubchem. (2020). Caffeic Acid. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid>.
- Quinones, D. M., & Ghaly, E. S. (2008). Formulation and Characterization of nystatin gel. *Puerto Rico Health Science Journal*, *27*(1).
- Ratti, R. (2014). Ionic Liquids: Synthesis and Applications in Catalysis. *Advances in Chemistry*, *2014*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/729842>
- Santos, L. C. O., Spagnol, C. M., Guillot, A. J., Melero, A., & Corrêa, M. A. (2019). Caffeic acid skin absorption: Delivery of microparticles to hair follicles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *27*, 791–797. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.04.015>

- Santos de Almeida, T., Caparica, R., Julio, A., & Reis, C. P. (2020). An Overview on Ionic Liquids: A New Frontier for Nanopharmaceuticals. In E. Lichtfouse (Ed.), *Nanopharmaceuticals: Principles and Applications* (46th ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-44925-4>
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Mota, J. P., Rijo, P., & Reis, C. P. (2017). An emerging integration between ionic liquids and nanotechnology: General uses and future prospects in drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 8(6), 461–473. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0002>
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Saraiva, N., Fernandes, A. S., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., ... Mota, J. P. (2017). Choline- versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(11), 1858–1865. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1349788>
- Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012). Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>
- Serajuddin, A. T. M. (2007). Salt formation to improve drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.010>
- Shamshina, L. J., Barber, P. S., & Rogers, R. D. (2013). Ionic liquids in drug delivery. *Expert Opinion*, 10(10). <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.808185>
- Shi, Y., Zhao, Z., Gao, Y., Pan, D. C., Salinas, A. K., Tanner, E. E. L., ... Mitragotri, S. (2020). Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes. *Journal of Controlled Release*, 322. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.018>
- Shinde, U., Pokharkar, S., & Modani, S. (2012). Design and Evaluation of Microemulsion Gel System of Nadifloxacin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 237–247. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.106066>
- Singh, S. K., & Savoy, A. W. (2020). Ionic liquids synthesis and applications: An overview. *Journal of Molecular Liquids*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112038>
- Sowmiah, S., Srinivasadesikan, V., Tseng, M. C., & Chu, Y. H. (2009). On the chemical stabilities of ionic liquids. *Molecules*, 14, 3780–3813. <https://doi.org/10.3390/molecules14093780>

- Tang, B., Bi, W., Tian, M., & Row, K. H. (2012). Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. *Journal of Chromatography B*, *904*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.020>
- Tang, W., Liu, B., Wang, S., Liu, T., Fu, C., Ren, X., ... Meng, X. (2013). Doxorubicin-loaded ionic liquid-polydopamine nanoparticles for combined chemotherapy and microwave thermal therapy of cancer. *RSC Advances*, *6*, 1–7. <https://doi.org/10.1039/C6RA02434C>
- Tavares, A. P. M., Rodríguez, O., & Macedo, A. E. (2013). New Generations of Ionic Liquids Applied to Enzymatic Biocatalysis. In *Ionic Liquids - New Aspects for the Future*. Porto. <https://doi.org/10.5772/51897>
- Teng, Y., Wang, C. C. N., Liao, W., & Lan, Y. (2020). Caffeic Acid Attenuates Multi-Drug Resistance in Cancer Cells by Inhibiting Efflux Function of Human P-glycoprotein. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25020247>
- Un, J. J., Lee, M. K., Yong, B. P., Jeon, S. M., & Choi, M. S. (2006). Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *318*(2), 476–483. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105163>
- Welton, T. (1999). Room-temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews*, *99*(8), 2071–2083. <https://doi.org/10.1021/cr980032t>
- Welton, T. (2018). Ionic liquids: a brief history. *Biophysical Reviews*, *10*, 691–706. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0419-2>
- Yilmaz, S. (2019). Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. *Fish and Shellfish Immunology*, *86*, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.068>
- Zech, O., Thomaier, S., Bauduin, P., Rück, T., Touraud, D., & Kunz, W. (2009). Microemulsions with an ionic liquid surfactant and room temperature ionic liquids as polar pseudo-phase. *Journal of Physical Chemistry B*, *113*, 465–473. <https://doi.org/10.1021/jp8061042>
- Zhao, Q., & Anderson, J. L. (2012). Ionic Liquids. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (Vol. 2, pp. 213–242). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.10053-5>

- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2010). Bioavailability of hydroxycinnamates: A brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochemistry Reviews*, 9, 133–145. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9145-5>
- Zhou, G., Luo, Z., & Fu, X. (2014). Preparation of starch nanoparticles in a water-in-ionic liquid microemulsion system and their drug loading and releasing properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(32), 8214–8220. <https://doi.org/10.1021/jf5018725>