

INÊS PATRIARCA MARTINS

**ÁCIDOS FENÓLICOS E LÍQUIDOS IÓNICOS EM
TRANSFEROSSOMAS**

Orientadora: Prof.^a Doutora Catarina Pereira Leite

Coorientadora: Prof.^a Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona – Centro Universitário De Lisboa

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2023

INÊS PATRIARCA MARTINS

**ÁCIDOS FENÓLICOS E LÍQUIDOS IÓNICOS EM
TRANSFEROSSOMAS**

Orientadora: Prof.^a Doutora Catarina Pereira Leite

Coorientadora: Prof.^a Doutora Tânia Santos de Almeida

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa no dia 24/07/2023, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 316/2023 com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof.^a Doutora Catarina Rosado

Orientadora: Prof.^a Doutora Maria Catarina Leite

Universidade Lusófona – Centro Universitário De Lisboa

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2023

Agradecimentos

Com o fim de um capítulo longo, desafiante, mas também de muita aprendizagem não podia deixar de agradecer a algumas pessoas. Nomeadamente às minhas professoras que, quase todas, me acompanharam ao longo destes 5 anos, a professora Catarina Leite que desde que entrou na nossa turma nos mostrou o quão dinâmico e cativante podia ser qualquer tipo de aprendizagem, sempre com uma mensagem de força nos dias piores de laboratório e com um “Vai conseguir Inês”, a professora Ana Júlio que também desde o início sempre esteve presente para me ajudar, esteve sempre comigo nos dias de laboratório e me respondia a qualquer hora do dia com alguma dúvida e, claro, a professora Tânia Almeida que apesar de já não fazer parte do corpo docente da faculdade acreditou em mim desde as primeiras aulas de Química Orgânica, viu em mim o gosto pelo laboratório e me desafiou para este mundo experimental. Agradeço o rigor, disciplina e exigência com que me ensinaram, vocês e todos os restantes professores nestes últimos 5 anos.

Agradecer ao meu Júlio por me dar na cabeça para escrever a tese, por me apoiar nos dias piores, onde estava mais desmotivada e por estar sempre ao meu lado para me consolar. Obrigada, meu coração bom!

Obrigada à Mariana com quem partilhava as minhas frustrações e nos íamos apoiando mutuamente. E um obrigada a todos os restantes colegas e amigos que durante estes anos conviveram comigo e me acrescentaram algo.

Por último, mas não menos importante, agradecer à minha mãe e ao meu pai por me ajudarem sempre que precisei, pela confiança que depositaram em mim e me terem permitido estudar e aprender aqui, agradeço muito!

Resumo

Os líquidos iónicos (LI) têm sido muito estudados nos últimos anos pelas suas inúmeras vantagens. Como promotores de solubilidade e estabilidade, que são alguns dos problemas mais complicados de ultrapassar pela Indústria Farmacêutica, nomeadamente através da conversão de fármacos com baixa solubilidade em água em LI. Uma outra estratégia para aumentar a biodisponibilidade de compostos com baixa solubilidade aquosa é a sua incorporação em nanossistemas de veiculação, como é o caso dos transferossomas.

Os ácidos fenólicos, como é exemplo o ácido ferúlico (AF), apresentam propriedades biológicas relevantes, incluindo as atividades antioxidante e anti-inflamatória. No entanto, estes compostos são pouco solúveis em água. Assim, este trabalho teve como objetivo ultrapassar esta limitação físico-química do AF através do recurso a duas estratégias: a) a síntese de ferulato de colina e b) a encapsulação do AF em transferossomas contendo LI.

Os resultados mostraram uma solubilidade 23 vezes superior do ferulato de colina em água em relação ao ácido fenólico. Por outro lado, a incorporação de LI em transferossomas causou uma redução para metade no tamanho dos nanossistemas vesiculares, em comparação aos transferossomas controlo. Quanto à eficiência de associação, verificou-se um aumento de 10% quando se incorporou o LI mais promissor, o [Cho][Gly].

Este estudo mostrou que a transformação de ativos nos seus líquidos iónicos derivados, assim como a utilização de nanopartículas vesiculares para incorporar os ativos, poderão ser estratégias valiosas no aumento da solubilidade e da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água.

Palavras-chave: Líquidos Iónicos; Transferossomas; Ácido Ferúlico; Estratégias de Solubilidade.

Abstract

Ionic liquids (IL) have been much studied in recent years for their many advantages. As solubility and stability promoters, some of the most difficult problems to overcome by the Pharmaceutical Industry, namely through the conversion of drugs with low solubility in water into IL. Another strategy to increase the bioavailability of compounds with low aqueous solubility is their incorporation into delivery nanosystems, as is the case of transferosomes.

Phenolic acids, such as ferulic acid (FA), have relevant biological properties, including antioxidant and anti-inflammatory activities. However, these compounds are poorly soluble in water. Thus, the aim was to overcome this physical-chemical limitation of FA by resorting to two strategies: a) synthesis of choline ferulate and b) encapsulation of FA in transferosomes containing IL.

The results showed a 23 times greater solubility of IL in water compared to its phenolic acid. On the other hand, the incorporation of IL into transferosomes caused a reduction in the size of vesicular nanosystems compared to control transferosomes. As for the association efficiency, an increase of 10% was observed when the most promising IL [Cho][Gly] was incorporated.

This study showed that the transformation of actives into derived ionic liquids and the use of lipid nanoparticles that incorporate the actives proved to be a valuable strategy in increasing the solubility of poorly soluble drugs in water.

Keywords: Ionic Liquids; Transferosomes; Ferulic Acid; Solubility Strategies.

Abreviaturas

AC - ácido cafeico

AF - ácido ferúlico

AINEs - anti-inflamatórios não esteróides

API-IL - líquidos iónicos baseados em ingredientes farmacêuticos ativos

CC – capacidade de carga

EA – eficiência de associação

FDA - Food and Drug Administration

FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

LI - líquido iónico

PDI – Índice de polidispersão

PZ – potencial zeta

rpm - rotações por minuto

TA - temperatura ambiente

[Cho][AF] – ferulato de colina

[Cho][Gly] – glicinato de (2-hidroxietil)-trimetilamónio

[Emim][Br] – brometo de 1-etil-3-metilimidazólio

[Emim][Gly] – glicinato de 1-etil-3-metilimidazólio

Índice Geral

Capítulo I. Introdução.....	- 1 -
1.1. Líquidos Iónicos	- 2 -
1.2. Ácidos Fenólicos.....	- 4 -
1.3. Nanopartículas	- 8 -
1.3.1. Nanopartículas baseadas em lípidos	- 13 -
1.4. Motivações e Objetivo	- 21 -
Capítulo II. Materiais e Métodos	- 23 -
2.1. Materiais	- 24 -
2.2. Síntese do ferulato de colina	- 24 -
2.3. Caracterização do ferulato de colina.....	- 24 -
2.4. Estudos de solubilidade	- 25 -
2.5. Produção dos transferossomas	- 25 -
2.6. Caracterização dos transferossomas	- 26 -
A. Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	- 26 -
B. Eficiência de associação e capacidade de carga	- 26 -
2.7. Estabilidade dos transferossomas	- 27 -
Capítulo III. Resultados e Discussão	- 28 -
3.1. Síntese do ferulato de colina	- 29 -
3.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	- 30 -
3.3. Estudos de solubilidade	- 31 -
3.4. Produção e caracterização de transferossomas	- 32 -
3.5. Estabilidade dos transferossomas	- 34 -
Capítulo IV. Conclusão	- 38 -
Capítulo V. Referências bibliográficas	- 41 -
Anexos.....	i

Índice de Figuras

Figura 1 - Vias de formação de um líquido iónico: (A) líquido iónico prótico; (B) líquido iónico aprótico.	- 3 -
Figura 2 - Estrutura química do ácido ferúlico.....	- 6 -
Figura 3 - Representação dos diferentes tipos de nanopartículas (orgânicas e inorgânicas). -	9 -
Figura 4 - Evolução e desenvolvimentos dos sistemas de veiculação ao longo da história.-	12 -
Figura 5 - Lipossoma e a sua constituição fosfolipídica.	- 14 -
Figura 6 - Estrutura dos transferossomas	- 18 -
Figura 7 - Reação ácido-base de formação do ferulato de colina.....	- 29 -
Figura 8 - Espectro de FTIR do ácido ferúlico e o respetivo líquido iónico, ferulato de colina...-	30 -
Figura 9 - Tamanho (nm) dos transferossomas ao longo do armazenamento sob refrigeração durante 30 dias.....	- 35 -
Figura 10 - Índice de polidispersão (PDI) dos transferossomas ao longo do armazenamento sob refrigeração durante 30 dias.	- 36 -
Figura 11 - Potencial zeta dos transferossomas ao longo do armazenamento sob refrigeração durante 30 dias.....	- 37 -

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Medicamentos utilizando nanomedicina aprovados pela FDA nos últimos 25 anos. - 15 -	
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos transferossomas..... - 19 -	
Tabela 3 - Composição qualitativa e quantitativa das formulações transferossomais. - 25 -	
Tabela 4 - Estrutura química, estado físico à temperatura ambiente (TA) e rendimento da reação de síntese do ferulato de colina..... - 29 -	
Tabela 5 - Solubilidade do ácido ferúlico e do ferulato de colina em água desionizada a 25 ± 2 °C (n=3, média ± desvio padrão). - 31 -	
Tabela 6 - Caracterização dos transferossomas tendo em conta o tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), eficiência de associação (EA) e capacidade de carga (CC) (n=2, média ± desvio padrão).. - 33 -	

Capítulo I. Introdução

1.1. Líquidos Iónicos

Devido às suas inúmeras vantagens e propriedades físico-químicas únicas, os líquidos iónicos (LI) têm sido cada vez mais investigados, sobretudo na área farmacêutica (Islam et al., 2020). Os LI são sais constituídos por aniões orgânicos ou inorgânicos conjugados com um catião orgânico, com a peculiaridade de apresentarem pontos de fusão abaixo dos 100 °C, sendo alguns deles líquidos à temperatura ambiente (Santos de Almeida et al., 2017).

Desde 1914 que se conhece a possibilidade de formação destes sais. Apesar de alguma discórdia na primeira descoberta destes sais, atualmente reconhecem-se três gerações de LI: a primeira, que nasceu por volta de 1960 onde se começou a perceber as suas propriedades únicas, o cientista Paul Walden investigou por sais que fossem líquidos à temperatura ambiente e foi assim que descobriu que $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ tinha um ponto de fusão de 12 °C (Welton, 2018); a segunda resulta do crescente interesse em LI a partir dos anos 80, pelo que nos anos 90 se criaram LI com outras propriedades físico-químicas, pela alteração de catiões e aniões, tornando-os mais estáveis, o que permitiu a descoberta das reações de Diels-Alder (Welton, 2018); e a terceira, no início do século XXI onde se começou a combinar as propriedades biológicas dos fármacos com as propriedades físico-químicas dos LI, tendo-se desenvolvido o que se chamou de líquidos iónicos baseados em ingredientes farmacêuticos ativos, usualmente abreviados como API-ILs (Czerniak et al., 2016).

Os LI são reconhecidos pelas suas variadas vantagens, tais como: o baixo ponto de fusão, já mencionado; a estabilidade térmica; o facto de não serem inflamáveis; a elevada condutividade iónica; a possibilidade de adaptação a vários tipos de soluções (oleosa, hidroalcoólica, aquosa); não são voláteis; apresentarem imiscibilidade elevada, relativa compatibilidade e nalguns casos baixa toxicidade (Ahmad et al., 2019; Caparica et al., 2021). A viscosidade dos LI é variável e dependente das forças de interação de Van-der-Waals e da formação de pontes de hidrogénio entre as moléculas: quanto mais ligações e forças deste tipo existirem maior é a viscosidade do LI (Gonsior, 2010). Algumas destas propriedades, nomeadamente a relativa compatibilidade e a baixa toxicidade são dependentes do catião orgânico que compõe o LI. Entre estes, os mais estudados e utilizados são o piridínio, o amónio, o imidazólio e a colina (de Almeida et al., 2017; Patel & Lee, 2012). É de notar que os catiões imidazólio, piridínio e quinolínio originam LI com elevada toxicidade e baixa biocompatibilidade, o que reduz a sua aplicação em estudos clínicos. Por outro lado, e com maior interesse, LI contendo colina e ésteres de aminoácidos são geralmente reconhecidos

como não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, sendo, por isso, amplamente explorados para aplicações farmacêuticas (Islam et al., 2020; Ohno, 2019). Relativamente à imiscibilidade, é de salientar que os LI podem ser utilizados como solventes excipientes, podendo dissolver substâncias poliméricas, inorgânicas e orgânicas, hidrofóbicas ou hidrofílicas, que são facilmente removidas da formulação à *posteriori*, razão pela qual são muitas vezes denominados como solventes ecológicos ou solventes verdes (Caparica et al., 2021; Gonsior, 2010). Sendo a perda de solventes um dos principais desperdícios na Indústria Farmacêutica, o uso de LI como intermediários em processos químicos pode resultar em reações mais rápidas, com menos passos e menos perdas do que usando os solventes comuns (Pedro et al., 2020).

A aplicabilidade dos LI vai muito além da área farmacêutica propriamente dita. Por exemplo, na Indústria Cosmética, os LI já são utilizados para formular antitranspirantes, desodorizantes e perfumes (Santos de Almeida et al., 2017). Mas também são muito úteis em áreas como a eletroquímica, por exemplo, em baterias de lítio, ou a nível artístico como aditivos nas tintas, entre muitas outras áreas (Gonsior, 2010).

Para ser possível aplicar e usufruir das vantagens dos LI, é necessário produzi-los. De acordo com a reação de síntese, os LI são divididos em duas categorias (Figura 1): apróticos e próticos. Estes últimos são formados através da transferência de prótons entre um ácido e uma base numa reação equimolar. Por outro lado, os LI apróticos são formados através de uma reação de neutralização seguida de uma reação de quaternização (N. A. Ahmad et al., 2019; Silva et al., 2020).

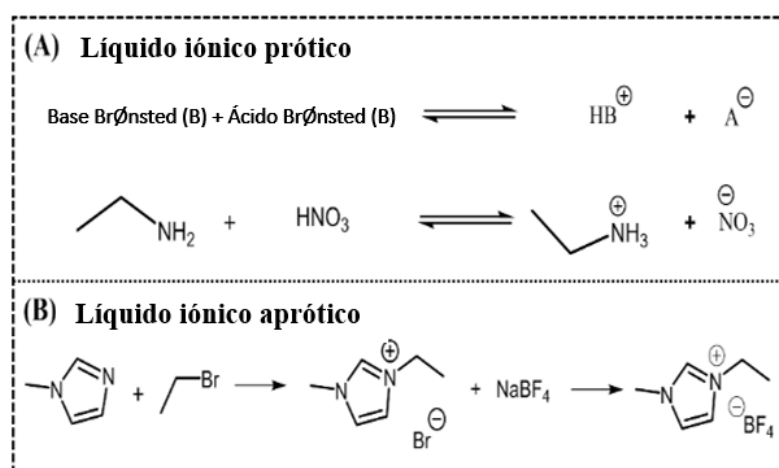


Figura 1 - Vias de formação de um líquido iônico: (A) líquido iônico prótico; (B) líquido iônico aprótico. Adaptado de (Silva et al., 2020).

Os líquidos iônicos, neste trabalho científico, foram produzidos através de uma reação equimolar ácido-base.

As descobertas de possíveis moléculas com interesse farmacêutico muitas vezes não chegam à comercialização para uso humano por questões biofarmacêuticas, entre elas, a baixa solubilidade em água que estas apresentam. Assim, a conjugação destas moléculas farmacologicamente ativas com LI pode ser uma estratégia de promoção da solubilidade. Este racional esteve na origem dos chamados *Active Pharmaceutical Ingredients-Ionic Liquids* (API-ILs), já que permitem ultrapassar os obstáculos encontrados na forma sólida dos API, como o polimorfismo (N. A. Ahmad et al., 2019), a baixa solubilidade e biodisponibilidade, facilitando assim o efeito terapêutico do fármaco (Viciosa et al., 2015). Entre os diversos LI, os à base de colina parecem estar relacionados com uma boa promoção da solubilidade dos compostos ativos, assim como a melhoria da *performance* de sistemas de veiculação (Caparica et al., 2018, 2021). Assim sendo, neste trabalho selecionámos os LI à base de colina para serem utilizados como promotores de solubilidade do composto ativo – o ácido ferúlico - e incorporados, posteriormente, num sistema de veiculação lipídico.

1.2. Ácidos Fenólicos

Uma grande panóplia de substâncias ativas utilizadas atualmente para tratar ou prevenir doenças são de origem natural, sendo que as plantas, os animais e os fungos são os maiores produtores de compostos ativos (Mathur & Hoskins, 2017).

Um conjunto de compostos naturais muito estudados pelas suas propriedades terapêuticas são os compostos fenólicos, já com cerca de 8000 substâncias conhecidas e de interesse. Derivados da via do xiquimato, pentose-fosfato e fenilpropanóide, apresentam em comum uma estrutura com um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxilo (Balange & Benjakul, 2009). Estes compostos fenólicos podem ser classificados em flavonóides e não flavonóides, fazendo parte deste último grupo, os ácidos fenólicos (Vuolo et al., 2019)

Os ácidos fenólicos são, então, metabolitos naturais presentes na maioria das plantas comumente utilizadas na alimentação portuguesa, sendo que são ingeridos em média cerca de 200 mg/dia (Helena et al., 2015). Estes ainda se dividem em ácidos hidroxicinâmicos (por exemplo, ácido ferúlico (AF), ácido cafeico (AC) e ácido *p*-cumárico) e ácidos

hidroxibenzóicos (por exemplo, ácido gálico e ácido vanílico) (Caparica et al., 2020; Du et al., 2011; Vuolo et al., 2019).

A síntese dos ácidos hidroxicinâmicos na natureza ocorre através da via do xiquimato, utilizando os aminoácidos L-fenilalanina ou L-tirosina ou ambos como precursores, que são então convertidos em ácido *p*-cumárico pela perda de um grupo amina, que após sofrer hidroxilação forma o ácido cafeico e, posteriormente, através de uma reação de metilação forma-se o ácido ferúlico (Caparica et al., 2020).

Os ácidos hidroxicinâmicos estão amplamente distribuídos na nossa alimentação, desde o café ao vinho tinto, cereais integrais, entre outros (Veras et al., 2022). Apresentam baixa toxicidade, mas elevado potencial biológico, sendo que as atividades analgésica, antisséptica, antimicrobiana e antioxidante têm vindo a ser descritas (Caddeo et al., 2018; Tungmunnithum et al., 2018). No entanto, o facto dos ácidos fenólicos terem baixa solubilidade em água limita a utilização terapêutica dos mesmos e condiciona a biodisponibilidade dos compostos. Para ultrapassar este desafio, vários ácidos fenólicos têm sido transformados em API-LIs, o que se tem revelado promissor para aumentar a sua solubilidade em água (N. A. Ahmad et al., 2019; Czerniak et al., 2016).

O ácido ferúlico (ácido [E]-3-[4-hidroxi-3-metoxi-fenil]prop-2-enóico, $C_{10}H_{10}O_4$) foi sintetizado pela primeira vez em 1925 (Kumar & Pruthi, 2014), mas é na natureza que ele se forma naturalmente e existe em grande quantidade, nomeadamente nos tecidos das plantas. A nível químico, o ácido ferúlico apresenta 9 carbonos com grupos substituintes, tem um grupo metoxi na posição *meta* e um grupo hidroxil na posição *para* do anel fenólico, tal como representado na Figura 2. São estes grupos substituintes que ao variarem entre as posições *meta*, *orto* e *para* dão origem a outros ácidos fenólicos, com consequências na potência das suas propriedades biológicas (Brand-Williams et al., 1995). Tal como outros, o AF apresenta uma solubilidade baixa em água, de 5970 mg/L a 25 °C, o que dificulta a sua utilização pela Indústria Farmacêutica (PubChem, 2023).

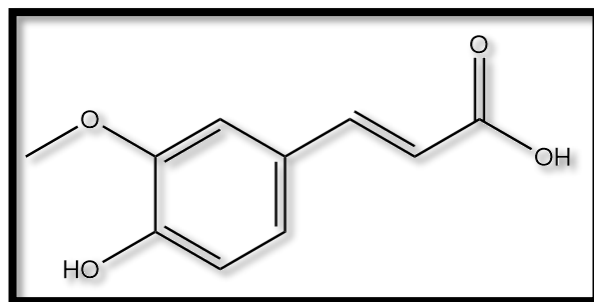


Figura 2 - Estrutura química do ácido ferúlico.

Adaptado de (Caparica et al., 2020).

Têm sido descritas diversas atividades biológicas para este composto, como atividade anti-inflamatória (20 mg/kg está descrito como sendo a dose mínima efetiva para atenuar a dor e atuar como anti-inflamatório) (Yan et al., 2020), antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena (a nível pulmonar, intestinal e pele), regeneradora celular e fotoprotetora (Du et al., 2011), entre várias outras. Assim, apresenta potencial para uso em diversas áreas, em particular, a farmacêutica e a cosmética.

É de notar que na Medicina Tradicional Chinesa o AF é utilizado em co-adjuvância no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (Y. Li et al., 2011). O AF atua como inibidor da agregação plaquetária e da libertação de tromboxanos, atividade semelhante ao Clopidogrel utilizado na Medicina Ocidental, e ainda inibe a nível hepático a síntese de colesterol, prevenindo a doença coronária e eventos adversos cardiovasculares (D. Li et al., 2021). Estudos mostram uma elevada absorção e biodisponibilidade de uma administração única de AF em ratos machos, com uma concentração de AF entre 50-200 μM suficiente para inibir agonistas plaquetários, dose-dependentes, incluindo a adenosina difosfato e o ácido araquidónico presente na cascata dos tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas. A uma concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, o AF consegue reduzir a taxa de agregação plaquetária e a formação de coágulos sanguíneos (D. Li et al., 2021; Y. Li et al., 2011).

Na área da cosmética, o AF pode ser também utilizado com várias finalidades: a) como ingrediente cosmetologicamente ativo em formulações; b) como estabilizante de vitaminas devido à sua ação antioxidante; e c) como anti-pigmentante e fotoprotetor, uma vez que apresenta uma estrutura similar à tirosina e, por isso, pode inibir a formação de melanina por competição à atividade da tirosina. Algumas patentes contêm o ácido ferúlico associado ao resveratrol ou à vitamina C para uma atividade antioxidante sinérgica, ou com vitamina E para

conferir fotoproteção com maior eficácia (Chaudhary et al., 2019). É de notar que este composto apresenta características interessantes para aplicação cutânea, como uma relativa lipofilia (log P de 1,58) ((Raj & Singh, 2022) e facilidade de penetração na pele (PubChem, 2023; Taofiq et al., 2017).

Uma vez que o AF apresenta baixa toxicidade e é facilmente absorvido no corpo humano, com um tempo de semivida muito maior que outros ácidos fenólicos, o seu uso como composto ativo pode ser vantajoso. Pela sua atividade antioxidante, já muito estudada e relatada na literatura, o ácido ferúlico poderá ser utilizado, por exemplo, como um suplemento para regeneração celular ao neutralizar os radicais livres dos tecidos musculares e, assim, aliviar as dores musculares pós-treino. O seu mecanismo antioxidante é complexo, mas deve-se basicamente à inibição da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) pela inibição das enzimas responsáveis pela sua formação e à neutralização dos radicais livres (Fang et al., 2002; Zduńska et al., 2018).

Para se utilizar o ácido ferúlico, independentemente da via de administração, é necessário estudar a sua farmacocinética. Estudos *in vivo* com ratos, utilizando um modelo de dois compartimentos mostraram que a absorção e distribuição do AF após administração são rápidas e elevadas, pelo que os tempos de semi-vida são reduzidos, com uma cinética de ordem zero. Na presença de ratos com problemas de circulação sanguínea, a absorção é elevada, mas a eliminação do fármaco diminui, levando a crer que o AF apresente uma distribuição dependente das propriedades físico-químicas do composto e da ligação às proteínas plasmáticas. A ligação às proteínas plasmáticas do AF é de cerca de 73,5 %, muito mais elevada do que outros ácidos fenólicos (AC é de 66 %) (D. Li et al., 2021; Veras et al., 2022).

A permeabilidade intestinal de vários ácidos hidroxicinâmicos foi analisada através da realização de estudos *in vitro*, PAMPA e com células CaCo-2. O ácido ferúlico apresentou valores elevados de permeabilidade intestinal através de difusão passiva, isto acontece pelo ativo em questão ser um fármaco lipofílico, o que facilita a sua passagem pelas membranas celulares. No entanto, esta passagem pelas células podia ser dificultada pelos mecanismos de “segurança” da célula, como é o caso dos transportadores de efluxo. No caso do AF, este não é afetado por estes sistemas de controlo (J. Li et al., 2017; Veras et al., 2022).

A cinética prossegue com a etapa da eliminação que se dá primeiramente no intestino, onde a sua biodisponibilidade pode ser afetada pela microbiota local. No fígado, não sendo muito afetado pelo metabolismo de fase I dependente das isoenzimas hepáticas do citocromo

P450, é, no entanto, metabolizado em glucoronato de ácido ferúlico, sulfato de ácido ferúlico e dihidro-ácido ferúlico maioritariamente através o processo de sulfatação e também reações de glucuronidação, tal como o ácido cafeico (Heleno et al., 2015; Kumar & Pruthi, 2014). Assim, evidencia-se um tempo de eliminação curto, uma vez que quando administrado oralmente, o AF tem uma elevada distribuição para os órgãos excretores (cerca de 76% no rim).

Uma outra via possível para administrar o AF seria a via transdérmica. Mas para isso, há características moleculares imprescindíveis como o peso molecular abaixo de 600 Da, ponto de fusão a cerca de 200 °C, e log P entre 1 e 3, só assim, se garante uma possível penetração através da pele. O ácido ferúlico consegue corresponder a todas estas propriedades, com um peso molecular de 194,18 Da, log P igual a 1,58 (Raj & Singh, 2022), um ponto de fusão de 174 °C (Yan et al., 2020). No entanto, a potência deste ativo pode pôr em causa a sua utilização por esta via.

Na Indústria Farmacêutica, cerca de 40% dos fármacos são lipofílicos, tal como o ácido ferúlico e, por isso, apresentam algumas limitações em termos de solubilidade aquosa, apesar de à partida apresentarem boas razões para serem formulados (Balamurugan K, 2018). É neste contexto que as nanopartículas podem ter vantagens, por favorecerem a solubilidade dos compostos e, como tal, melhorarem a sua biodisponibilidade e a incorporação dos ativos na formulação. Por exemplo, foi demonstrado que a incorporação do ácido ferúlico em sistemas de veiculação auto-microemulscientes aumentou a AUC em 1,73 vezes em comparação a uma formulação aquosa tradicional (Veras et al., 2022). Pelo que a incorporação deste ativo, em partículas com uma escala nano poderá ser uma estratégia vantajosa.

1.3. Nanopartículas

Atualmente, a palavra “nanopartícula” é cada vez mais utilizada e conhecida na sociedade, ainda que seja um termo que importa esclarecer, já que a sua definição não é consensual na literatura.

Nanopartícula é designada como sendo uma partícula coloidal com um tamanho entre 1 e 100 nm, ainda que vários autores considerem que as nanopartículas são partículas abaixo de 1000 nm. As nanopartículas assemelham-se em termos de tamanho ao ácido desoxirribonucleico, aos anticorpos ou às proteínas. Estas podem ser distinguidas em nanoesferas ou nanocápsulas (também designadas por nanovesículas em alguns casos). As

nanoesferas possuem uma estrutura matricial, onde as substâncias podem ser adsorvidas à superfície ou encapsuladas nas mesmas. Por outro lado, as nanocápsulas/nanovesículas apresentam uma membrana externa que engloba um vacúolo interno, sendo que a substância a encapsular pode ficar no vacúolo interno ou adsorvida à superfície (B. Almeida et al., 2020; Santos de Almeida et al., 2017).

Neste último caso, podem até coexistir na mesma nanocápsula dois fármacos reativos entre si, sendo que um fica na superfície da nanopartícula e outro no seu núcleo.

As nanopartículas podem ser classificadas de diversas formas consoante as suas características, por exemplo, considerando os excipientes de que são constituídas, podem ser subdivididas em (Figura 3):

- Nanopartículas orgânicas: por exemplo, as poliméricas, as lipídicas e os dendrímeros;
- Nanopartículas inorgânicas: de sílica, nanotubos de carbono, ouro, óxido de ferro e os quantum dots (Richards et al., 2016).

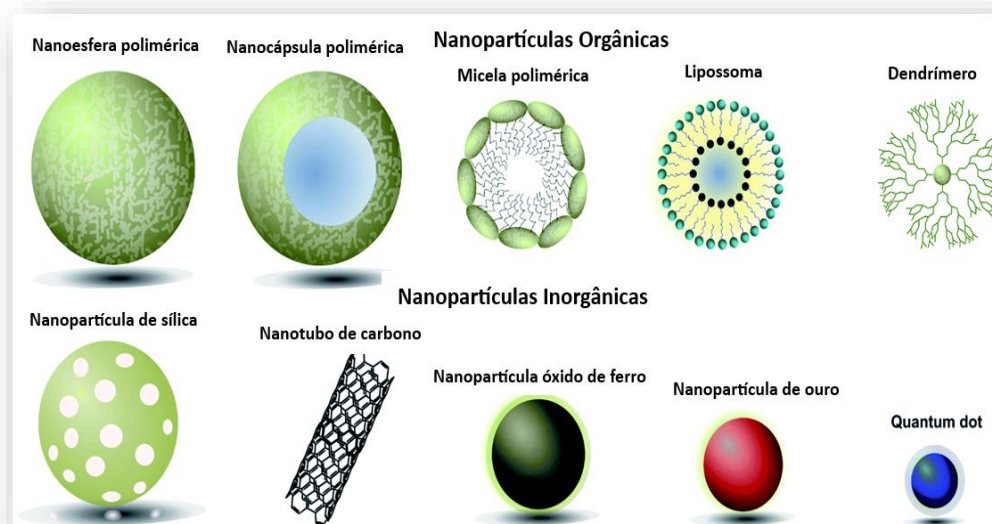


Figura 3 - Representação dos diferentes tipos de nanopartículas (orgânicas e inorgânicas). Retirado de (Richards et al., 2016).

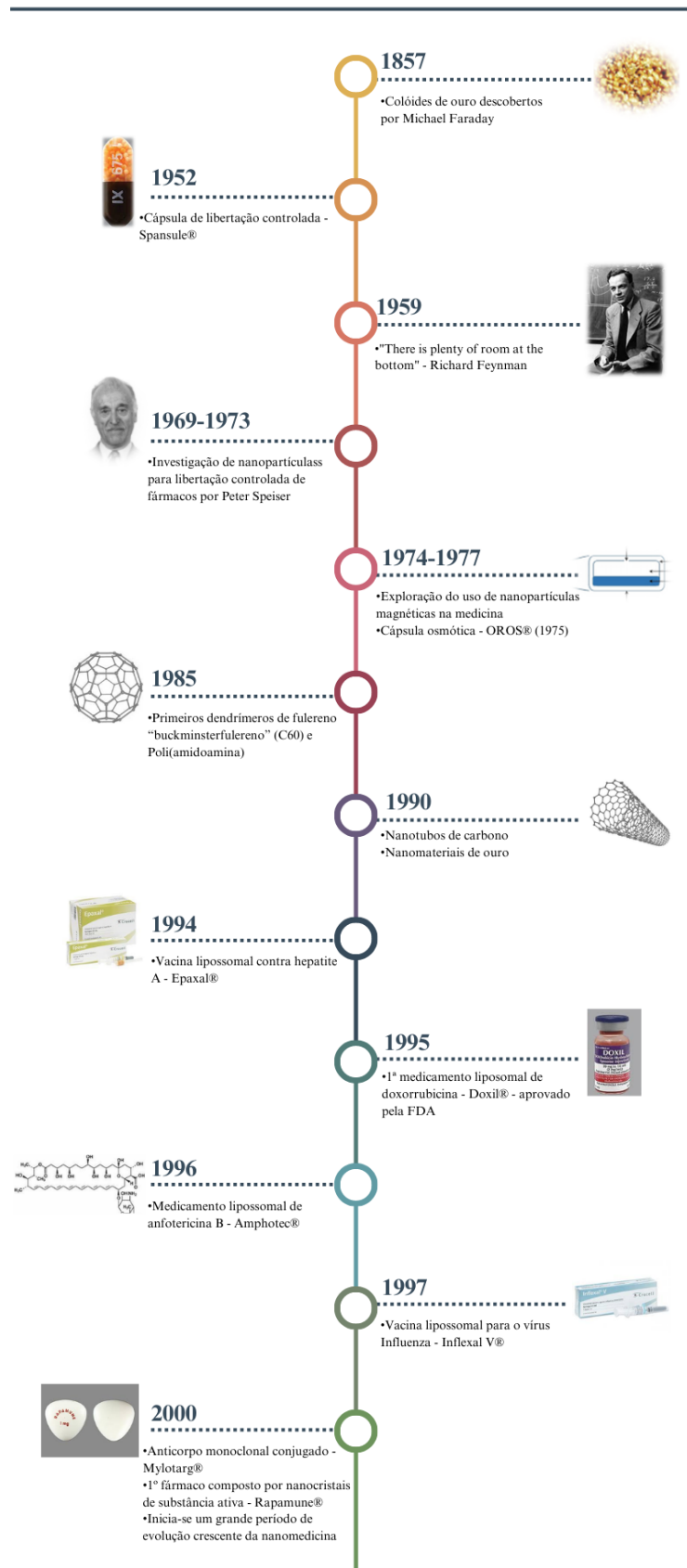
Cada tipo de nanopartícula apresenta especial interesse em várias áreas, desde a terapêutica, ao diagnóstico, à prevenção, ao desporto, à eletrónica, pintura, ao cinema, entre

outras. Em todas estas áreas, as nanopartículas vão-se utilizando mais e mais devido às suas inúmeras vantagens.

Ao longo dos últimos 30 anos, as nanopartículas têm sido estudadas para funcionarem como sistemas de veiculação, estando um pouco da sua evolução descrita na Figura 4 (Arajo Lopes et al., 2013; Bejarano et al., 2018; Clinical Trials - Cairo University, 2023; Clinical Trials - University of Baghdad, 2023; Hassan et al., 2017; KREUTER, 2007; Park et al., 2022). A elevada aplicabilidade das nanopartículas deve-se, entre outras, às suas características estruturais. O seu rácio superfície-volume elevado faz com estas pequenas partículas tenham uma facilidade de absorção e estabilidade maior, pela sua elevada interação molecular com o meio ambiente. Assim, estes veículos nanométricos conseguem ser adaptados e configurados para servirem várias situações. Estes são cada vez mais uma forma eficiente de um fármaco atingir o alvo pretendido, com elevada efetividade, para um melhor resultado terapêutico e menor toxicidade. Uma vez que são capazes de proteger o fármaco até ao local de ação, podem também evitar a sua degradação e a ocorrência mais frequente de efeitos secundários (Blanco et al., 2015).

Existe atualmente 100 fármacos baseados na nanomedicina disponíveis no mercado e várias outras centenas em ensaios clínicos. A pandemia COVID-19 acabou por ser um momento que permitiu uma evolução rápida e drástica deste tipo de medicamentos. De todos os medicamentos contendo nanopartículas sujeitos a ensaios clínicos, apenas 15% destes são comercializados, acabando depois por 5% serem descontinuados. Os medicamentos baseados em nanopartículas são normalmente desenvolvidos para o tratamento do cancro. A composição destes medicamentos pode ser variada, mas normalmente consiste em nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas e menos utilizados na nanomedicina ainda são os dendrímeros, micelas e nanocristais (Shan et al., 2022).

Evolução e desenvolvimento dos sistemas de veiculação ao longo da história



Evolução e desenvolvimento dos sistemas de veiculação ao longo da história

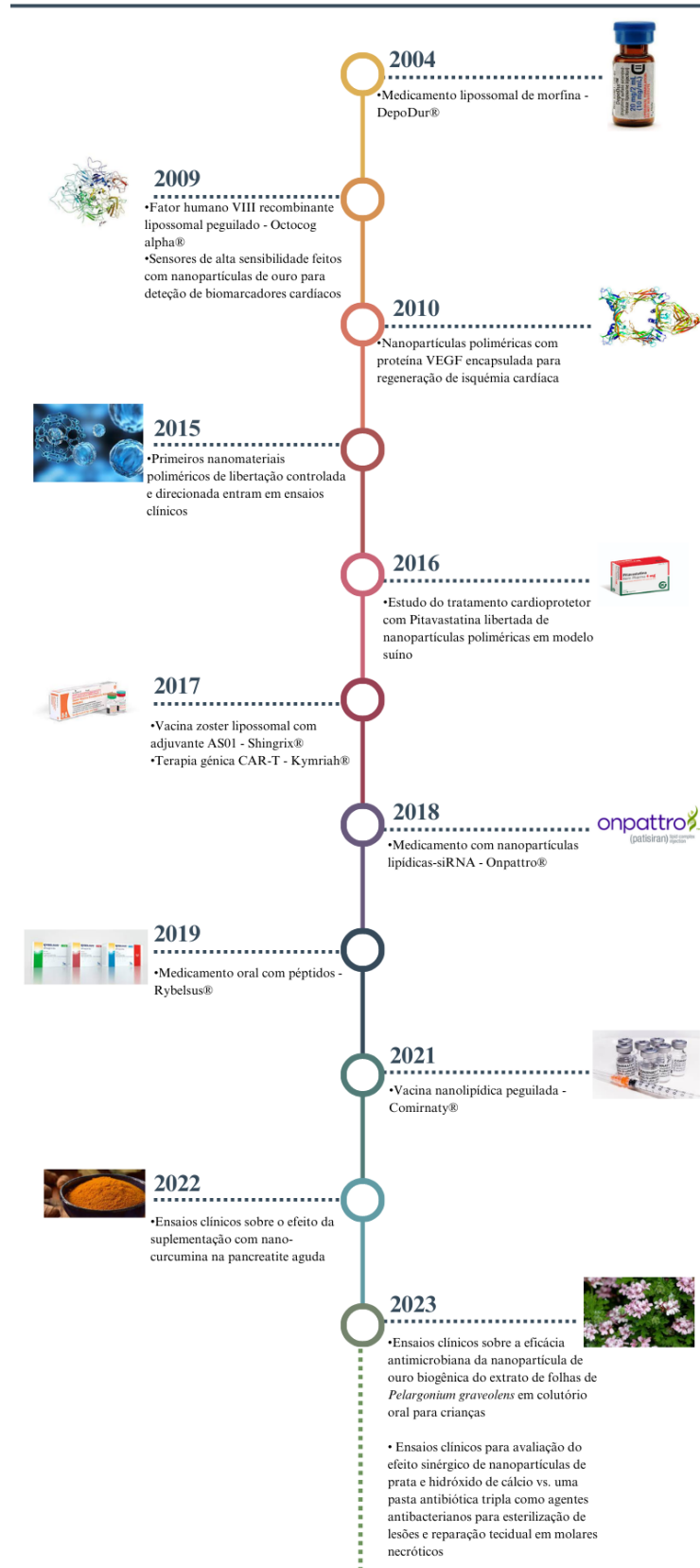


Figura 4 - Evolução e desenvolvimentos dos sistemas de veiculação ao longo do tempo.

Considerando o alvo terapêutico a atingir, a nanopartícula pode ser modificada de diversas formas, nomeadamente através da adição de ligandos (como anticorpos, polímeros, açúcares, aptâmeros, etc.), sendo que é possível também modular a nanopartícula tendo em conta o seu tamanho, forma, constituição e tipo. O tamanho das nanopartículas pode estar relacionado com o local-alvo para o fármaco atuar, por exemplo, consoante a sua razão área-superfície pode ter mais ou menos facilidade em penetrar em certos órgãos. No caso dos pulmões, nanopartículas esféricas com tamanhos maiores que 150 nm são mais facilmente acumuladas (Blanco et al., 2015). Alguns estudos referem que no caso de partículas com um tamanho de cerca de 10 nm ou menos, estas podem acumular-se no cérebro (Najahi-Missaoui et al., 2021). Outros órgãos onde as nanopartículas se podem acumular de forma mais evidente são o fígado, os rins e o baço, especialmente se forem nanopartículas rígidas de grandes dimensões (Blanco et al., 2015).

A constituição de uma nanopartícula pode também ser modificada de forma a modular o transporte e distribuição da substância ativa, bem como a libertação modificada da mesma, podendo ser retardada e/ou prolongada horas, dias ou semanas, ou até intermitente dependendo da funcionalidade. (Santos de Almeida et al., 2017).

Tudo isto mostra como as nanopartículas vieram revolucionar o mundo farmacêutico, sendo possível quase modificar e programar cada etapa e detalhe da farmacocinética de uma substância ativa pela cuidada formulação da nanopartícula a administrar.

A síntese das nanopartículas pode ser feita por vários métodos, mas resumem-se em abordagens “bottom-up” ou “top-down”. No primeiro tipo de abordagem, “bottom-up”, tal como o nome indica é realizada uma construção “de baixo para cima”, ou seja, a nanopartícula é formada a partir de compostos mais pequenos, como átomos ou moléculas; no segundo tipo, é ao contrário, utiliza-se unidades maiores para serem reduzidas à nanoescala, mantendo as propriedades das unidades originais (F. Ahmad et al., 2019).

1.3.1. Nanopartículas baseadas em lípidos

Para as nanopartículas poderem ser utilizadas em veiculação de fármacos para uso humano, necessitam de provar que são biocompatíveis, de modo a evitar rejeição e diminuir efeitos secundários. Como tal, uma das melhores estratégias é a escolha de nanopartículas

baseadas em lípidos, em particular os sistemas nanovesiculares, porque mimetizam as bicamadas fosfolipídicas existentes no corpo humano.

Os lipossomas são um tipo de nanopartícula orgânica, com um diâmetro médio de 100 a 400 nm, constituídos por fosfolípidos organizados numa dupla camada e, eventualmente também de colesterol. Desde a primeira publicação sobre lipossomas, em 1964, que têm sido largamente utilizados (B. Almeida et al., 2020).

Os fosfolípidos ao se orientarem esfericamente dão origem a uma zona hidrofóbica orientada para o interior do revestimento dos lipossomas e uma zona hidrofílica exposta ao meio aquoso, constituída pela zona polar dos fosfolípidos (Figura 5) (Alavi et al., 2017; Soares et al., 2018).

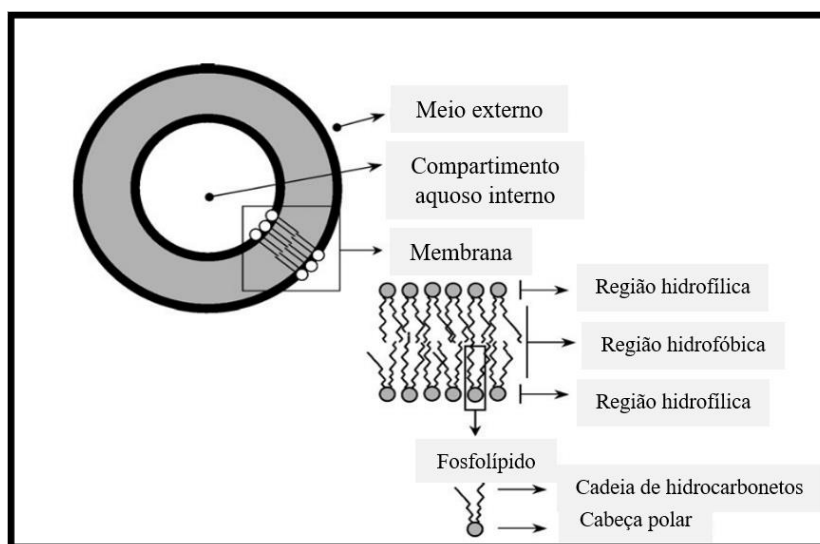


Figura 5 - Lipossoma e a sua constituição fosfolipídica. Adaptado de (Arajo Lopes et al., 2013).

As moléculas que os integram são desejáveis de possuírem características dentro de alguns intervalos, nomeadamente: peso molecular entre 243 g/mol e 1278 g/mol, ponto de fusão entre 108 °C e 255 °C e um log P entre -3,2 e 5,5 (Shah et al., 2020).

Os lipossomas são muito utilizados e já foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) como sistemas de veiculação direcionada de fármacos (Tabela 1). Estes

mostram uma eficiência de encapsulação e um tempo de circulação no organismo elevados, principalmente se forem lipossomas com diâmetro menor do que 200 nm (Mitchell et al., 2021). Dos primeiros medicamentos baseados em lipossomas aprovados pela FDA foi o Doxil®, em 1995, um medicamento anticancerígeno utilizado para o tratamento do cancro do ovário e outros tipos de cancro, que demonstrou provocar menor cardiotoxicidade do que uma formulação convencional, logo menores efeitos secundários (Blanco et al., 2015).

Tabela 1 - Medicamentos utilizando nanomedicina aprovados pela FDA nos últimos 25 anos. Adaptado de (Mitchell et al., 2021).

Medicamento	Indústria farmacêutica	Indicação terapêutica	Data de aprovação no mercado
Nanopartículas Lípidicas			
Doxil	Janssen	Sarcoma de Kaposi, cancro do ovário, mieloma múltiplo	1995
DaunoXome	Galen	Sarcoma de Kaposi	1996
AmBisome	Gilead Sciences	Infeções fúngicas/protozoárias	1997
Visudyne	Bausch and Lomb	Degeneração macular associada à idade, miopia, histoplasmose ocular	2000
Marqibo	Acrotech Biopharma	Leucemia linfoblástica aguda	2012
Onivyde	Ipsen	Cancro pancreático metastático	2015
Vyxeos	Jazz Pharmaceuticals	Leucemia mielóide aguda	2017
Onpattro	Alnylam Pharmaceuticals	Amiloidose mediada por transtirretina	2018
Nanopartículas Poliméricas			
Oncaspar	Servier Pharmaceuticals	Leucemia linfoblástica aguda	1994
Copaxone	Teva	Esclerose múltipla	1996
PegIntron	Merck	Infeção por Hepatite C	2001
Eligard	Tolmar	Cancro da próstata	2002
Neulasta	Amgen	Neutropenia induzida por quimioterapia	2002
Abraxane	Celgene	Cancro do pulmão, cancro da mama metastático, cancro pancreático metastático	2005
Cimiza	UCB	Doença de Crohn, artrite reumatóide, artrite psoriática, espondilite anquilosante	2008

Plegridy	Biogen	Esclerose múltipla	2014
ADYNOVATE	Takeda	Hemofilia	2015
Nanopartículas Inorgânicas			
INFeD	Allergan	Anemia por défice de ferro	1992
DexFerrum	American Regent	Anemia por défice de ferro	1996
Ferrlecit	Sanofi	Deficiência de ferro na doença renal crónica	1999
Venofer	American Regent	Deficiência de ferro na doença renal crónica	2000
Feraheme	AMAG	Deficiência de ferro na doença renal crónica	2009
Injectafer	American Regent	Anemia por défice de ferro	2013

Entretanto, mais de uma dezena de nanoformulações já obtiveram a aprovação da FDA para uso humano para doenças desde infeções bacterianas, fúngicas, cancro e doenças do foro respiratório e dermatológico, sendo que foram submetidos já cerca de 330 medicamentos a ensaios clínicos. Os mais recentes aprovados pela FDA foram Onivyde® em 2015, Vyxeos® em 2017 e Onpattro® em 2018 (B. Almeida et al., 2020).

Os lipossomas permitem a acumulação de um fármaco na região onde se verifica a patologia, reduzindo assim eventos de toxicidade e ineficácia terapêutica. Em relação a outros tipos de nanopartículas, são considerados não tóxicos por serem constituídos pelos mesmos compostos que as membranas das células dos seres humanos (Najahi-Missaoui et al., 2021; Riaz et al., 2018). Adicionalmente, são também muito adaptáveis a vários meios, permitem adicionar moléculas à sua superfície que lhes conferem características específicas, penetram facilmente a barreira celular e são biodegradáveis, o que facilita a sua expulsão do organismo (De Leo et al., 2022).

A preparação de lipossomas pode ser feita por três métodos:

- Hidratação do filme lipídico;
- Substituição de solventes orgânicos por soluções aquosas;
- Inversão de fase.

A escolha do método a utilizar depende de vários parâmetros como: qual é a aplicação terapêutica, quais são as propriedades dos lípidos constituintes e qual é o meio onde se espera que a substância ativa seja libertada (Soares et al., 2018).

De maior importância e mais simples, o método de hidratação do filme lipídico é o mais amplamente utilizado. Os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico, como o metanol e/ou clorofórmio, seguido de agitação. Depois, é necessário remover o(s) solvente(s) utilizado(s) através de evaporação a pressão reduzida, até que se observa a formação de um filme lipídico. Segue-se a sua hidratação em meio aquoso e, assim, obtêm-se espontaneamente os lipossomas. De forma a reduzir e homogeneizar o tamanho dos lipossomas obtidos, podem ser utilizadas várias estratégias como a sonicação ou a extrusão. Depois de preparados, os lipossomas devem então ser caracterizados para se confirmarem as suas propriedades (Arajo Lopes et al., 2013; De Leo et al., 2022).

Apesar das variadas vantagens e do seu extenso uso, os lipossomas apresentam alguma rigidez na sua estrutura o que limita a sua permeação nas células ou através da pele. Têm um custo de produção elevado, baixa capacidade de encapsulação de fármacos hidrofílicos, baixo tempo de semi-vida e elevada probabilidade de fusão das moléculas encapsuladas (Garg & Jain, 2022; Opatha et al., 2020).

As desvantagens dos lipossomas estiveram na origem do desenvolvimento de vários nanossistemas vesiculares. Por exemplo, a limitada capacidade dos lipossomas penetrarem na pele esteve na origem do desenvolvimento dos transferossomas.

A palavra transferossoma provém do termo latim “*transfere*” que significa “passar através de” (Fernández-García et al., 2020). Os transferossomas são nanossistemas vesiculares com até cerca de 300 nm, idênticos na morfologia em relação os lipossomas, mas diferentes na composição, permitindo uma maior elasticidade estrutural e fluidez membranar. Os lipossomas são constituídos por fosfolípidos e colesterol e os transferossomas são formados por fosfolípidos e surfactantes. Nomeadamente, contêm cerca de 15-20% de surfactantes, sendo os mais comumente utilizados o colato de sódio, Tween® ou Span® e em maior quantidade os fosfolípidos anfipáticos (Jain et al., 2003; Wu et al., 2021).

Foram desenvolvidos por Cevc nos finais da década de 80, início da década de 90. A sua principal diferença e que traz uma enorme vantagem a estas nanopartículas é a presença de ativadores de superfície, isto é, surfactantes que são intercalados na bicamada fosfolipídica. Os surfactantes são moléculas que possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, permitindo-se adsorver à superfície do sistema vesicular e funcionam como ativador de superfície ou como destabilizador da membrana fosfolipídica. Pela redução da tensão superficial das vesículas permite que estas se deformem, ao aumentar o raio de curvatura da bicamada, o que facilita a

penetração da vesícula nos tecidos mais profundos da pele (Balamurugan K, 2018; Pereira-Leite & Ventura, 2020; Santos et al., 2019). A escolha dos surfactantes deve ser cuidadosa e ter por base a lipofilia das substâncias ativas a incorporar. Se estamos perante uma substância mais lipofílica devem ser utilizados tensoativos com um equilíbrio hidrofílico-lipofílico mais baixo. A escolha acertada pode aumentar em 50% a eficácia de penetração na pele do transferossoma (Opatha et al., 2020).

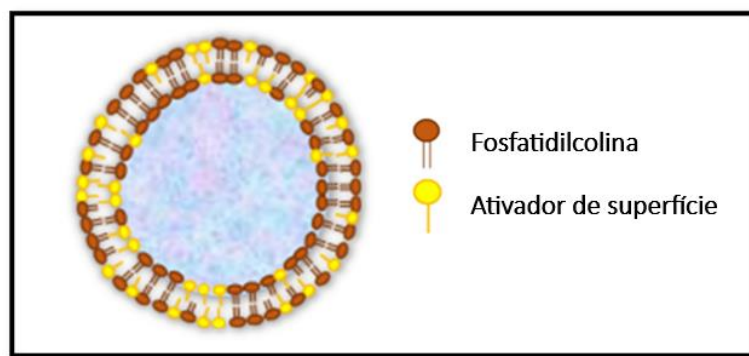


Figura 6 - Estrutura dos transferossomas. Retirado de (Opatha et al., 2020).

Com a investigação em transferossomas, percebeu-se que seria ideal utilizar estas nanopartículas altamente deformáveis, elásticas, resistentes e biocompatíveis para servir de veículo a compostos ativos, hidrofílicos ou lipofílicos, com alta ou baixa solubilidade em água. Para isso, as partículas não devem ser maiores que 300 nm, de forma a atingirem camadas mais profundas da pele (Benson, 2006; Guerreiro et al., 2021).

A permeação dos transferossomas na pele pode ocorrer por três vias:

- através dos folículos pilosos associadas às glândulas sebáceas;
- através dos canais das glândulas sudoríparas;
- através do estrato córneo (Garg & Jain, 2022).

O estrato córneo é constituído por uma matriz de queratina, ceramidas de longa cadeia, colesterol, ácidos gordos, que criam uma barreira do tipo “cimento e tijolo” que só moléculas com características especiais conseguem passar (Benson, 2006; Fernández-García et al., 2020). Os transferossomas como possuem os ativadores de superfície adquirem propriedades

superiores de adaptação, permeação e veiculação no organismo humano, sendo por isso capazes de deformar reversivelmente a camada da pele, deformando-se ao reduzirem o seu diâmetro entre 5 a 10 vezes, chegando até aos tecidos mais profundos, ao contrário dos lipossomas que se mantêm nas camadas mais superficiais da pele, uma vez que não se conseguem deformar para facilitar a passagem intracelular ou intercelular (Benson, 2006).

Com estas características, os transferossomas são ainda mais vantajosos que os lipossomas. Há um transporte de fármaco mais otimizado, com menos perdas, maior eficiência na entrega e prolongamento da duração da ação, tanto se podem encapsular fármacos lipofílicos como hidrofílicos, proteínas, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), interferões, entre outros componentes, e continuam a ser biocompatíveis e biodegradáveis (Opatha et al., 2020).

Porém, nem tudo são vantagens e, como tal, também há desvantagens a ter em conta no uso de transferossomas (Tabela 2). São passíveis de oxidar pela composição lipídica que apresentam, os custos de produção ainda são elevados quando se pretende transpor para uma larga escala e, uma vez que se utiliza fosfolípidos de origem natural, a pureza dos mesmos é difícil de garantir e apesar da facilidade de produção, esta tem um custo elevado (Opatha et al., 2020).

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos transferossomas. Baseado em (Opatha et al., 2020).

Vantagens	Desvantagens
Composição hidrofílica e hidrofóbica que permite uma elevada solubilidade	Instabilidade química por oxidação
Capacidade de deformação vesicular de forma a penetrar as camadas mais profundas da pele	Difícil atingir a pureza dos fosfolípidos, uma vez que são naturais
Encapsulação de diferentes substâncias, como proteínas, insulina, interferões, AINEs, corticosteroides, anticancerígenos, etc	Custo de produção elevado, a nível dos excipientes e do material
Formados por fosfolípidos e ativadores de superfície biodegradáveis e biocompatíveis	
Fácil produção em larga escala	
Maior biodisponibilidade porque não sofre efeito de primeira passagem	
Ação direcionada ao local necessário	

Existem estudos em que os transferossomas foram utilizados como veículo do diclofenac para aplicação tópica, fármacos anti-inflamatórios, antibacterianos, anestésicos, esteróides (Benson, 2006), são tudo grupos farmacológicos que podem vir a beneficiar das vantagens dos transferossomas.

No caso do diclofenac, o medicamento Transfenac® era constituído por transferossomas para aplicação tópica do diclofenac. Nos estudos de comparação entre o transferossoma e uma formulação de hidrogel do mesmo fármaco, conclui-se que era necessário três vezes mais concentração do fármaco no hidrogel para atingir valores mínimos correspondentes ao Transfenac® no tecido muscular a tratar (Benson, 2006). O Diractin®, por seu lado, constituído por cetoprofeno incorporado em transferossomas, foi pensado para tratar a osteoporose nos joelhos. Atingiu a terceira fase dos ensaios clínicos por demonstrar uma potência de ação superior no alívio da dor durante um período de tratamento de 6 semanas e menos efeitos secundários quando comparado com o medicamento convencional. Também iniciaram ensaios clínicos relativos a uma formulação de insulina encapsulada em transferossomas (Transfersulin®) para atenuar efeitos hipoglicemiantes ao conseguir atingir a corrente sanguínea (Opatha et al., 2020; Primavera et al., 2020). A pentofixilina, fármaco vasodilatador periférico, foi formulado em transferossomas com colato de sódio e verificou-se um aumento na permeação do fármaco de 9,1 vezes na pele dos ratos, considerando-se mais efetivo que o sistema de veiculação tradicional (Garg & Jain, 2022). A Vancomicina, um antibiótico utilizado em meio hospitalar no combate a infeções por bactérias resistentes, também foi veiculada em transferossomas para administração por via IV, uma vez que não é absorvido no intestino (Kiranjeet et al., 2022). Um outro estudo estudou ainda a possibilidade de utilizar a vancomicina por via transdérmica, uma nova possível via de administração do fármaco (Maji et al., 2021). No entanto, a vancomicina tem um peso molecular elevado 1485,7 Da, logo a sua incorporação em transferossomas foi uma hipótese. Foi demonstrado que a incorporação de cloridrato de vancomicina em transferossomas incorporados num bigel (combinação de um hidrogel e um organogel), era vantajosa em comparação com a incorporação apenas em transferossomas ou em sistema de veiculação típicos. A atividade antimicrobiana foi mais elevada, com maior permeabilidade cutânea e maior biodisponibilidade do fármaco (Kiranjeet et al., 2022; Maji et al., 2021). Estes exemplos mostram a potencialidade dos transferossomas para veiculação cutânea.

1.4. Motivações e Objetivo

O interesse em substâncias farmacologicamente ativas nem sempre se revela fácil no que diz respeito à sua transposição para o uso humano, por inúmeras razões, sendo uma delas a baixa solubilidade em água que muitos compostos ativos apresentam. O ácido ferúlico é um destes compostos que combina um elevado interesse por apresentar propriedades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, entre outras, ao mesmo tempo que apresenta uma baixa solubilidade em água. De facto, este composto tem bastante potencial para ser utilizado para administração cutânea, por exemplo, em cremes de aplicação tópica ou adesivos transdérmicos.

Com a constante investigação científica, descobriu-se que os LI podem ser excipientes interessantes para ultrapassar o obstáculo da baixa solubilidade em água de compostos ativos. Pela sua versatilidade, é possível aumentar significativamente a solubilidade em água de um composto ativo através da sua conjugação com LI, dando origem aos chamados API-IL (Viciosa et al., 2015). Assim, aumenta a probabilidade de diversos compostos ativos com potencial para uso humano chegarem efetivamente à clínica.

Dadas as propriedades farmacêuticas do ácido ferúlico, a sua aplicação ao nível cutâneo pode ser vantajosa, nomeadamente na área cosmética. Cada vez mais existem produtos cosméticos nanoformulados, como por exemplo cremes anti-envelhecimento de várias marcas. Outro exemplo são os filtros UV nos protetores solares, muitos deles já utilizam nanopartículas para conseguirem uma melhor espalhabilidade e transparência do protetor solar e, por isso, maior proteção da pele contra os raios UV (Kaur et al., 2007). Outro exemplo na área cosmética, mas com uma função que pode ser considerada terapêutica, é a patente do ácido glicirretínico, inibidor da produção de sebo, formulado em nanopartículas poliméricas biocompatíveis, capazes de libertar de forma prolongada o ácido glicirretínico para o tratamento diário de pele acneicas e oleosas (Santos et al., 2019)

Recentemente, foram desenvolvidos os TransfersomILs – transferossomas combinados com LI para veicular a Rutina (Júlio et al., 2022). Este composto é um bioflavonóide fenólico hidrófobo com propriedades antiinflamatórias, fotoprotetoras e antioxidantes já largamente descritas na literatura (Sharma et al., 2013). No estudo realizado para avaliar o impacto da incorporação de líquidos iónicos em formulações transferossomais para veicular a rutina observou-se que os TransfersomILs apresentaram propriedades físico-químicas mais promissoras, maior eficiência de associação e uma maior quantidade total de

rutina libertada do que os transferossomas convencionais. Além disso, estes nanossistemas inovadores apresentaram também melhor estabilidade coloidal e de armazenamento (Júlio et al., 2022).

Assim, este trabalho teve como objetivo explorar duas estratégias para ultrapassar a questão da baixa solubilidade em água do ácido ferúlico, uma delas centrada na síntese de um API-IL e a outra centrada na incorporação de ácido ferúlico em Transferossomas. Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

- a) Síntese e caracterização físico-química do ferulato de colina;
- b) Produção de transferossomas para veicular o ácido ferúlico na ausência e presença de LI, nomeadamente [Emim][Gly] e [Cho][Gly].
- c) Caracterização físico-química dos transferossomas em termos de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de associação e capacidade de carga.
- d) Estudo da estabilidade dos transferossomas ao longo do armazenamento.

Capítulo II. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Para a síntese de ferulato de colina utilizou-se: hidróxido de colina em 45% de metanol [Cho][OH]/MeOH da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América (EUA)), ácido ferúlico da Henrifarma (São Paulo, Brasil) e metanol da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

A lecitina de soja da Alfa Aesar (Kandel, Alemanha) em conjunto com Tween® 80 da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), clorofórmio e metanol da Honeywell Riel-de Haën™ (Düsseldorf, Alemanha), bem como água bidestilada foram utilizados para a produção de transferossomas na ausência e presença de ácido ferúlico (Henrifarma, São Paulo, Brasil).

Os líquidos iónicos – 2-hidroxi-3-trimetilamónio de glicinato [Cho][Gly] e 1-etil-3-metilimidazólio de glicinato [Emim][Gly] – foram sintetizados no âmbito de um projeto de doutoramento a decorrer no CBIOS.

2.2. Síntese do ferulato de colina

O ferulato de colina foi preparado com base na literatura existente (N. A. Ahmad et al., 2019), mas com algumas modificações no que diz respeito aos solventes utilizados. Desta forma, uma quantidade equimolar (57,76 mmol) de composto fenólico foi adicionada a uma quantidade equimolar de hidróxido de colina em 45 % metanol [Cho][OH]/MeOH (57,76 mmol), sob agitação. Depois, 50 mL de metanol foi adicionado à mistura anterior, ficando por 22 h em agitação à temperatura ambiente, com tubo de cloreto de cálcio (CaCl₂) coberto com papel de alumínio. Após este tempo, o solvente foi evaporado a vácuo (IKA®-WERKE GMBH & CO, RV06-ML, Alemanha) durante cerca de 1 h a 60 °C e depois armazenado.

2.3. Caracterização do ferulato de colina

A análise foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a reflexão total atenuada (FTIR-ATR) através do equipamento PerkinElmer® Spectrum 400 (Waltham, MA, EUA). Analisou-se o ácido ferúlico no estado sólido e o ferulato de colina – [Cho][AF] – no estado líquido e os espetros foram obtidos entre os 4000 e 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹, com base em 100 scans.

2.4. Estudos de solubilidade

Tanto o ácido ferúlico, como o [Cho][AF] foram submetidos a estudos de solubilidade aquosa a 25 ± 2 °C, durante 72 h, com recurso a um agitador horizontal – IKA VIBRAX VXR®, LTF Labortechnik GmbH & Co. (Bodensee, Alemanha). Após atingir o equilíbrio, as dispersões em estudo foram filtradas e a solubilidade de cada composto foi determinada com base no método da curva de calibração por espectrofotometria UV-Vis usando o equipamento Evolution® 300 (Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra). O comprimento de onda de máxima absorção selecionado para obtenção da curva de calibração foi 308 nm e 313 nm no caso do [Cho][AF] e do AF, respetivamente.

2.5. Produção dos transferossomas

Através do método de hidratação do filme lipídico prepararam-se os transferossomas, constituídos pelo ativador de superfície Tween® 80 e pela lecitina de soja que foram dissolvidos em clorofórmio:metanol (3:1). Esta mistura na ausência ou presença de ácido ferúlico e/ou de líquidos iónicos foi colocada num evaporador rotativo a 40 °C e 100 rpm durante 15 min para evaporação dos solventes orgânicos. De forma a remover os traços de solventes que poderiam ainda existir, o filme lipídico foi ainda sujeito a vácuo durante 2 h. Este filme foi então hidratado sob agitação, antes da dispersão ser submetida a um processo de sonicação durante 20 minutos a 50% de amplitude no Q125 Sonicator (QSonica Sonicators, Newtown, CT, EUA). Por fim, os transferossomas foram deixados a equilibrar durante 30 min no agitador horizontal IKA VIBRAX VXR® (LTF Labortechnik GmbH & Co., Bodensee, Germany).

A Tabela 3 apresenta a composição qualitativa e quantitativa das formulações transferossomais produzidas.

Tabela 3 - Composição qualitativa e quantitativa das formulações transferossomais.

Formulações	Composição qualitativa e quantitativa			
	Lecitina de soja (% m/v)	Tween® 80 (% m/v)	AF (% m/v)	LI (% v/v)
Controlo	4	0,21	0	0
AF	4	0,21	0,06	0
AF + [Emim][Gly]	4	0,21	0,06	0,2
AF + [Emim][Br]	4	0,21	0,06	0,2
AF + [Cho][Gly]	4	0,21	0,06	0,2

2.6. Caracterização dos transferossomas

A. Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

Cada formulação transferossomal foi analisada em triplicado quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) através de espectroscopia de correlação fotónica, com recurso ao equipamento Delsa™ Nano C Particle Analyser (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EUA). O potencial zeta dos transferossomas foi também analisado em triplicado com recurso ao equipamento NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA). Ambas as análises foram realizadas após diluir as formulações 50x em água destilada.

B. Eficiência de associação e capacidade de carga

De forma a avaliar a eficiência de associação e a capacidade de carga, recorreu-se a dispositivos de centrifugação VIVASPIN® 500 (MW 50000, Sartorius, Goettingen, Alemanha) para separar o sobrenadante dos transferossomas. Assim, 500 µl de cada formulação transferossomal foi sujeita a centrifugação nestes dispositivos durante 40 min a 12000 xg, sendo que cada formulação foi analisada em duplicado.

O sobrenadante obtido foi posteriormente diluído 4x antes de ser doseada a quantidade de ácido ferúlico que não foi encapsulada com recurso ao método da curva de calibração com base nos resultados de espectrofotometria UV-Vis – Evolution® 300 (Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra) ao máximo de absorção.

A curva de calibração do ácido ferúlico obtida, ao comprimento de onda de absorção máxima de 313 nm, foi $y=0,0976x-0,0278$ ($R^2=0,9991$), considerando a concentração em µg/mL. Através desta equação, foi possível obter a concentração de ácido ferúlico livre (Qf) e sabendo a concentração total de ácido ferúlico adicionada (Qt) e a concentração de lípidos adicionados (Ql), foi então possível calcular a eficiência de associação (EA) e a capacidade de carga (CC), conforme as equações descritas abaixo:

$$\% EA = \frac{Q_t - Q_f}{Q_t} \times 100$$

$$\% CC = \frac{Q_t - Q_f}{Q_l} \times 100$$

2.7. Estabilidade dos transferossomas

A estabilidade dos transferossomas sob armazenamento refrigerado (5 ± 3 °C) foi estudada através da avaliação do tamanho de partícula, PDI e potencial zeta durante 1 mês. Em particular, cada formulação foi analisada ao primeiro dia, após 15 dias de armazenamento e após 30 dias conforme descrito na seção 2.6 A.

Capítulo III. Resultados e Discussão

3.1. Síntese do ferulato de colina

O API-IL ferulato de colina – [Cho][AF] – foi sintetizado conforme a reação descrita na Figura 7. Utilizou-se o hidróxido de colina como catião, uma vez que este é biocompatível, biodegradável e não tóxico (Islam et al., 2020). A síntese teve como base a reação ácido-base, utilizando a base colina e o ácido ferúlico para originar o líquido iónico, através da perda de um hidrogénio instável do anião.

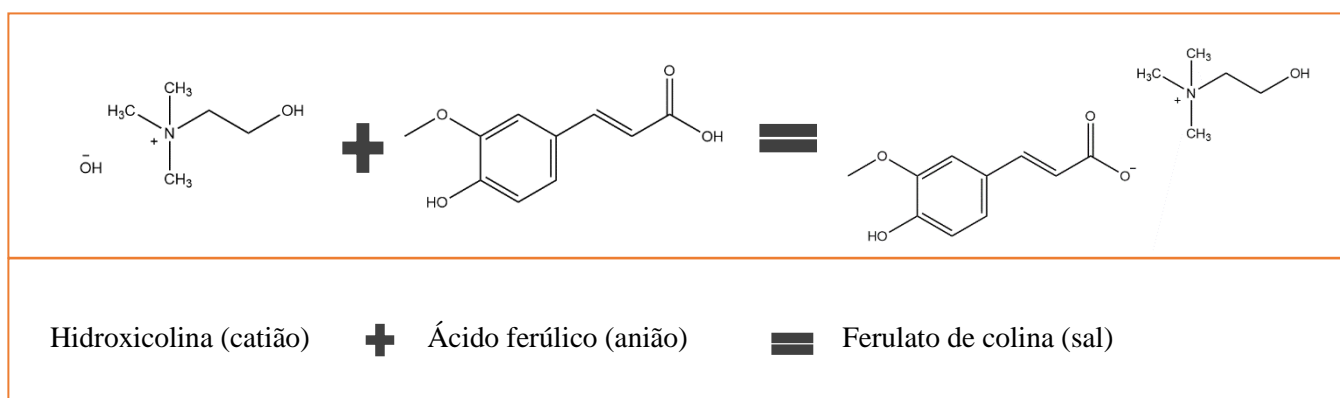


Figura 7 - Reação ácido-base de formação do ferulato de colina. Adaptado de (Bezerra et al., 2020).

O líquido iónico sintetizado era viscoso à temperatura ambiente, com uma cor amarelo-escuro/acastanhado e a síntese apresentou um rendimento de cerca de 80% (Tabela 4). Previamente este LI já tinha sido sintetizado com um rendimento de 43% (Xu et al., 2018), o que indica que o método de síntese utilizado foi mais vantajoso, gerando um rendimento do produto mais elevado.

Tabela 4 - Estrutura química, estado físico à temperatura ambiente (TA) e rendimento da reação de síntese do ferulato de colina.

Acrónimo	Catião	Anião	Cor	Estado físico à TA	Rendimento da reação (%)
[Cho][AF]			Amarelo escuro	Líquido viscoso	78,9

3.2. Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Para confirmar a síntese de [Cho][AF], utilizou-se a técnica de FTIR para analisar o ácido ferúlico e o respetivo líquido iónico sintetizado, como demonstra a Figura 8.

O FTIR é um método interessante para identificar os grupos funcionais das moléculas, uma vez que cada grupo funcional apresenta bandas características no espectro. Assim, sabemos que o ácido ferúlico tem um grupo carboxilo (C=O) na sua estrutura e a vibração deste grupo funcional é descrita por uma banda a cerca de 1700 cm^{-1} (LibreTexts libraries, 2020). Na figura vemos, então, um pico no ácido ferúlico aos 1690 cm^{-1} que corresponde ao grupo ácido carboxílico.

Por outro lado, o líquido iónico forma-se porque há uma perda de um hidrogénio do ácido carboxílico dando origem a um carboxilato, que não contém nem uma ligação C=O, nem uma ligação C-O, logo se a síntese tiver sido corretamente sintetizada não aparecerá um pico aos 1690 cm^{-1} correspondente ao grupo carboxilo. Isto de facto verificou-se (Figura 8) e, como tal, foi sintetizado o líquido iónico tal como se esperava.

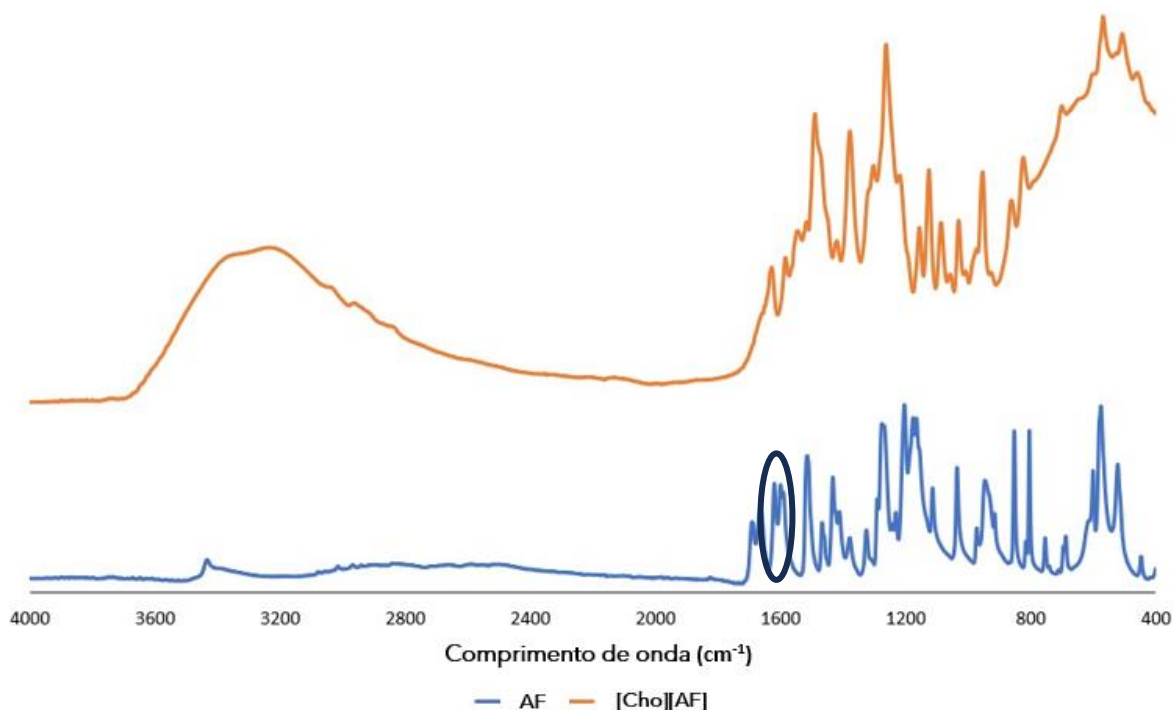


Figura 8 - Espetro de FTIR do ácido ferúlico e o respetivo líquido iónico, ferulato de colina.

3.3. Estudos de solubilidade

No sentido de verificar que o API-IL sintetizado apresentava solubilidade aquosa superior ao seu anião correspondente, realizaram-se estudos de solubilidade do ácido ferúlico e do respetivo líquido iónico.

Nestes estudos de solubilidade, observou-se uma diferença notável entre a solubilidade do ácido ferúlico e do seu correspondente líquido iónico, tal como está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Solubilidade do ácido ferúlico e do ferulato de colina em água desionizada a 25 ± 2 °C (n=3, média \pm desvio padrão).

Fármaco	Solubilidade (mg/mL)
AF	$0,67 \pm 0,01$
[Cho][AF]	$15,6 \pm 0,1$

AF/AF-LI rácio: 23

A solubilidade do ácido ferúlico obtida ($0,67 \pm 0,01$ mg/mL) está de acordo com a descrita na literatura ($0,63 \pm 0,04$ mg/mL) (Caparica et al., 2021), nestas mesmas condições experimentais. É de notar que a solubilidade aquosa do [Cho][AF] é 23 vezes superior à do seu ácido de origem. No geral, este aumento da solubilidade pela transformação em API-IL pode dever-se às ligações de hidrogénio formadas entre a água e o ativo e à fraca força de Coulomb. Estas ligações fracas reduzem a formação de estruturas polimórficas, o que consequentemente melhora as limitações de solubilidade dos ingredientes ativos, biodisponibilidade e estabilidade, não perdendo as suas atividades biológicas interessantes do ponto de vista farmacológico (Jiang et al., 2022).

A literatura referente à melhoria de solubilidade obtida com a síntese de outros API-ILs é bastante promissora. Num estudo realizado com dois anti-inflamatórios comumente utilizados, o ibuprofeno e o naproxeno, foi possível melhorar a solubilidade aquosa do ibuprofeno e do naproxeno em 600 vezes pela síntese do API-IL correspondente utilizando como catião a colina (Sintra et al., 2021). Quanto a outro fármaco, o ácido salicílico, que tem uma solubilidade em água reduzida, de 2,2 g/L, quando transformado em API-IL apresenta uma solubilidade aumentada mais de 400 vezes, tornando-se facilmente solúvel em água e passível

de ser mais facilmente utilizado e adaptado a outras formulações de interesse (Moshikur et al., 2018; Wu et al., 2021).

Portanto, a transformação de compostos ativos nos seus correspondentes API-ILs permite aumentar a solubilidade em água dos mesmos, sendo, por isso, uma estratégia útil para melhorar a solubilidade de substâncias farmacologicamente interessantes e razão pela qual esta estratégia foi estudada no presente trabalho.

3.4. Produção e caracterização de transferossomas

Uma outra estratégia para melhorar a biodisponibilidade de substâncias ativas com baixa solubilidade é a sua incorporação em nanossistemas de veiculação. Assim, foram produzidos transferossomas para encapsular o ácido ferúlico, na ausência e presença de LI para eventualmente melhorar a performance destes nanossistemas.

Inicialmente, deu-se a produção de transferossomas constituídos apenas pelo lípido e pelo ativador de superfície, respetivamente a lecitina de soja e o Tween® 80, designados controlo. Depois, realizou-se a produção de transferossomas na presença de ácido ferúlico. O passo seguinte foi adicionar líquidos iónicos, nomeadamente o [Cho][Gly], escolhido porque tem o catião colina [Cho] que permite estabelecer um meio de comparação entre este LI e o API-IL produzido com o ácido ferúlico, [Cho][AF], e o [Emim][Gly] que tem um imidazol como catião, apresentando propriedades diferentes do catião colina. A glicina é utilizada em ambos os líquidos iónicos por ser biocompatível e por apresentar já dados robustos na literatura (Júlio et al., 2022).

Tabela 6 - Caracterização dos transferossomas tendo em conta o tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), eficiência de associação (EA) e capacidade de carga (CC) (n=2, média \pm desvio padrão).

	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)	EA (%)	CC (%)
Controlo	158 \pm 33	0,28 \pm 0,04	-36 \pm 5	---	---
AF	120 \pm 15	0,30 \pm 0,02	-36 \pm 1	83,7 \pm 0,1	0,64 \pm 0,01
AF + [Emim][Br]	78 \pm 2	0,22 \pm 0,01	-37 \pm 2	88,7 \pm 0,2	1,32 \pm 0,01
AF + [Emim][Gly]	79 \pm 2	0,26 \pm 0,03	-37 \pm 4	93,1 \pm 0,2	2,32 \pm 0,01
AF + [Cho][Gly]	74 \pm 3	0,22 \pm 0,02	-35 \pm 2	94,48 \pm 0,05	3,07 \pm 0,01

Relativamente ao tamanho de partícula há uma diferença notável entre transferossomas contendo LI e os transferossomas sem LI (sem ativo e com ativo). É de notar que se obteve um tamanho cerca de 1,5 vezes superior dos transferossomas controlo em comparação com os contendo [Emim][Gly] e [Cho][Gly]. Assim, a incorporação de líquidos iónicos pode ser uma estratégia interessante para reduzir o tamanho da partícula de transferossomas, tal como descrito anteriormente (Júlio et al., 2022). A diminuição do tamanho da partícula de uma formulação permite aumentar a sua permeação nas barreiras biológicas, como, por exemplo, quanto mais pequena for o tamanho de uma partícula mais facilmente passará membranas como a membrana hematoencefálica, a epiderme ou mesmo capilares sanguíneos ou respiratórios (Blanco et al., 2015).

O índice de polidispersão avalia a uniformidade de tamanho das vesículas presentes na formulação que deve ser o mais reduzido possível e menor que 0,3. Quanto mais semelhança houver no tamanho das partículas, mais eficaz será a formulação, uma vez que apresenta mais partículas com o tamanho pretendido para obter o efeito farmacológico, logo a probabilidade de atingirem o alvo desejado é mais elevada. Segundo os resultados obtidos, todas as formulações apresentam valores de PDI promissores (até cerca de 0,3). É de notar que a incorporação de [Cho][Gly] ou de [Emim][Br] foi vantajosa para melhorar a uniformidade da distribuição de tamanhos dos transferossomas, já que o valor de PDI foi mais reduzido.

Outro parâmetro analisado foi o potencial zeta, um indicador da estabilidade de dispersões coloidais medido através da determinação da velocidade das partículas quando sujeitas a um campo elétrico (Balamurugan K, 2018). As partículas têm carga e a combinação destas cargas, através da repulsão e atração umas das outras, pode contribuir ou não para a estabilidade da dispersão. O valor de potencial zeta é influenciado pela concentração do surfactante utilizado ou mesmo do fármaco utilizado. No geral, para se manter a estabilidade da dispersão, é necessário que o potencial zeta seja elevado, o que significa que haverá maior repulsão entre as cargas, ultrapassando assim as forças de agregação de Van der Waals (Joseph & Singhvi, 2019). Todas as formulações produzidas apresentaram valores de potencial zeta elevados, isto é, menores que -30 mV, pelo que é expectável que apresentem estabilidade coloidal.

O interesse na produção de transferossomas é a capacidade destes para incorporar substâncias de interesse farmacológico, melhorando a sua biodisponibilidade. Assim, é bastante relevante avaliar a eficiência de associação (EA) e a capacidade de carga (CC) dos transferossomas. Através da análise da Tabela 3, verificou-se que a EA e a CC aumentaram quando os líquidos iónicos foram adicionados aos transferossomas. Estes resultados estão em conformidade com a capacidade de os líquidos iónicos em estudo aumentarem a solubilidade do ácido ferúlico, tal como descrito anteriormente (Caparica et al., 2021). De salientar que o [Cho][Gly] parece ser o mais promissor, não só porque aumentou em maior extensão a EA e a CC, mas também porque é biocompatível e, por isso, com um perfil de segurança superior para utilização em humanos.

3.5. Estabilidade dos transferossomas

Para uma formulação poder ser utilizada, esta tem de permanecer estável pelo menos durante um período suficientemente alargado que permita a sua utilização. Assim, realizou-se um estudo de estabilidade quanto aos transferossomas produzidos armazenados sob refrigeração durante 30 dias. A estabilidade dos transferossomas foi avaliada quanto ao tamanho, PDI e potencial zeta e os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras 9-11.

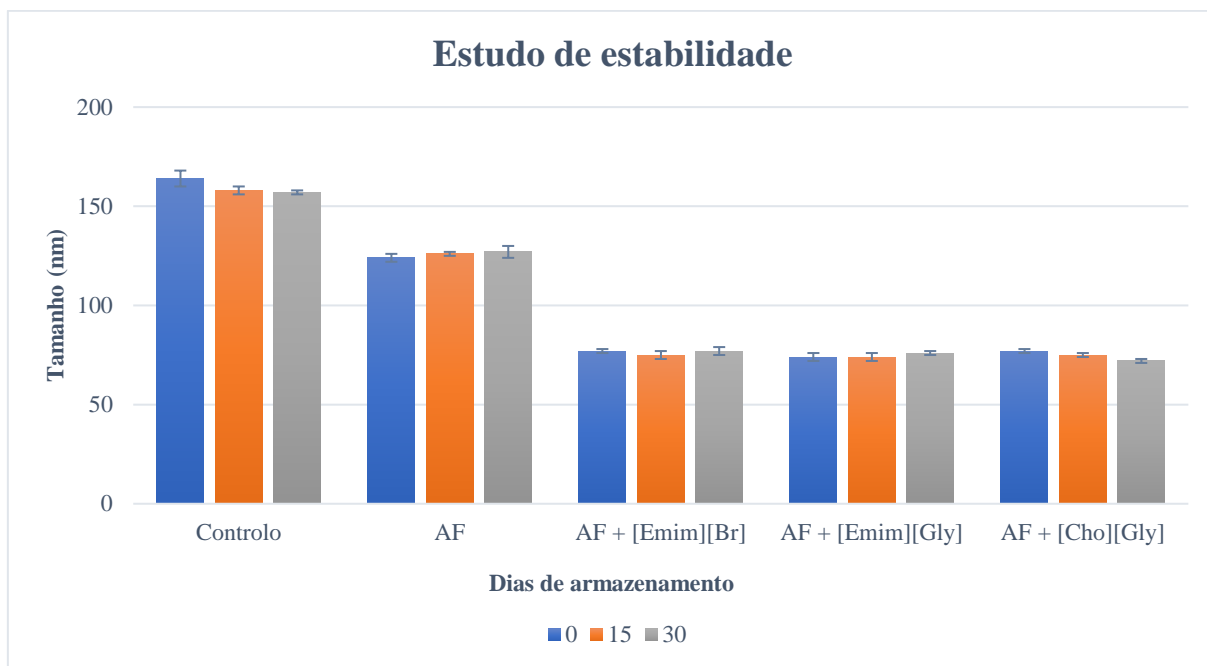


Figura 9 - Tamanho (nm) dos transferossomas ao longo do armazenamento sob refrigeração durante 30 dias.

Os resultados obtidos indicam que ao longo do período em estudo não houve alterações pronunciadas relativas ao tamanho dos transferossomas (Figura 9). Podemos assim concluir que, além de garantirmos a existência de um tamanho pequeno da partícula, os diferentes componentes dos transferossomas não alteram de forma significativa o tamanho da partícula ao longo do tempo. Outros estudos de estabilidade realizados com transferossomas com rutina e os mesmos líquidos iónicos incorporados – [Emim][Br], [Emim][Gly] e [Cho][Gly] – demonstrou resultados diferentes a estes aqui apresentados. Verificou-se um aumento do tamanho de partícula ao dia 30 quando o [Emim][Br] e o [Emim][Gly] foram incorporados (Júlio et al., 2022). Assim, o tipo de ativo parece ter influência na estabilidade do tamanho das partículas.

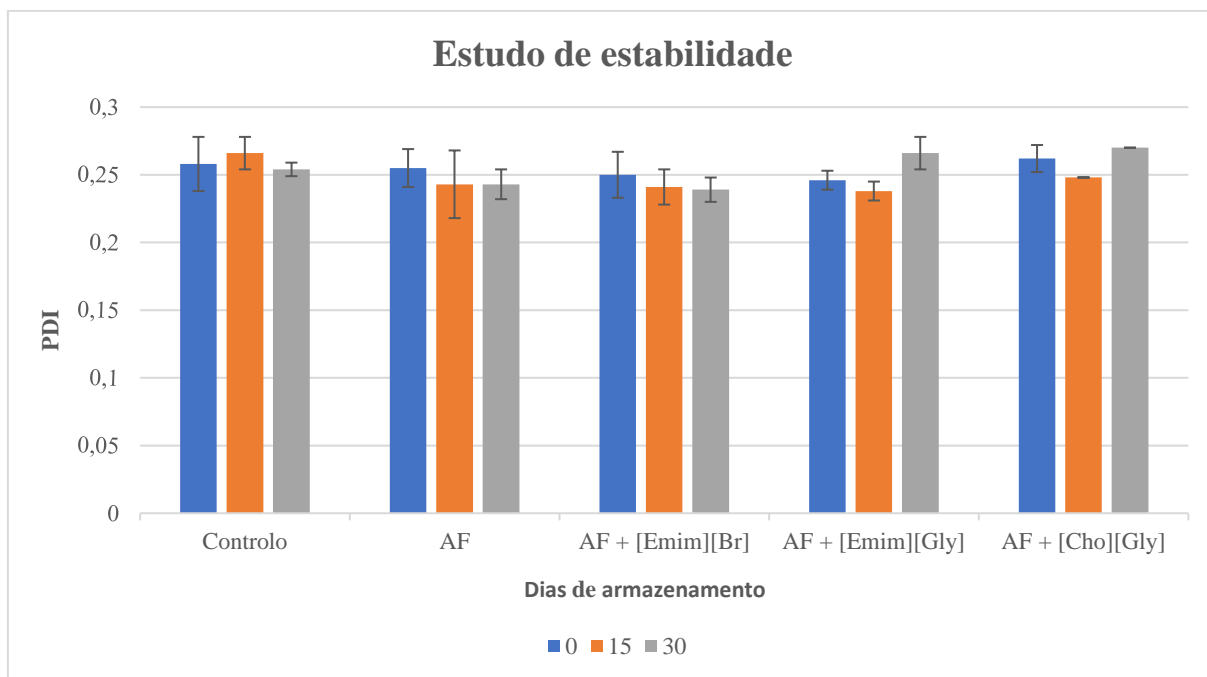


Figura 10 - Índice de polidispersão (PDI) dos transferossomas ao longo do armazenamento sob refrigeração durante 30 dias.

Em linha com este resultado, também não se verificaram diferenças pronunciadas quanto ao PDI (Figura 10), pelo que se manteve a homogeneidade da distribuição de tamanho dos transferossomas durante 30 dias. De acordo com estudos anteriores, sabe-se que os valores desejáveis para transferossomas são valores de PDI abaixo de 0,3 e tamanho de partícula abaixo de 300 nm (Júlio et al., 2022). Assim, transpondo para estes resultados, os valores encontram-se aceitáveis.

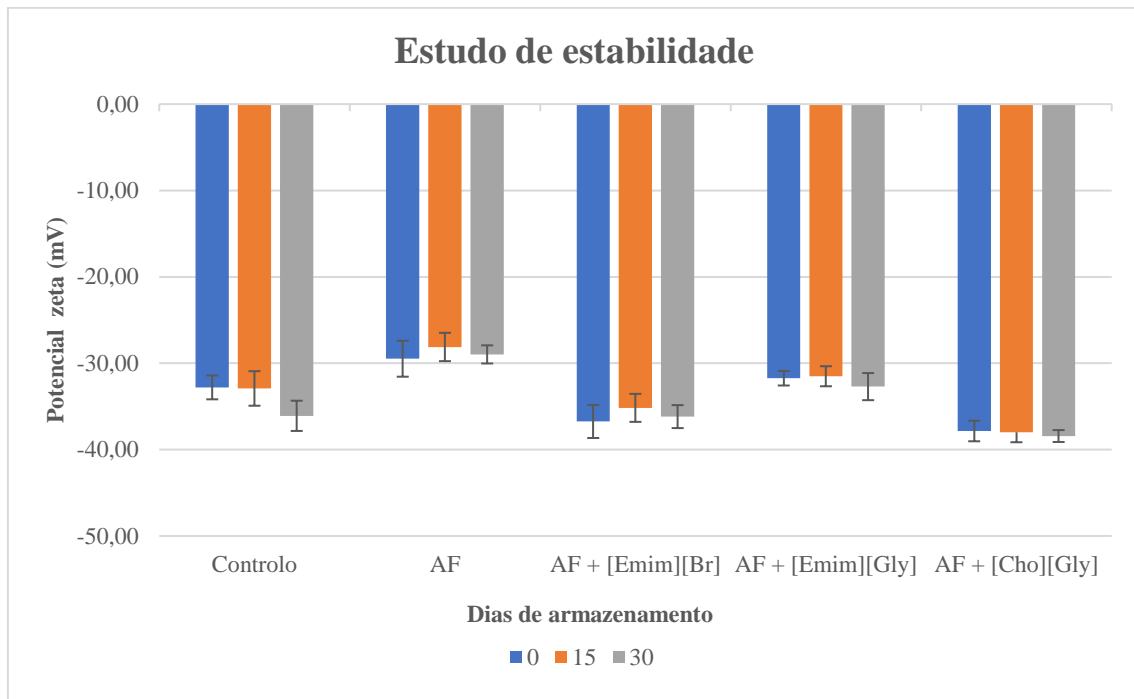


Figura 11 - Potencial zeta dos transferossomas ao longo do armazenamento sob refrigeração durante 30 dias.

A última característica avaliada quanto à estabilidade dos transferossomas, foi o potencial zeta (Figura 11) não se verificando alterações pronunciadas quanto aos valores obtidos durante 1 mês. Como o potencial zeta ideal para transferossomas é abaixo de -30 mV ou maior que +30 mV (Fernández-García et al., 2020), as formulações desenvolvidas mantiveram a estabilidade coloidal ao longo dos 30 dias de armazenamento. Teoricamente, os transferossomas apresentam uma estabilidade coloidal melhor quando comparada com lipossomas, muitas vezes até 3 meses a 4 °C ou a 25 °C. Os lipossomas muitas vezes começam a mostrar alguma agregação entre as partículas, enquanto os transferossomas mantêm a sua integridade estrutural (Fernández-García et al., 2020).

Capítulo IV. Conclusão

Este trabalho pretendeu estudar uma solução para ultrapassar uma limitação que existe na veiculação de substâncias com baixa solubilidade aquosa que apresentam interesse farmacêutico ou cosmético, pois as mesmas tornam-se mais difíceis para veicular para uso humano.

Uma destas substâncias ativas interessantes é o ácido ferúlico. Este apresenta propriedades biológicas interessantes, como o seu poder antioxidante, mas uma reduzida solubilidade em água. Apesar de já ser atualmente utilizado em cosmética, por exemplo, no produto cosmético CE Ferulic da Skinceuticals (Skinceuticals - CE Ferulic, 2023), muito conhecido e procurado pelo seu poder antioxidante, a aplicabilidade do ácido ferúlico, em produtos de saúde e medicamentos, poderia, provavelmente, ser melhorada se este tivesse uma maior solubilidade em água.

Está descrito que a transformação de substâncias com baixa solubilidade aquosa em líquidos iônicos permite aumentar a sua solubilidade. Para tal, foi feita a síntese do líquido iónico do ácido ferúlico – o ferulato de colina – através de uma reação ácido-base com elevado rendimento. No que diz respeito à solubilidade do ferulato de colina, obteve-se um aumento de 23 vezes em relação ao seu ácido correspondente.

Tendo em conta o poder antioxidante do ácido ferúlico, este tem um grande potencial de aplicação na pele, tendo nesse caso de permear as camadas da pele para ter efeito. Para isso, são muitas vezes utilizados veículos de transporte biocompatíveis de tamanho nanométrico, como é o caso dos transferossomas.

Então, foram produzidos transferossomas através de um método simples e que funciona bem em pequena escala – a hidratação do filme lipídico – utilizando o Tween® 80 como ativador de superfície. Estes nanossistemas vesiculares foram preparados com e sem rutina e na ausência e presença de LI. A incorporação de LI nos transferossomas permitiu aumentar a eficiência de associação e a capacidade de carga do AF. Para além disso, permitiu reduzir o tamanho de partícula, o que pode facilitar a permeação cutânea destes sistemas. Entre os vários LI testados, o [Cho][Gly] destacou-se como sendo o mais vantajoso, já que promoveu níveis de encapsulação do AF mais elevados e um tamanho de partícula reduzido com baixos valores de polidispersão.

Ficam por realizar estudos de estabilidade mais aprofundados e extensos, sabendo desde já que os LI escolhidos têm originado resultados promissores. De forma a existir

evidência de uma aplicação segura e possível para a utilização humana, possivelmente para aplicação tópica, seria ainda necessário realizar testes de segurança e eficácia. Subsequentemente, seria ainda necessário compreender de que forma se pode replicar uma produção destas em larga escala, mas com o objetivo de manter ou melhorar, sempre que possível, as propriedades da formulação.

Posto isto e com vista no futuro, o próximo grande passo depois dos estudos anteriormente falados seria incorporar o ferulato de colina em transferossomas e ponderar possíveis utilizações no tratamento cosmético ou farmacológico.

Capítulo V. Referências bibliográficas

- Ahmad, F., Ashraf, N., Ashraf, T., Zhou, R. Bin, & Yin, D. C. (2019). Biological synthesis of metallic nanoparticles (MNPs) by plants and microbes: their cellular uptake, biocompatibility, and biomedical applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issue 7, pp. 2913–2935). Springer Verlag.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09675-5>
- Ahmad, N. A., Jumbri, K., Ramli, A., Ghani, N. A., Ahmad, H., & Kassim, M. A. (2019). Synthesis, characterisation and antioxidant properties of ferulate-based protic ionic liquids: Experimental and modelling approaches. *Journal of Molecular Liquids*, 278, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.01.048>
- Alavi, M., Karimi, N., & Safaei, M. (2017). Application of various types of liposomes in drug delivery systems. In *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (Vol. 7, Issue 1, pp. 3–9). Tabriz University of Medical Sciences. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.002>
- Almeida, B., Nag, O. K., Rogers, K. E., & Delehanty, J. B. (2020). Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25235672>
- Arajo Lopes, S. C. de, Santos Giuberti, C. dos, Ribeiro, T. G., Santos Ferreira, D. dos, Amaral Leite, E., & Cristina, M. (2013). Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. In *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/55290>
- Balamurugan K. (2018). Lipid nano particulate drug delivery: An overview of the emerging trend. ~ 779 ~ *The Pharma Innovation Journal*, 7(7), 779–789.
www.thepharmajournal.com
- Balange, A. K., & Benjakul, S. (2009). Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *LWT*, 42(6), 1059–1064.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.01.013>
- Benson, H. A. E. (2006). Transfersomes for transdermal drug delivery. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 3, Issue 6, pp. 727–737). <https://doi.org/10.1517/17425247.3.6.727>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. In *Nature Biotechnology* (Vol. 33, Issue 9, pp. 941–951). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Caddeo, C., Manca, M. L., Peris, J. E., Usach, I., Diez-Sales, O., Matos, M., Fernández-Busquets, X., Fadda, A. M., & Manconi, M. (2018). Tocopherol-loaded transfersomes: In vitro antioxidant activity and efficacy in skin regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, 551(1–2), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.009>
- 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., 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). <https://doi.org/10.19277/bbr.17.1.225>
- Caparica, R., Júlio, A., Fernandes, F., Araújo, M. E. M., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2021). Upgrading the topical delivery of poorly soluble drugs using ionic liquids as a versatile tool. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094338>
- Chaudhary, A., Jaswal, V. S., Choudhary, S., Sonika, Sharma, A., Beniwal, V., Tuli, H. S., & Sharma, S. (2019). Ferulic Acid: A Promising Therapeutic Phytochemical and Recent Patents Advances. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13(2), 115–123. <https://doi.org/10.2174/1872213x13666190621125048>
- Czerniak, K., Biedziak, A., Krawczyk, K., & Pernak, J. (2016). Synthesis and properties of gallate ionic liquids. *Tetrahedron*, 72(47), 7409–7416. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.09.007>
- de Almeida, T. S., 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>

- De Leo, V., Maurelli, A. M., Giotta, L., & Catucci, L. (2022). Liposomes containing nanoparticles: preparation and applications. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 218). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112737>
- Du, N., Cao, S., & Yu, Y. (2011). Research on the adsorption property of supported ionic liquids for ferulic acid, caffeic acid and salicylic acid. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(19), 1697–1703. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.04.013>
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (n.d.). *REGULATION OF PHYSIOLOGICAL SYSTEMS BY NUTRIENTS Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition*.
- Fernández-García, R., Lalatsa, A., Statts, L., Bolás-Fernández, F., Ballesteros, M. P., & Serrano, D. R. (2020). Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 573). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118817>
- Garg, U., & Jain, K. (2022). Dermal and Transdermal Drug Delivery through Vesicles and Particles: Preparation and Applications. In *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (Vol. 12, Issue 1, pp. 45–57). Tabriz University of Medical Sciences. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.006>
- Gonsior, Dipl.-C. N. (n.d.). *Ionic Liquids. Modern Methods of Synthesis, Polymerization, Characterization, and Application*.
- Guerreiro, Í., Fernandes, A. S., Rosado, C., Pereira-Leite, C., & Rodrigues, M. (2021). Single versus mixed edge activators in caffeine-loaded transfersomes: physicochemical and cytotoxicity assessment. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 18(2), 85. <https://doi.org/10.19277/bbr.18.2.267>
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 173, pp. 501–513). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Islam, M. R., Chowdhury, M. R., Wakabayashi, R., Kamiya, N., Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2020). Ionic Liquid-In-Oil Microemulsions Prepared with Biocompatible Choline Carboxylic Acids for Improving the Transdermal Delivery of a Sparingly Soluble Drug. *Pharmaceutics*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040392>

- Jain, S., Jain, P., Umamaheshwari, R. B., & Jain, N. K. (2003). Transfersomes - A Novel Vesicular Carrier for Enhanced Transdermal Delivery: Development, Characterization, and Performance Evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(9), 1013–1026. <https://doi.org/10.1081/DDC-120025458>
- Jiang, L., Sun, Y., Lu, A., Wang, X., & Shi, Y. (2022). Ionic Liquids: Promising Approach for Oral Drug Delivery. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 39, Issue 10, pp. 2353–2365). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03260-8>
- Joseph, E., & Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* (pp. 91–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2>
- Júlio, A., Costa, J. G., Pereira-Leite, C., & de Almeida, T. S. (2022). Transfersomils: From ionic liquids to a new class of nanovesicular systems. *Nanomaterials*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nano12010007>
- Kaur, I. P., Kapila, M., & Agrawal, R. (2007). Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 6, Issue 4, pp. 271–288). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.006>
- Kiranjeet, K., Gurpreet, K., Hanum, S., Ravika, N., & Kaur, N. J. (2022). Current Status and Future Perspective of Transfersomes-an Effective Vesicular Carrier for Delivery of Drugs. *Journal of Coastal Life Medicine*.
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. In *Biotechnology Reports* (Vol. 4, Issue 1, pp. 86–93). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Li, D., Rui, Y. xin, Guo, S. duo, Luan, F., Liu, R., & Zeng, N. (2021). Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. In *Life Sciences* (Vol. 284). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119921>
- Li, J., Bai, Y., Bai, Y., Zhu, R., Liu, W., Cao, J., An, M., Tan, Z., & Chang, Y. X. (2017). Pharmacokinetics of Caffeic Acid, Ferulic Acid, Formononetin, Cryptotanshinone, and Tanshinone IIA after Oral Administration of Naoxintong Capsule in Rat by HPLC-MS/MS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9057238>

- Li, Y., Liu, C., Zhang, Y., Mi, S., & Wang, N. (2011). Pharmacokinetics of ferulic acid and potential interactions with Honghua and clopidogrel in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 562–567. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.011>
- LibreTexts libraries. (2020). *Infrared Spectroscopy Absorption Table*. 1–7. https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Table/s/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table
- Maji, R., Omolo, C. A., Jaglal, Y., Singh, S., Devnarain, N., Mocktar, C., & Govender, T. (2021). A transferosome-loaded bigel for enhanced transdermal delivery and antibacterial activity of vancomycin hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, 607, 120990. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120990>
- Mathur, S., & Hoskins, C. (2017). Drug development: Lessons from nature. *Biomedical Reports*, 6(6), 612–614. <https://doi.org/10.3892/br.2017.909>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Issue 2, pp. 101–124). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Moshikur, R. M., Chowdhury, M. R., Wakabayashi, R., Tahara, Y., Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2018). Characterization and cytotoxicity evaluation of biocompatible amino acid esters used to convert salicylic acid into ionic liquids. *International Journal of Pharmaceutics*, 546(1–2), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.021>
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2021). Safe nanoparticles: Are we there yet? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>
- Ohno, H. (2019). Synthesis of Ionic Liquids Originated from Natural Products. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 168, pp. 199–214). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/10_2018_68
- Opatha, S. A. T., Titapiwatanakun, V., & Chutopapat, R. (2020). Transferosomes: A promising nanoencapsulation technique for transdermal drug delivery. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 9, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090855>

- Patel, D. D., & Lee, J. M. (2012). Applications of ionic liquids. *Chemical Record*, 12(3), 329–355. <https://doi.org/10.1002/tcr.201100036>
- Pedro, S. N., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Freire, M. G. (2020). The role of ionic liquids in the pharmaceutical field: An overview of relevant applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–50. <https://doi.org/10.3390/ijms21218298>
- Pereira-Leite, C., & Ventura, C. (2020). Optimization of gallic acid-loaded transfersomes using a Box-Behnken factorial design. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(2), 1–13. <https://doi.org/10.19277/BBR.17.2.244>
- Primavera, R., Kevadiya, B. D., Swaminathan, G., Wilson, R. J., De Pascale, A., Decuzzi, P., & Thakor, A. S. (2020). Emerging nano- and micro-technologies used in the treatment of type-1 diabetes. In *Nanomaterials* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano10040789>
- PubChem. (2023). *Ferulic acid (Compound)*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid#section=2D-Structure>
- Raj, N. D., & Singh, D. (2022). A critical appraisal on ferulic acid: Biological profile, biopharmaceutical challenges and nano formulations. *Health Sciences Review*, 5, 100063. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2022.100063>
- Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., Zhang, G., Lu, A., & Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>
- Richards, D. A., Maruani, A., & Chudasama, V. (2016). Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chemical Science*, 8(1), 63–77. <https://doi.org/10.1039/c6sc02403c>
- Santos, A. C., Morais, F., Simões, A., Pereira, I., Sequeira, J. A. D., Pereira-Silva, M., Veiga, F., & Ribeiro, A. (2019). Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 16, Issue 4, pp. 313–330). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1585426>
- 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>
- Shah, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M. S., & Perrie, Y. (2020). Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vols. 154–155, pp. 102–122). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>
- Shan, X., Gong, X., Li, J., Wen, J., Li, Y., & Zhang, Z. (2022). Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(7), 3028–3048. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.025>
- Sharma, S., Ali, A., Ali, J., Sahni, J. K., & Baboota, S. (2013). Rutin: Therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(8), 1063–1079. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.805744>
- Silva, W., Zanatta, M., Ferreira, A. S., Corvo, M. C., & Cabrita, E. J. (2020). Revisiting ionic liquid structure-property relationship: A critical analysis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 20, pp. 1–37). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21207745>
- Sintra, T. E., Abranches, D. O., Benfica, J., Soares, B. P., Ventura, S. P. M., & Coutinho, J. A. P. (2021). Cholinium-based ionic liquids as bioinspired hydrotropes to tackle solubility challenges in drug formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 164, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.04.013>
- Skinceuticals - C E Ferulic*. (2023, January 22). <https://www.Skinceuticals.Pt/Antioxidante/C-E-Ferulic/P380.AspX>.
- Soares, T. B., Loureiro, L., Carvalho, A., Oliveira, M. E. C. D. R., Dias, A., Sarmiento, B., & Lúcio, M. (2018). Lipid nanocarriers loaded with natural compounds: Potential new therapies for age related neurodegenerative diseases? In *Progress in Neurobiology* (Vol. 168, pp. 21–41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.004>
- Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C. F. R., & McPhee, D. J. (2017). Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance,

- challenges and future perspectives, a review. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Veras, K. S., Fachel, F. N. S., de Araújo, B. V., Teixeira, H. F., & Koester, L. S. (2022). Oral Pharmacokinetics of Hydroxycinnamic Acids: An Updated Review. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122663>
- Viciosa, M. T., Santos, G., Costa, A., Danède, F., Branco, L. C., Jordão, N., Correia, N. T., & Dionísio, M. (2015). Dipolar motions and ionic conduction in an ibuprofen derived ionic liquid. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(37), 24108–24120. <https://doi.org/10.1039/c5cp03715h>
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds. In *Bioactive Compounds* (pp. 33–50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- Welton, T. (2018). Ionic liquids: a brief history. In *Biophysical Reviews* (Vol. 10, Issue 3, pp. 691–706). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0419-2>
- Wu, X., Dai, X., Liao, Y., Sheng, M., & Shi, X. (n.d.). *Investigation on drug entrapment location in liposomes and transfersomes based on molecular dynamics simulation*. <https://doi.org/10.1007/s00894-021-04722-3/Published>
- Wu, X., Zhu, Q., Chen, Z., Wu, W., Lu, Y., & Qi, J. (2021). Ionic liquids as a useful tool for tailoring active pharmaceutical ingredients. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 338, pp. 268–283). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.032>
- Xu, A., Chen, L., Xu, X., Xiao, Z., Liu, R., Gao, R., Yuan, M., & Zhang, L. (2018). Recyclable choline nicotinate and ferulate aqueous solutions as efficient lignin solvents. *Polymers*, 10(8), 1–10. <https://doi.org/10.3390/polym10080840>
- Yan, N., Tang, Z., Xu, Y., Li, X., & Wang, Q. (2020). Pharmacokinetic Study of Ferulic Acid Following Transdermal or Intragastric Administration in Rats. *AAPS PharmSciTech*, 21(5). <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01709-w>

Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., & Rotsztein, H. (2018). Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6), 332–336. <https://doi.org/10.1159/000491755>

Anexos

Anexo I - Produção científica

A. Comunicação em painel

- Júlio, A., Reis, A., **Martins, I.**, Pereira-Leite, C., Almeida, T. S. (2022) *Impact of the loaded phytochemical on TransfersomILs Performance*. InnovDelivery'22 – I Lusophone Meeting on Innovative Delivery Systems. 30 de junho 2022, Lisboa, Portugal (virtual).

B. Resumos internacionais com revisão

- Júlio, A., Reis, A., **Martins, I.**, Pereira-Leite, C., Almeida, T. S. (2022) Impact of the loaded phytochemical on TransfersomILs Performance. Abstract Book – InnovDelivery'22 – I Lusophone Meeting on Innovative Delivery Systems. *Biomed Biopharm Res*, 19(2): S51, doi: 10.19277/bbr.19.2.289