

Ionic liquids as tools to improve gel formulations containing sparingly soluble phenolic acids

Líquidos iónicos como ferramentas para melhorar formulações gel contendo ácidos fenólicos pouco solúveis

Ana Júlio ^{1,2*}, Nádia Remtula ³, Marisa Nicolai ¹, Tânia Santos de Almeida ^{1,4*}

¹CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Department of Biomedical Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain; ³School of Sciences and Health Technologies, Lusófona University, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ⁴Centro de Química Estrutural, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

*corresponding authors / autoras para correspondência: ana.julio@ulusofona.pt; tania.almeida@ulusofona.pt

Abstract

Hydroxycinnamic acids, namely caffeic and *p*-coumaric acids, have several pharmaceutical and cosmetic applications, but due to their low aqueous solubility, their applicability can be limited. Ionic liquids (ILs) have been shown to be a valuable tool to improve the solubility and assist in the incorporation of various phenolic compounds into delivery systems. Thus, this work aims to evaluate the impact of incorporating three choline-based ILs, namely (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-phenylalanine [Cho][Phe], (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-glutamate [Cho][Glu] and (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-glycinate [Cho][Gly], into an aqueous gel formulation containing the poorly soluble caffeic and *p*-coumaric acids. The results obtained confirm that the ILs not only increase the drug solubility, but also allow higher amounts of both studied drugs to be incorporated into the gels, without interfering with the stability of the aqueous gels. Moreover, the ILs altered the fluidity of the gels, both in the absence and presence of both phenolic acids, as they increase the viscosity of the formulations, contributing to higher flow resistance of the gel, which may be better accepted by the consumer.

Keywords: Ionic liquids; Hydroxycinnamic acids; Poorly soluble drugs; Gels; Increased Viscosity

Resumo

Os ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente os ácidos cafeico e *p*-cumárico, têm várias aplicações farmacêuticas e cosméticas, mas devido à sua baixa solubilidade em água, a sua aplicabilidade pode ser limitada. Os líquidos iónicos (LI) têm demonstrado ser uma ferramenta valiosa para melhorar a solubilidade e auxiliar na incorporação de vários compostos fenólicos, em sistemas de veiculação. Assim, este trabalho visa avaliar o impacto da incorporação de três LI à base de colina, nomeadamente o (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-fenilalaninato [Cho][Phe], o (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-glutamato [Cho][Glu] e (2-hidroxietil)-trimetilamónio-glicinato [Cho][Gly], numa formulação gel aquosa contendo os ativos pouco solúveis, ácidos cafeico e *p*-cumárico. Os resultados obtidos permitiram concluir que os LI não só aumentam a solubilidade do ativo, como também permitem incorporar maiores quantidades de ambos dos princípios ativos estudados nos géis, sem interferir na estabilidade dos géis aquosos. Adicionalmente, os LI também alteraram a fluidez dos géis, tanto na ausência como na presença dos ácidos fenólicos, uma vez que aumentaram a viscosidade das formulações, contribuindo para um gel com maior resistência ao fluxo, podendo por isso ser mais bem aceite pelo consumidor.

Palavras-chave: Líquidos iónicos; Ácidos hidroxicinâmicos; Fármacos de baixa solubilidade; Géis; Aumento da viscosidade

Introduction

The phenolic compounds with one carboxylic acid group are one of the main classes of natural compounds extracted from plants, present in several seeds, fruits skin and vegetables leaves (1,2). These phenolic acids, also known as phenolcarboxylic acids, are subdivided in two groups: hydroxybenzoic (with seven carbon atoms) and hydroxycinnamic (with nine carbon atoms) acids (1-5).

The hydroxycinnamic acids are the most studied class of the phenolic acids (2) and the most common compounds within this class are ferulic, caffeic, *p*-coumaric and sinapinic acids (1,3,6). These acids have a wide distribution on natural resources, such as in fruits (apples, blueberries, oranges and pineapples), vegetables (lettuce, potatoes and spinach) and other herbs (marjoram, oregano and rosemary) (1,4-6).

Presently, due to consumers' demands and environmental limitations, the pharmaceutical and cosmetic industries have searched for environmentally friendly resources as a source of drugs (1,6-8), such as the example of the hydroxycinnamic acids. This is one of the reasons for the growing number of works including these compounds. Several studies described the pharmaceutical and cosmetic activities of these molecules, such as antioxidant (5,9-11), anti-inflammatory (12), neuroprotective (13), anticancer (3,14,15), antilipidemic and antidiabetic (4,10). However, they present some limitations, due to their low solubility and bioavailability, which difficult their applicability (1,14,16-18).

In this context, ionic liquids (ILs) have been studied by our group as drug solubility promoters (14,17-20), namely with phenolic compounds (14,17,18). So, ILs can be used to improve drug loading of hydroxycinnamic acids into delivery systems. ILs are organic salts, that have melting points below 100 °C and some of them are liquids at room temperature (21-25).

In the pharmaceutical and cosmetic fields, they have been used with several goals, such as solvents and catalysts of active pharmaceutical excipients (26-29), as oil or water substitutes (26), as surfactants and viscosifiers in emulsions and microemulsions (14,17,30,31), as solubility enhancers (14,17-20,32) and integrated with nanoparticles (17,21,23,28,31). They act as a multifunctional tool since they may be tailored to achieve the most suitable properties, according with a desired applicability (14,24,28,33). And also, they present some properties that can be

Introdução

Os compostos fenólicos contendo um grupo ácido carboxílico são denominados ácidos fenólicos ou fenolcarboxílicos, que são uma das principais classes de compostos naturais extraídos de plantas, pois estão presentes em diversas sementes, casca de frutas e folhas (1,2). Estes ácidos fenólicos subdividem-se em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos (com sete átomos de carbono) e ácidos hidroxicinâmicos (com nove átomos de carbono) (1-5).

Os ácidos hidroxicinâmicos são a classe mais estudada dos ácidos fenólicos (2) e os compostos mais comuns dentro desta classe são os ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumárico e sinápinico (1,3,6). Estes ácidos têm uma ampla distribuição na natureza, como em frutas (maçãs, mirtilos, laranjas e abacaxis), vegetais (alface, batata e espinafre) e ervas aromáticas (manjerona, orégão e alecrim) (1,4-6).

Atualmente, devido às exigências dos consumidores e às limitações ambientais, as indústrias farmacêutica e cosmética têm procurado recursos ecológicos como fonte de princípios ativos (1,6-8), como é o caso dos ácidos hidroxicinâmicos. Esta é uma das razões para o crescente número de publicações que incluem estes compostos. Vários estudos descrevem as atividades farmacêuticas e cosméticas dessas moléculas, como antioxidante (5,9-11), anti-inflamatória (12), neuroprotetora (13), anticancerígena (3,14,15), antilipidêmica e antidiabética (4,10). No entanto, apresentam algumas limitações, devido à sua baixa solubilidade e biodisponibilidade, o que limita a sua aplicabilidade (1,14,16-18).

Neste contexto, os líquidos iônicos (LI) também têm sido estudados pelo nosso grupo como promotores de solubilidade de princípios ativos (14,17-20), nomeadamente de compostos fenólicos (14,17,18). Assim, os LI podem ser usados para melhorar a incorporação de ácidos hidroxicinâmicos em sistemas de veiculação. Os LI são sais orgânicos, que possuem pontos de fusão inferiores a 100 °C e, alguns deles, são líquidos à temperatura ambiente (21-25).

Nas áreas farmacêutica e cosmética, têm sido utilizados com diversos objetivos, tais como solventes e catalisadores de excipientes farmacêuticos ativos (26-29), como substitutos de fases oleosas ou aquosas (26), como surfactantes e viscosificantes em emulsões e microemulsões (14,17,30,31), como promotores de solubilidade (14,17-20,32) e integrados em nanopartículas (17,21,23,28,31). Eles atuam como

useful, for example high thermal and chemical stability, re-usability and nonflammability (22,23,28). However, it is also important to consider the toxicity of ILs. For instance, it has been shown, that choline-amino acid ILs are amongst the least toxic ILs (22) and may be more suited to be included in delivery systems. Nonetheless, several studies, performed in different cell lines, have shown that the toxicity of this class of ILs is concentration-dependent (14,18,22) and this should be considered when studying their applicability.

Concerning the hydroxycinnamic acids their topical applicability may be relevant due to some of their properties, already described, such as their antioxidant activity (2,4,7). Regarding this, emulsions and gels are quite suitable as topical delivery systems (7,19). In terms of emulsions, our group already showed the utility of using ILs containing amino acids to enhance the solubility of the hydroxycinnamic acids and they allowed a higher incorporation of these compounds in oil-in-water emulsions (14). Besides that, that study also proved that ILs can be useful to improve the stability and alter the viscosity of the developed topical delivery systems (14). Since emulsions are thermodynamically unstable formulations (7,19), in some cases, gels may be a suitable alternative, justifying their development in the presence of ILs.

Gels can be classified according to the nature of the solid phase, as colloidal, molecular, and polymeric (34,35). They may also be classified according to the liquid phase, as hydrogels (water), organogels (an organic solvent), polymer liquid gels, oleogels (oil) and ionic liquid gels (liquid phase constituted only by ILs). The combination of gels with ILs has led to improved functional materials that have been used in different areas, such as electronics, green chemistry, cosmetics and pharmaceutical,(34,35) showing the potential of this combination.

In the pharmaceutical and cosmetic fields, topical gels are widely used and these semisolid formulations, are formed by the dispersion of small or large molecules in an aqueous liquid vehicle that is jellified with the gelling agent addition (36). These vehicles may have aqueous, hydroalcoholic, alcohol or non-aqueous mean (36,37). Carbopol® is a gelling agent used as a thickener (38), emulsifier (39) and stabilizer (40) in topical formulations such as gels. In a preliminary study, we showed that ILs improved the incorporation of caffeine into Carbopol® gel formulations (19). Herein we assessed if ILs could also improve the incorporation of phenolic acids into this type of topical formulation. Nonetheless, although gels are more stable than

ferramenta multifuncional, uma vez que podem ser adaptados para alcançar as propriedades mais adequadas, de acordo com uma aplicabilidade desejada (14,24,28,33). Além disso, apresentam algumas propriedades que podem ser úteis, como por exemplo, a sua alta estabilidade térmica e química, a possibilidade de reutilização e a não inflamabilidade (22,23,28). No entanto, também é importante considerar a toxicidade dos LI. Por exemplo, foi demonstrado que os LI de colina estão entre os LI menos tóxicos (22) e podem ser os mais adequados para serem incluídos em sistemas de veiculação. Contudo, vários estudos realizados em diferentes linhas celulares, mostraram que a toxicidade dessa classe de LI é dependente da concentração dos mesmos (14,18,22) e isso deve ser considerado ao estudar sua aplicabilidade.

Em relação aos ácidos hidroxicinâmicos, a sua aplicação tópica pode ser relevante devido a algumas das suas propriedades já descritas, como a atividade antioxidante (2,4,7). A esse respeito, emulsões e géis são bastante adequados como sistemas de veiculação tópicos (7,19). Relativamente às emulsões, o nosso grupo já mostrou a utilidade do uso de LI contendo aminoácidos para aumentar a solubilidade dos ácidos hidroxicinâmicos, permitindo uma maior incorporação desses compostos em emulsões óleo-em-água (14). Além disso, esse estudo também provou que os LI podem ser úteis para melhorar a estabilidade e alterar a viscosidade dos sistemas de veiculação tópica desenvolvidos (14). Como as emulsões são formulações termodinamicamente instáveis (7,19), em alguns casos, os géis podem ser uma alternativa adequada, justificando o seu desenvolvimento na presença de LI.

Os géis podem ser classificados de acordo com a natureza da fase sólida, como coloidais, moleculares e poliméricos (34,35). Também podem ser classificados de acordo com a fase líquida, como hidrogéis (água), organogéis (solvente orgânico), géis líquidos poliméricos, oleogéis (óleo) e géis líquidos iônicos (fase líquida constituída apenas por LI). A combinação de géis com LI originou materiais funcionais melhorados que têm sido utilizados em diversas áreas, como eletrônica, química “verde”, cosmética e farmacêutica, (34),(35) mostrando o potencial desta combinação.

Na área farmacêutica e cosmética, os géis tópicos são amplamente utilizados e essas formulações semissólidas são formadas pela dispersão de moléculas pequenas ou grandes num veículo líquido aquoso que é gelificado com a adição do agente gelificante (36). Esses veículos podem ter meio aquoso, hidroalcoólico, alcoólico ou não-aquoso (36,37). O Carbopol® é um agente

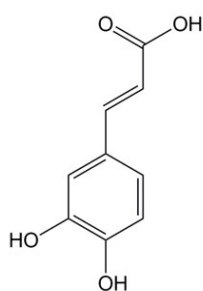
emulsions, they may still have some stability problems, such as separation between the solids and the liquids components within the formulation and biological growth, especially gels containing water (19,41,42). Consequently, ILs may also be a valuable strategy to improve these formulations.

With all of this in mind, the goal of this work was to evaluate the performance of aqueous gels containing caffeic or *p*-coumaric acids (Figure 1A), in the presence and absence of three different choline-based ILs (Figure 1B). The impact of the ILs on the developed formulations and on the drug incorporation into those gels, was evaluated.

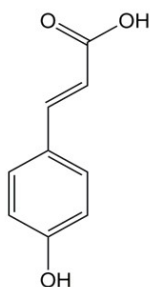
gelificante utilizado como espessante (38), emulsificante (39) e estabilizador (40) em formulações tópicas como géis. Num estudo preliminar, mostrámos que os LI melhoram a incorporação de cafeína em formulações de gel Carbopol® (19). No presente estudo, avaliámos se os LI também podem melhorar a incorporação de ácidos fenólicos neste tipo de formulação tópica. No entanto, embora os géis sejam mais estáveis que as emulsões, eles podem ainda apresentar alguns problemas de estabilidade, como a separação entre os componentes sólidos e líquidos, dentro da formulação e crescimento biológico, especialmente géis contendo água (19,41,42). Consequentemente, os LI também podem ser uma estratégia valiosa para melhorar essas formulações.

Tendo tudo isso em linha de conta, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de géis aquosos contendo ácidos cafeico ou *p*-cumárico (Figura 1A), na presença e ausência de três LI à base de colina diferentes (Figura 1B). Foi avaliado o impacto dos LI nas formulações desenvolvidas e na incorporação dos ativos nesses géis.

A) Drugs / Fármacos



Caffeic Acid / Ácido Cafeico



p-Coumaric Acid / Ácido *p*-Cumárico

B) Ionic liquids / Líquidos iónicos

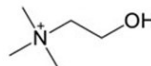
Ionic liquid /
Líquido Iónico

[Cho][Phe]

[Cho][Glu]

[Cho][Gly]

Cation /
Catião



Anion /
Anião

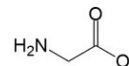
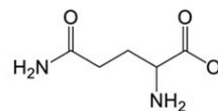
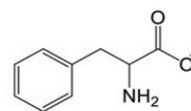


Figure 1 - Chemical structures of the drugs (A) and the ionic liquids (B) studied.

Figura 1 - Estrutura química dos fármacos (A) e dos líquidos iónicos (B) em estudo.

Materials and Methods

Materials and Reagents

Three choline based-ILs were used: (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-phenylalaninate [Cho][Phe], the (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-glutamate [Cho][Glu] and the (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-glycinate [Cho][Gly]. All ILs had been prepared within the context of other studies recently developed by our group (14,18).

The drugs chosen were two hydroxycinnamic acids, caffeic acid (CA) and *p*-coumaric acid (*p*-CA), (both Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The gel formulation also included Carbopol® 940 and triethanolamine (both José Vaz Pereira, Benavente, Portugal), propylene glycol (Fragron, Barcelona, Spain) and the paraben concentrate, which was prepared according to the Farmacopeia Portuguesa VIII using methylparaben and propylparaben (both Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Synthesis of the Choline-based ILs

As mentioned above, the synthesis and all characterization of the studied ILs was performed within the scope of other studies conducted by our group (14,18). Briefly, each amino acid, 57.79 mmol, was solubilized in water and this solution was added to 57.76 mmol choline hydroxide, after evaporation. The resulting blend was stirred overnight. The solvent was then evaporated, followed by the addition of an acetonitrile:methanol (9:1). The obtained mixture was centrifuged, for 30 minutes at 1500 rpm, filtered, and then evaporated to remove the solvents. All the ILs were stored under moisture-free conditions and evaporated again before use.

Solubility Studies

Solubility studies were performed as previously described (14,18). Briefly, saturated solutions of each drug in water and water:IL mixtures (99.8:0.2% w/w) were prepared. The IL concentration used (0.2 %, v/v) allows the maintenance of cell viability of human keratinocytes (HaCaT cells), accordingly to previously published results (14,19). All solutions were prepared in triplicate.

Materiais e Métodos

Materiais e Reagentes

Foram utilizados três LI à base de colina: o (2-hidroxietil)-trimetilamônio-L-fenilalaninato [Cho][Phe], o (2-hidroxietil)-trimetilamônio-L-glutamato [Cho][Glu] e o (2-hidroxietil)-trimetilamônio-glutinato [Cho][Gly]. Todos os LI foram preparados no contexto de outros estudos recentemente desenvolvidos pelo nosso grupo (14,18) e foram também utilizados neste estudo.

Os fármacos escolhidos foram dois ácidos hidroxicinâmicos, ácido cafeico (CA) e ácido *p*-cumárico (*p*-CA), ambos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Adicionalmente, foi utilizado para a formulação gel Carbopol® 940 e trietanolamina, ambos adquiridos à José Vaz Pereira (Benavente, Portugal), o propilenoglicol da Fragon (Barcelona, Espanha), e o concentrado de parabenos, que foi preparado de acordo com a Farmacopeia Portuguesa VIII com metilparabeno e propilparabeno ambos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Síntese dos ILs à base de colina

Conforme mencionado acima, a síntese e toda a caracterização dos LI estudados foi realizada no âmbito de outros estudos realizados por nosso grupo (14,18). Sucintamente, cada aminoácido, 57,79 mmol, foi solubilizado em água e esta solução foi adicionada a 57,76 mmol de hidróxido de colina, após evaporação. Depois disso, a mistura resultante foi agitada durante a noite e o solvente foi evaporado, seguido pela adição de acetonitrilo:metanol (9:1). A mistura obtida foi centrifugada, por 30 minutos a 1500 rpm, filtrada e depois evaporada para remover os solventes. Todos os LI foram armazenados em condições livres de humidade e, antes de usar é novamente evaporado.

Estudos de Solubilidade

Os estudos de solubilidade foram realizados conforme descrito anteriormente na literatura (14,18). Resumidamente, foram preparadas soluções saturadas de cada ativo em água e misturas de água:LI (99,8:0,2 % m/m). Os LI utilizados foram incorporados usando uma concentração igual para todos (0,2 % v/v), que permite a manutenção da viabilidade celular de queratinócitos humanos (células HaCaT), de acordo com resultados previamente publicados (14,19). Todas as soluções foram preparadas em triplicado.

Table 1 - Qualitative and quantitative composition of the gels, % (w/w), with and without IL, [Cho][Phe], [Cho][Glu] or [Cho][Gly], and in the presence and absence of caffeic or *p*-coumaric acids.**Tabela 1** - Composição qualitativa e quantitativa dos géis, % (m/m), com e sem LI, [Cho][Phe], [Cho][Glu] ou [Cho][Gly], e na presença e ausência de ácido cafeico ou *p*-cumárico.

Components/ Componentes	Without drug and without IL / Sem ativo e sem LI	With drug and without IL / Com ativo e sem LI	With IL without Drug / Com LI e sem ativo	With drug and with IL / Com ativo e com LI
Carbopol® 940	0.5	0.5	0.5	0.5
Propylene glycol / Propilenoglicol	5.0	5.0	5.0	5.0
Paraben concentrate / Concentrado de parabenos	1.0	1.0	1.0	1.0
IL/LI	-	-	0.2	0.2
Drug / Fármaco	-	Maximum solubility ¹ / Máxima solubilidade ¹	-	Maximum solubility ¹ / Máxima solubilidade ¹
Triethanolamine/ Trietanolamina		q.s. / q.b.p. pH = 5		
Distilled water / Água destilada		q.s. / q.b.p. 100		

¹According to the results obtained in the solubility studies. / ¹De acordo com os resultados obtidos nos estudos de solubilidade.

These solutions then were mixed on a horizontal shaker (IKA VIBRAX VXR®, LTF Labortechnik GmbH & Co., Bodensee, Germany) for a period of 72 h at 25±2 °C. The solutions were then filtered. Finally, the samples were analyzed using a UV-visible spectrophotometer (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, England), at the maximum absorption wavelength in water (286 nm for *p*-coumaric acid and 313 nm for caffeic acid).

Development of the aqueous gel formulation

The aqueous gel formulations were individually prepared (19) in the presence and absence of each studied IL ([Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly]) and with and without each drug (caffeic or *p*-coumaric acids) (Table 1). All raw materials were previously weighed. The distilled water and the IL were placed in a beaker. The drug was then dissolved under stirring. After the drug was completely dissolved, the paraben concentrate, and propylene glycol were added. Finally, Carbopol® 940 was added under vigorous agitation and in shower mode until a homogeneous formulation was reached. After each formulation was prepared, the pH was adjusted with triethanolamine to pH 5 (19).

Em seguida, as soluções foram homogeneizadas num agitador horizontal (IKA VIBRAX VXR®, LTF Labortechnik GmbH & Co., Bodensee, Alemanha) por um período de 72 h a 25±2 °C e foram posteriormente filtradas. Para finalizar, as amostras foram analisadas utilizando um espectrofotômetro UV-visível (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra), as leituras foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção para cada composto em água (286 nm para o ácido *p*-cumárico e 313 nm para o ácido cafeico).

Desenvolvimento da formulação do gel aquoso

As formulações em gel aquoso foram preparadas (19), na presença e ausência de cada LI estudado ([Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly]), com e sem cada princípio ativo, ácido cafeico ou *p*-cumárico, individualmente (Tabela 1). Todas as matérias-primas foram pesadas previamente. A água destilada e o LI foram colocados num copo de precipitação e, em seguida, o princípio ativo foi dissolvido sob agitação. Após a dissolução completa do princípio ativo, o concentrado de parabenos e o propilenoglicol foram adicionados à mistura. Finalmente, sob agitação vigorosa em forma de chuva, foi adicionado Carbopol® 940, até se chegar

The organoleptic properties, pH and viscosity of all formulations were analyzed at time zero and after the preliminary stability studies. For the viscosity, all samples were held at 25 °C, then homogenized using a glass rod for 2 minutes. Viscosity was then measured in a rheometer (DV3T from AMETEK®, Brookfield, Preston, United Kingdom) using a S19 probe. The pH was evaluated with a pH meter (Metrohm® 827, Herisau, Switzerland).

Preliminary stability studies of the produced formulations

All formulations (n=3) were submitted to a gradual heating test and a centrifugation test, according to the protocols described in the literature (14,17,41) to assess stability.

In the gradual heating test, 5.0 g of each gel was placed in a thermostatic bath, from an initial temperature of 40 °C to a final temperature of 80 °C, increasing the temperature 10 °C every 30 minutes. A centrifugation test was also performed, in which 5.0 g of each formulation was heated at 45 °C for 30 min and then centrifuged for 30 min at 7200×g.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, San Diego, MO, USA), using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test of differences in mean values of the results. Values were expressed as mean±standard deviation (SD). Differences between individual means were significant with * $p<0.05$ and *** $p<0.001$.

Results and Discussion

This work aimed to evaluate the impact of the incorporation of three different choline-based ILs, [Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly], on aqueous gels in the absence or presence of poorly soluble caffeic or *p*-coumaric acids. All studies were performed incorporating an equal concentration of each IL to enable comparison. As a topical application is sought, the chosen concentration allows the maintenance of the cell viability on human keratinocytes (HaCaT cells), according to studies previously published by our group (14,19)

a uma formulação homogênea. Após a preparação da formulação, o pH foi ajustado, com trietanolamina, para um valor igual a 5 (19).

As propriedades organolépticas, pH e viscosidade de todas as formulações foram analisadas no tempo zero e após os estudos preliminares de estabilidade. Para viscosidade, todas as amostras foram colocadas a 25 °C, sendo depois homogeneizadas com uma vareta de vidro durante 2 minutos. De seguida, a viscosidade foi medida com um reômetro (DV3T da AMETEK®, Brookfield, Preston, Reino Unido), com a sonda S19. O pH foi avaliado com um potenciômetro pH 827 (Metrohm®, Herisau, Suíça).

Estudos de estabilidade preliminar das formulações produzidas

Todas as formulações (n=3) foram submetidas ao teste de aquecimento gradual e ao teste de centrifugação, de acordo com os protocolos descritos na literatura (14,17,41), para detetar a ocorrência de algum fenómeno de instabilidade.

No teste de aquecimento gradual, foram pesados 5,0 g de cada gel, que posteriormente foram colocados num banho termostatzado, partindo de uma temperatura inicial de 40 °C até uma temperatura final de 80 °C, com um incremento de 10 °C/30 minutos. O teste de centrifugação também foi realizado, no qual 5,0 g de cada formulação foram aquecidos a 45 °C, durante 30 min, e centrifugados durante 30 min a 7200× g.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 5® da GraphPad Software (San Diego, MO, EUA), através da análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey das diferenças nos valores médios dos resultados. Os valores foram expressos como média±desvio padrão (DP). As diferenças entre as médias individuais foram significativas com * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Resultados e Discussão

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da incorporação de três LI diferentes à base de colina, [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly], em géis aquosos na ausência ou na presença dos ácidos cafeico ou *p*-cumárico pouco solúveis. Adicionalmente, para fins de comparação, todos os estudos foram realizados incorporando uma concentração igual de cada LI,

Solubility studies

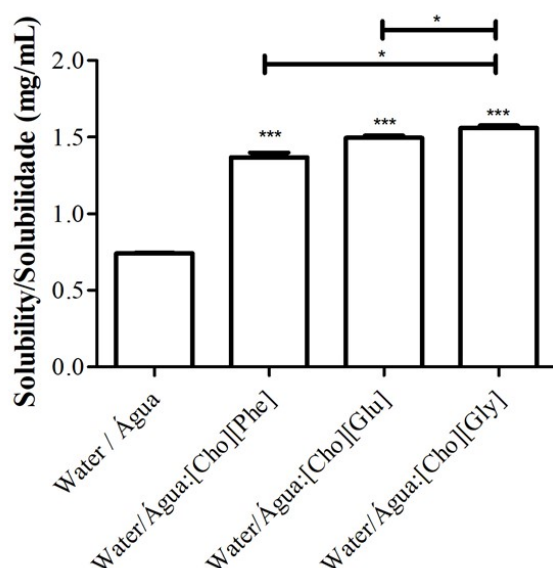
To the best of our knowledge, the solubility of caffeic and *p*-coumaric acids in water:[Cho][Glu] (99.8:0.2 %w/w) is determined herein for the first time. This IL was selected by virtue of recent promising results of its incorporation into lipidic implants (25), allowing an improvement of the developed systems. Within this study we intended to explore its impact on another type of delivery system. The solubility of these phenolic acids in water and in the presence of water:[Cho][Phe] and water:[Cho][Gly] (99.8:0.2% w/w) has been previously studied (14). Nonetheless, all these solubilities were performed here for comparison and to ensure that the solubility of caffeic and *p*-coumaric acids in water:[Cho][Glu] (99.8:0.2 % w/w) was determined under the same experimental conditions.

que permite a manutenção da viabilidade celular em queratinócitos humanos (células HaCaT), uma vez que se pretende uma aplicação tópica, de acordo com estudos previamente publicados pelo nosso grupo (14,19).

Estudos de solubilidade

De acordo com o que sabemos, a solubilidade dos ácidos cafeico e *p*-cumárico na água:[Cho][Glu] (99,8:0,2 %m/m) é aqui determinada pela primeira vez. Este LI foi escolhido, uma vez que recentemente demonstrou resultados promissores quando incorporado em implantes lipídicos (25), ao permitir melhorar os sistemas desenvolvidos e, conseqüentemente, pretendeu-se neste estudo explorar o seu impacto noutro tipo de sistemas de veiculação. As solubilidades destes ácidos fenólicos na água e na presença de água:[Cho][Phe] e de água:[Cho][Gly] (99,8:0,2 %m/m) já foram estudadas (14). No entanto, todas essas solubilidades foram novamente realizadas para comparação e garantindo que a solubilidade dos ácidos cafeico e *p*-cumárico na água:[Cho][Glu] (99,8:0,2 %m/m) seja determinada nas mesmas condições.

Caffeic Acid / Ácido Cafeico



p-Coumaric Acid / Ácido *p*-Cumárico

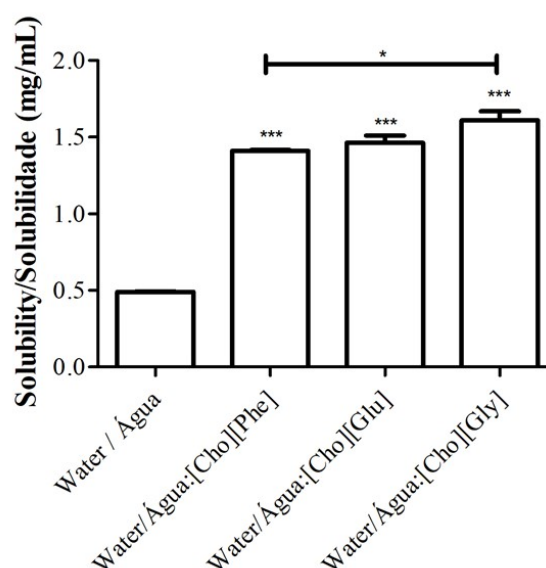


Figure 2 - Solubility of caffeic acid and *p*-coumaric acid in water or water:IL mixtures (99.8:0.2, % w/w) at 25±2 °C. n=3, mean±SD, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ (ANOVA, Tukey's test). The ILs used were [Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly].

Figura 2 - Solubilidade de ácidos cafeico e *p*-cumárico em água ou misturas de água:LI (99,8:0,2, % m/m) a 25±2 °C. n=3, média±DP, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Tukey). Os LI usados foram [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly].

Table 2 - Solubility of caffeic acid and *p*-coumaric acid in water or water:IL mixtures (99.8:0.2, % w/w) at 25±2 °C. n=3, mean±SD. The ILs used were [Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly].

Tabela 2 - Solubilidade de ácidos cafeico e *p*-cumárico em água ou misturas de água:LI (99,8:0,2, % m/m) a 25±2 °C. n=3, média±DP. Os LI usados foram [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly].

Solubility (mg/mL) in / Solubilidade (mg/mL) em	Water / Água	[Cho][Phe]	[Cho][Glu]	[Cho][Gly]
Caffeic acid / Ácido cafeico	0.49 ± 0.01	1.41 ± 0.01	1.46 ± 0.01	1.61 ± 0.04
<i>p</i> -Coumaric acid / Ácido <i>p</i> -cumárico	0.74 ± 0.01	1.37 ± 0.03	1.49 ± 0.01	1.56 ± 0.01

The solubilities of the hydroxycinnamic acids in water at 25 °C were determined to be 0.49±0.01 mg/mL for caffeic acid and 0.74±0.01 mg/mL for *p*-coumaric acid (Figure 2 and Table 2). For caffeic acid, this result is in agreement with a recently published study (0.45±0.04 mg/mL)(14) but slightly lower than the results obtained in a previous work (0.98±0.02 mg/mL) (16), although both studies described a solubility below 1 mg/mL. The results for the solubility of *p*-coumaric acid are in agreement with two studies presented in the literature (both with a solubility of 0.7 mg/mL) (14,43). For the solubility of both phenolic compounds in water: [Cho][Phe] (1.41±0.01 mg/mL for caffeic acid and 1.37±0.03 mg/mL for *p*-coumaric acid) and in water:[Cho][Gly] (1.61±0.04 mg/mL for caffeic acid and 1.56±0.01 mg/mL for *p*-coumaric acid), the current results are also in agreement with the previously published data (1.42±0.08 mg/mL with [Cho][Phe] and 1.39±0.07 mg/mL with [Cho][Gly] for caffeic acid and 1.39±0.02 mg/mL with [Cho][Phe] and 1.54±0.07 mg/mL with [Cho][Gly] for *p*-coumaric acid)(14) (Table 2).

Concerning to the solubility of the phenolic compounds in water: [Cho][Glu] mixture (1.46±0.01 mg/mL for caffeic acid and 1.49±0.01 mg/mL for *p*-coumaric acid) proved to be quite similar to those obtained for the other choline-based ILs (Figure 2 and Table 2).

The solubility results, in the presence of the ILs, are all statistical different from the solubility results obtained for the phenolic acids in water alone (Figure 2 and Table 2).

Os resultados obtidos para a solubilidade dos ácidos hidroxycinnâmicos na água, a 25 °C, foram 0,49±0,01 mg/mL para o ácido cafeico e 0,74±0,01 mg/mL para o ácido *p*-cumárico (Figura 2 e Tabela 2). Para o ácido cafeico, os resultados estão de acordo com um estudo publicado recentemente (0,45±0,04 mg/mL) (14), mas um pouco inferior aos resultados obtidos num trabalho anterior (0,98±0,02 mg/mL) (16), embora ambos os estudos descreveram uma solubilidade abaixo de 1 mg/mL. Os resultados para a solubilidade do ácido *p*-cumárico estão de acordo com dois estudos apresentados na literatura (ambos com solubilidade de 0,7 mg/mL) (14,43). Para a solubilidade dos dois compostos fenólicos em água: [Cho][Phe] (1,41±0,01 mg/mL para o ácido cafeico e 1,37±0,03 mg/mL para o ácido *p*-cumárico) e em água: [Cho][Gly] (1,61±0,04 mg/mL para o ácido cafeico e 1,56±0,01 mg/mL para o ácido *p*-cumárico), os resultados atuais também estão consonantes com os dados anteriormente publicados (1,42±0,08 mg/mL com [Cho][Phe] e 1,39±0,07 mg/mL com [Cho][Gly] para o ácido cafeico e 1,39±0,02 mg/mL com [Cho][Phe] e 1,54±0,07 mg/mL com [Cho][Gly] para o ácido *p*-cumárico)(14) (Tabela 2).

Quanto às solubilidades dos compostos fenólicos na mistura água:[Cho][Glu] (1,46±0,01 mg/mL para o ácido cafeico e 1,49±0,01 mg/mL para o ácido *p*-cumárico), provou serem bastante semelhantes aos obtidos para outros LI à base de colina (Figura 2 e Tabela 2).

Os resultados da solubilidade, na presença dos LI, são todos estatisticamente diferentes dos resultados da solubilidade de cada ácido fenólico obtido apenas em água (Figura 2 e Tabela 2).

This work, therefore, allowed us to conclude that [Cho][Glu] also improves the drug solubility of caffeic and *p*-coumaric acids and reinforces the fact that choline-based ILs may be useful as solubility promoters of sparingly soluble phenolic acids.

Following these results and considering that both drugs may have potential for a topical application (3,7,14), aqueous gel formulations were developed, in the presence and absence of each IL and/or each phenolic compound studied herein, to assess if whether these salts would have an impact on the developed formulations.

Development of gel formulations

For the preparation of the gel formulations, firstly the control gel was first prepared, containing no drug or IL. Subsequently, the drugs were incorporated into the gels individually, in the presence or absence of each IL. Each drug was incorporated in the formulations at the maximum (water) soluble concentration or in the corresponding water:IL mixture (99.8:0.2 % w/w), according to the results obtained in the solubility studies. Hence, several formulations were prepared, as described in Table 1, namely: a control gel, without IL or drug; gels containing each drug but without IL; gels incorporating each IL but without drug; and finally, the gels containing each IL and each drug.

Preliminary stability studies were carried out to assess if the prepared gels were stable and if the incorporation of ILs into the formulations would impact their stability. Thus, all the formulations were subjected to extreme conditions, through the gradual heating test and the centrifugation test. All gels were thermally and physically stable, indicating that the incorporation of ILs does not interfere with the stability of the aqueous gels. Moreover, the pH of all formulations was unaltered after the preliminary stability studies.

The organoleptic properties of the gels were observed macroscopically (Figure 3). All gel formulations are colourless and translucent (Figure 3).

In terms of consistency, the formulations without IL (the control gel, A_0 , and the gels containing each drug but without IL, A_{CA} and A_{p-CA}), presented a higher fluidity (Figure 3 A_0 , A_{CA} and A_{p-CA}).

On the other hand, the gels containing IL, either in the absence (B_0 , C_0 and D_0) or in the presence of each drug (B_{CA} , C_{CA} , D_{CA} , B_{p-CA} , C_{p-CA} and D_{p-CA}) presented a less fluid and more pleasant appearance for a gel formulation (Figure 3 B_0 , C_0 and D_0). Thus, our results seem to indicate that the presence of the

Assim, este trabalho permitiu concluir que [Cho][Glu] melhora a solubilidade dos princípios ativos, ácidos cafeico e *p*-cumárico, e reforçar o fato de que os LI à base de colina podem ser úteis como promotores de solubilidade dos ácidos fenólicos pouco solúveis em água.

De acordo com esses resultados e considerando que ambos os fármacos podem ter potencial para uma aplicação tópica (3,7,14), foram desenvolvidas formulações em gel aquoso, na presença e ausência de cada LI e/ou cada composto fenólico aqui estudado, para avaliar se esses sais têm impacto sobre as formulações desenvolvidas.

Desenvolvimento de formulações de géis

Para a preparação das formulações do gel, primeiro foi preparado o gel controlo, que não contém princípio ativo ou LI. Seguidamente, os fármacos foram incorporados nos géis individualmente e na presença ou ausência de cada LI. Cada princípio ativo foi incorporado nas formulações na sua concentração máxima de solubilidade em água ou na mistura correspondente de água:LI (99,8:0,2 %m/m), de acordo com os resultados obtidos nos estudos de solubilidade. Assim, várias formulações foram preparadas, conforme descrito na Tabela 1, a saber: um gel controlo, sem LI, nem princípio ativo; géis contendo cada princípio ativo, mas sem LI; géis incorporando cada LI, mas sem princípio ativo; e, finalmente, os géis contendo cada LI e cada princípio ativo.

Após a preparação, foram realizados estudos preliminares de estabilidade para avaliar se os géis preparados eram estáveis e se a incorporação do LI nas formulações afetaria sua estabilidade. Assim, todas as formulações foram submetidas a condições extremas, através do teste de aquecimento gradual e do teste de centrifugação, tendo todos os géis demonstrado serem estáveis térmica e fisicamente. Isso mostrou que a incorporação de LI não interfere na estabilidade dos géis aquosos. Além disso, os pH de todas as formulações não se alteraram depois dos ensaios de estabilidade preliminar.

As propriedades organoléticas dos géis foram observadas macroscopicamente (Figura 3). Todas as formulações de gel são incolores e translúcidas (Figura 3).

Em termos de consistência, as formulações sem LI (o gel de controlo, A_0 , e os géis contendo cada princípio ativo, mas sem LI, A_{CA} e A_{p-CA}), apresentavam uma fluidez muito elevada (Figura 3 A_0 , A_{CA} e A_{p-CA}).

ILs may increase the viscosity of the prepared gels, either in the presence or in the absence of the studied drugs. This may be important, since a higher viscosity may contribute to a smaller flow velocity of the semi-solid or liquid formulations, due to the increase in the flow resistance (44,45). A less fluid gel may be more appealing to the consumer, since it is more practical to apply and may be more effective, due to longer skin contact time (36,37,44).

Consequently, the gel viscosities were then evaluated, and the results obtained confirmed the macroscopical observations (Figure 3), showing that the presence of the ILs led to a considerably increase in the viscosity of the formulations. Moreover, the control formulation - without drug and without IL - presented a viscosity similar to the formulations containing drug, but without

Por outro lado, os géis contendo LI, seja na ausência (B_0 , C_0 e D_0) ou na presença de cada princípio ativo (B_{CA} , C_{CA} , D_{CA} , B_{p-CA} , C_{p-CA} e D_{p-CA}) apresentaram um aspeto menos fluido e mais agradável para uma formulação de gel (Figura 3 B_0 , C_0 e D_0). Assim, os nossos resultados parecem indicar que a presença dos LI podem aumentar a viscosidade dos géis preparados, seja na presença ou na ausência dos fármacos estudados. Isso pode ser importante, já que uma viscosidade maior pode contribuir para uma menor taxa de fluxo das formulações semissólidas ou líquidas, devido ao aumento da resistência ao fluxo (42,43). Um gel menos fluido pode ser mais atraente para o consumidor, pois é mais prático de aplicar e pode ser mais eficaz, devido ao maior tempo de contato com a pele (39,40,42).

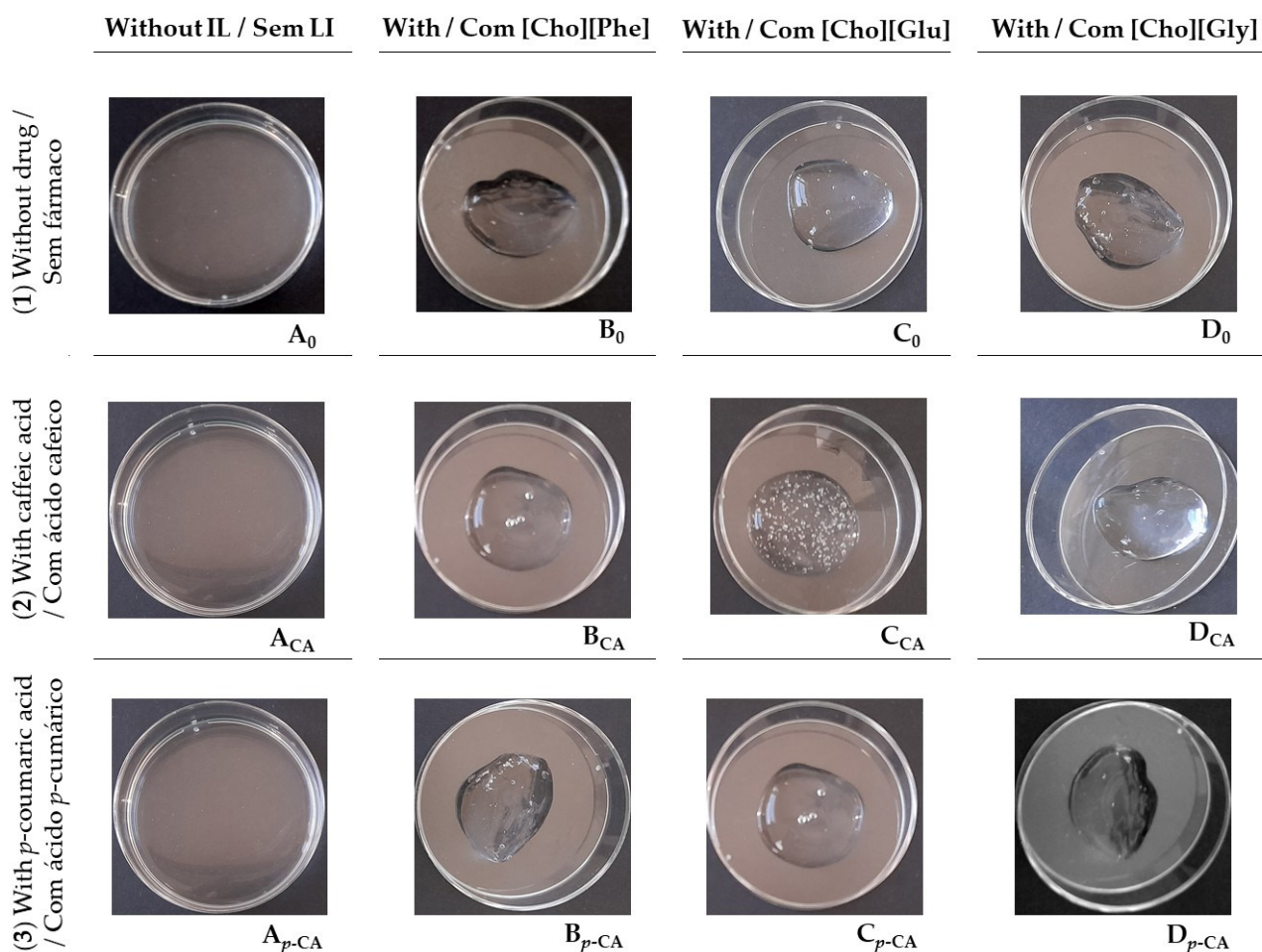


Figure 3 - Macroscopic appearance of all the prepared gels: without drug and without IL – A_0 ; with each drug (caffeic or *p*-coumaric acid) and without IL – A_{CA} and A_{p-CA} ; without drug and with each IL ([Cho][Phe], [Cho][Glu] or [Cho][Gly]) – B_0 , C_0 , D_0 ; with each drug and each IL – B_{CA} , B_{p-CA} , C_{CA} , C_{p-CA} , D_{CA} and D_{p-CA} .

Figura 3 - Aparência macroscópica de todos os géis preparados: sem fármaco e sem LI – A_0 ; com cada ativo (ácido cafeico ou *p*-cumárico) e sem LI – A_{CA} and A_{p-CA} ; sem ativo e com cada LI ([Cho][Phe], [Cho][Glu] ou [Cho][Gly]) – B_0 , C_0 , D_0 ; com cada ativo e cada LI – B_{CA} , B_{p-CA} , C_{CA} , C_{p-CA} , D_{CA} and D_{p-CA} .

Table 3 - Measured viscosity of the gels prepared in the presence and absence of each drug (caffeic or *p*-coumaric acids) and/or with and without the choline-based ILs ([Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly]) at 0.2 % (v/v).

Tabela 3 - As viscosidades medidas nos geles preparados na presença e ausência de cada fármaco (ácidos cafeico e *p*-cumárico) e com, ou sem, os LI derivados de colina ([Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly]) a 0,2 % (v/v).

Viscosity / Viscosidade (mPas)	Without IL / Sem LI	With/Com [Cho][Phe]	With/Com [Cho][Glu]	With/Com [Cho][Gly]
Without drug / Sem fármaco	1700 ± 40	14320 ± 50	14560 ± 50	15200 ± 45
With Caffeic acid / Com Ácido cafeico	1650 ± 50	12100 ± 50	13210 ± 35	14000 ± 25
With <i>p</i> -coumaric acid / Com Ácido <i>p</i> -cumárico	1600 ± 25	13200 ± 50	13350 ± 50	14500 ± 50

IL (without statistical difference). On the other hand, the formulations containing ILs presented a considerably higher viscosity when compared to the formulations without IL (Table 3), indicating the viscosity of the developed formulations is affected by presence of the ILs rather than the presence of each active. Moreover, recently our group showed that ILs can stabilize oil-in-water emulsions by increasing their viscosity (14), which is in accordance with what was observed in this study with the gel formulations. Thus, this present study not only reveals that choline-based ILs increase the viscosity of gel formulations, but reinforces that these materials may be an innovative choice to alter the fluidity and stability properties of different topical formulations.

Finally, as the studied drugs were incorporated at the maximum concentration that they are soluble in water or in each water:IL mixture (99.8:0.2 %w/w), it is also important to note that the ILs not only contributed for a lower fluidity, but also improved the drug loading compared to the aqueous gels prepared in the absence of the ILs. This is due to the higher drug solubility in the presence of the ILs.

Consequentemente, as viscosidades dos géis foram então avaliadas e os resultados obtidos reforçaram o que foi observado macroscopicamente (Figura 3), mostrando que a presença dos IL promoveu um aumento considerável na viscosidade das formulações. Além disso, a formulação de controlo - sem princípio ativo e sem LI - apresentou viscosidade semelhante às formulações contendo o princípio ativo, mas sem LI (sem diferenças estatísticas entre elas). Por outro lado, as formulações contendo LI apresentaram uma viscosidade consideravelmente maior, quando comparadas com formulações sem LI (Tabela 3), o que mostra que é a presença do LI que afeta a viscosidade das formulações desenvolvidas e não a presença de cada ativo. Além disso, recentemente o nosso grupo mostrou que os LI podem estabilizar as emulsões óleo/água aumentando a viscosidade (14), o que está de acordo com o que foi observado com as formulações deste gel. Assim, o presente estudo não só revela que os LI à base de colina aumentam a viscosidade das formulações em gel, mas reforça que estes materiais podem ser uma escolha inovadora para alterar as propriedades de fluidez e estabilidade de diferentes formulações tópicas.

Finalmente, como os princípios ativos estudados foram incorporados numa concentração que corresponde à máxima solubilidade em água ou em cada mistura de LI (99,8:0,2 %m/m), é importante mencionar que os LI não só contribuíram para uma menor fluidez, mas também permitiram aumentar a incorporação do princípio ativo, quando comparadas com géis aquosos preparados na ausência dos LI. Isso deve-se à maior solubilidade do fármaco na presença dos LI.

Conclusion

The results of the solubility studies carried out in this study showed that not only [Cho][Phe] and [Cho][Gly] may be used as solubility promoters of the studied phenolic compounds, but [Cho][Glu] also increases drug solubility by allowing a 2-fold drug solubility enhancement for *p*-coumaric acid and a 3-fold drug solubility enhancement for caffeic acid.

All the prepared gels were stable, showing that the ILs do not destabilize the formulations. Additionally, the developed gels in the presence of ILs presented a higher viscosity, a factor that may be considered in the formulation process and represent a new functionality of these salts in gel formulations.

Thus, in this study it was shown that choline-based ILs may be quite useful to enhance the drug loading of caffeic and *p*-coumaric acids into topical formulations, such as gels, and also shows that ILs may equally be used to alter the viscosity of topical systems, which may improve the consumer's acceptance of the product.

Authors Contributions Statement

TSA, conceptualization and study design; AJ and NR, experimental implementation; AJ, NR and TSA, data analysis; AJ, MN and TSA, drafting, editing and reviewing; AJ, figures and graphics; TSA, supervision; AJ, MN and TSA, final writing.

Funding

This study was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia, through funding UIDB/0456/2020 and UIDP/04567/2020 (both general funding to CBIOS) as well as by funding from Universidade Lusófona/ILIND (Grant Programme FIPID 2019/2020).

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationship that may present a potential conflict of interest.

Conclusão

Os resultados dos estudos de solubilidade realizados no âmbito deste estudo mostraram que não só o [Cho][Phe] e [Cho][Gly] podem ser usados como promotores de solubilidade dos compostos fenólicos estudados, mas o [Cho][Glu] também aumenta a solubilidade dos princípios ativos ao permitir um aumento da solubilidade para o dobro no caso do ácido *p*-cumárico e para o triplo no caso do ácido cafeico.

Todos os geles preparados permaneceram estáveis, mostrando que os LI não desestabilizam as formulações. Além disso, os géis desenvolvidos na presença de LI apresentaram maior viscosidade, fator que pode ser considerado no processo de formulação e representar uma nova funcionalidade desses sais em formulações gel.

Assim, neste estudo foi demonstrado que LI à base de colina podem ser bastante úteis para aumentar a incorporação de princípios ativos, como os ácidos cafeico e *p*-cumárico, em formulações tópicas, como géis, o que pode melhorar a aceitação do produto pelo consumidor.

Declaração sobre contribuições dos autores

TSA, conceptualização e desenho de estudos; AJ e NR, implementação experimental; AJ, NR e TSA, análise de dados; AJ, MN e TSA, elaboração, edição e revisão; AJ, figuras e gráficos; TSA, supervisão; AJ, MN e TSA, redação final.

Financiamento

Este estudo foi apoiado financeiramente pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do financiamento UIDB/0456/2020 e UIDP/04567/2020 (ambos com financiamento geral para o CBIOS), bem como pelo financiamento da Universidade Lusófona/ILIND (Grant Programme FIPID 2019/2020).

Conflito de interesses

Os autores declaram que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam apresentar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.
- Sova, M., & Saso, L. (2020). Natural Sources, Pharmacokinetics, Biological Activities and Health Benefits of Hydroxycinnamic Acids and Their Metabolites. *Nutrients*, 12(8), 2190. <https://doi.org/10.3390/nu12082190>
- Caparica, R., Rolim Baby, A., Almeida, T.S., & Guilherme Costa, J. (2020). *In vitro* cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells, *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(1), 63-74. <https://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-17-1-2020/bbr.17.1.225.pdf>
- Coman, V., & Vodnar, D. C. (2020). Hydroxycinnamic acids and human health: recent advances. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(2), 483–499. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10010>
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed research international*, 2013, 251754. <https://doi.org/10.1155/2013/2517546>.
- Martínez, K. B., Mackert, J. D. and McIntosh, M. K. (2017) Polyphenols and intestinal health In R. R. Watson (Ed.), *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging* (Chapter 18., pp. 191-210) Academic Press.
- Taofig, O., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2017). Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2), 281. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>.
- Nicolai, M., Mota, J., Fernandes, A. S., Pereira, F., Pereira, P., P Reis, C., Robles Velasco, M. V., Baby, A. R., Rosado, C., & Rijo, P. (2020). Assessment of the Potential Skin Application of *Plectranthus ecklonii* Benth. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(6), 120. <https://doi.org/10.3390/ph13060120>
- Peres, D. D., Ariede, M. B., Candido, T. M., de Almeida, T. S., Lourenço, F. R., Consiglieri, V. O., Kaneko, T. M., Velasco, M. V., & Baby, A. R. (2017). Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens. *Drug development and industrial pharmacy*, 43(2), 246–256. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1236809>
- Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & metabolism*, 13, 27. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
- Kiokias, S., Proestos, C., & Oreopoulou, V. (2020). Phenolic Acids of Plant Origin-A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro (O/W Emulsion Systems) Along with Their in Vivo Health Biochemical Properties. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(4), 534. <https://doi.org/10.3390/foods9040534>.
- Kim, E. O., Min, K. J., Kwon, T. K., Um, B. H., Moreau, R. A., & Choi, S. W. (2012). Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.011>
- Zhang, X., He, X., Chen, Q., Lu, J., Rapposelli, S., & Pi, R. (2018). A review on the hybrids of hydroxycinnamic acid as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(3), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.042>
- Caparica, R., Júlio, A., Fernandes, F., Araújo, 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), 4338. <https://doi.org/10.3390/ijms22094338>
- Damasceno, S. S., Dantas, B. B., Ribeiro-Filho, J., Antônio M Araújo, D., & Galberto M da Costa, J. (2017). Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. *Current pharmaceutical design*, 23(20), 3015–3023. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161208145508>
- Mota, F., Queimada, A.J., Pinho, S.P., & Macedo, E.A. (2008). Aqueous Solubility of Some Natural Phenolic Compounds. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, 5182–5189.
- Caparica, R., Júlio, A., Baby, A. R., Araújo, M., Fernandes, A. S., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2018). Choline-Amino Acid Ionic Liquids as Green Functional Excipients to Enhance Drug Solubility. *Pharmaceutics*, 10(4), 288. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040288>
- Caparica, R., Júlio, A., Araújo, M., Baby, A. R., Fonte, P., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2020). Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules*, 10(2), 233. <https://doi.org/10.3390/biom10020233>
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Saraiva, N., Fernandes, A. S., Araújo, 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>
- Júlio, A., Antunes, C.D., Mineiro, R., Raposo, M., Caparica, R., M. Araújo, M.E., Rosado, C., Fonte, P., & Santos de Almeida, T. (2018). Influence of two choline-based ionic liquids on the solubility of caffeine. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(1):96–102. <https://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-15-1-2018/art9.pdf>
- Júlio, A., Caparica, R., Costa Lima, S. A., Fernandes, A. S., Rosado, C., Prazeres, D., Reis, S., Santos de Almeida, T., & Fonte, P. (2019). Ionic Liquid-Polymer Nanoparticle Hybrid Systems as New Tools to Deliver Poorly Soluble Drugs. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1148. <https://doi.org/10.3390/nano9081148>.
- Gouveia, W., Jorge, T. F., Martins, S., Meireles, M., Carolino, M., Cruz, C., Almeida, T. V., & Araújo, M. E. (2014). Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere*, 104, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.055>
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Mota, J. P., Rijo, P., & Reis, C. P. (2017). An emerging integration between ionic liquids and nanotechnology: general uses and future prospects in drug delivery. *Therapeutic delivery*, 8(6), 461–473. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0002>
- Pedro S.N., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Freire, M.G. (2021) Ionic Liquids in Drug Delivery. *Encyclopedia*, 1(2):324-339. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1020027>
- Júlio, A., Sultane, A., Viana, A. S., Mota, J. P., & Santos de Almeida, T. (2021). Biobased Ionic Liquids as Multitalented Materials in Lipidic Drug Implants. *Pharmaceutics*, 13(8), 1163. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081163>
- Silva, W., Zanatta, M., Ferreira, A. S., Corvo, M. C., & Cabrita, E. J. (2020). Revisiting Ionic Liquid Structure-Property Relationship: A Critical Analysis. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7745. <https://doi.org/10.3390/ijms21207745>
- Ferraz, R., Silva, D., Dias, A. R., Dias, V., Santos, M. M., Pinheiro, L., Prudêncio, C., Noronha, J. P., Petrovski, Ž., & Branco, L. C. (2020). Synthesis and Antibacterial Activity of Ionic Liquids and Organic Salts Based on Penicillin G and Amoxicillin hydrolysate Derivatives against Resistant Bacteria. *Pharmaceutics*, 12(3), 221. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030221>.
- Pedro, S. N., R Freire, C. S., Silvestre, A., & 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), 8298. <https://doi.org/10.3390/ijms21218298>.
- Siopa, F., Frade, R.F., Diniz, A.M., Andrade, J.M., Nicolai, M., Meirinhos, A.R., Lucas, S.D., Marcelo, F., Afonso, C.A., & Rijo, P. (2018). Acetylcholinesterase Choline-Based Ionic Liquid Inhibitors: In Vitro and in Silico Molecular Docking Studies. *ACS Omega*, 3(12):17145–54.
- Ali, M.K., Moshikur, R.M., Wakabayashi, R., Moniruzzaman, M., Kamiya, N., & Goto, M. (2020). Biocompatible Ionic Liquid Surfactant-Based Microemulsion as a Potential Carrier for Sparingly Soluble Drugs. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8, 6263-6272.

31. Júlio, A., Caparica, R., Costa Lima, S. A., Fernandes, A. S., Rosado, C., Prazeres, D., Reis, S., Santos de Almeida, T., & Fonte, P. (2019). Ionic Liquid-Polymer Nanoparticle Hybrid Systems as New Tools to Deliver Poorly Soluble Drugs. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1148. <https://doi.org/10.3390/nano9081148>
32. Almeida, T.S., Júlio, A., Caparica, R., Rosado, C., Fernandes, A.S., Saraiva, N., Ribeiro, M., Araujo, M., Baby, A.R., Costa, J., & Mota, J.P. (2015). Ionic liquids as solubility/permeation enhancers for topical formulations: Skin permeation and cytotoxicity characterization. *Toxicology Letters*, 238..
33. Moshikur, R.M., Chowdhury, M.R., Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2020). Biocompatible ionic liquids and their applications in pharmaceuticals. *Green Chemistry*, 22, 8116-8139.
34. Flory, P. J. (1974) Introductory lecture. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 57(1):7–18. <https://doi.org/10.1039/DC9745700007>
35. Marr, P.C., & Marr, A.C. (2016). Ionic liquid gel materials: applications in green and sustainable chemistry. *Green Chemistry*, 18, 105-128.
36. Sharadha, M., GowdaD, V., VishalGupta, N., & AkhilaA, R. (2020). An overview on topical drug delivery system – Updated review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11, 368-385.
37. Singh Malik, D., Mital, N., & Kaur, G. (2016). Topical drug delivery systems: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26, 213 - 228..
38. Das, B., Nayak, A.K., & Nanda, U. (2013). Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. *International journal of biological macromolecules*, 62, 514-7 .
39. Lee, J. A., & Nobles, W. L. (1959). Pharmaceutical applications of the sodium salt of carbopol 934. *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association*, 48(2), 92–94. <https://doi.org/10.1002/jps.3030480205>.
40. Chen, J., Zhou, R., Li, L., Li, B., Zhang, X., & Su, J. (2013). Mechanical, rheological and release behaviors of a poloxamer 407/ poloxamer 188/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(10), 12415–12425. <https://doi.org/10.3390/molecules181012415>.
41. ANVISA - National Health Surveillance Agency. Cosmetic Products Stability Guide. Vol. 1. Brasilia, Brazil: ANVISA Publising House; 2004.
42. Dervaux, J., & Amar, M. (2012). Mechanical Instabilities of Gels. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 3(1), 311-332..
43. Fontecha-Cámara, M. A., Álvarez, M. A., López-Ramón, V., & Moreno-Castilla, C. (2015). Fenton oxidation of gallic and p-coumaric acids in water assisted by an activated carbon cloth. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 71(5), 789–794. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.034>.
44. Calixto, L. S., Infante, V., & Maia Campos, P. (2018). Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1512–1519. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0960-0>.
45. Correa, N.M., Junior, F.B., Ignácio, R.F., & Leonardi, G.R. (2005). Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira De Ciencias Farmaceuticas*, 41, 73-78.