

**Ana Beatriz Pajote Matado de Sá e Silva**

Licenciada em Bioquímica



## **Solubilidade de princípios ativos em água através de líquidos iónicos biocompatíveis**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientadora: Doutora Patrícia Reis, Investigadora auxiliar, FCT NOVA

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Rita Duarte, Professora associada, FCT NOVA

**Dezembro, 2020**



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



**Ana Beatriz Pajote Matado de Sá e Silva**

Licenciada em Bioquímica

# **Solubilidade de princípios ativos em água através de líquidos iónicos biocompatíveis**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientadora: Doutora Patrícia Reis, Investigadora auxiliar, FCT NOVA

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Rita Duarte, Professora associada, FCT NOVA

**Dezembro, 2020**



**Solubilidade de princípios ativos em água através de líquidos iónicos biocompatíveis**

Copyright © Ana Beatriz Pajote Matado de Sá e Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Progress is made by trial and failure; the failures are generally a hundred times more numerous than the successes; yet they are usually left unchronicled.”*

- **William Ramsay**



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, o meu agradecimento vai para a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, em especial ao Departamento de Química, que em 2014 me acolheu no curso de Bioquímica e que agora deixo com muito boas memórias e com um conhecimento geral do que é o mundo da ciência.

Depois, agradecer à minha orientadora, Doutora Patrícia Reis, e à minha co-orientadora, Doutora Ana Rita Duarte, que me acolheram nos seus laboratórios durante este ano e me deram a oportunidade de realizar esta Dissertação de Mestrado da melhor maneira, me transmitiram os seus ensinamentos e me ajudaram do início ao fim seja a nível laboratorial, seja na escrita deste documento.

Um especial agradecimento à minha colega de laboratório, Mestre Daniela Agostinho, que foi essencial na realização desta Dissertação e que esteve lá para me ajudar dia e noite, sem pedir nada em troca.

Um agradecimento aos restantes colegas do laboratório de Química Verde, nomeadamente à Margarida Custódio pelas mútuas ajudas e desabafos.

Um agradecimento à Doutora Ana Rita Jesus e Mestre Filipa Santos, por toda a ajuda nos testes de citotoxicidade e permeabilidade.

Um agradecimento à Doutora Madalena Dionísio e Doutora Teresa Cordeiro, pela possibilidade de realização do DSC no respetivo laboratório.

Um agradecimento à Doutora Ana Teresa Lopes por todo o serviço prestado pelo laboratório de RMN.

Por fim, um agradecimento à minha família e amigos que desde o primeiro dia estiveram lá para me animar, motivar e não deixar desistir. Se hoje em dia posso dizer que estou a terminar o Mestrado em Bioquímica é com certeza devido a todos eles, em especial aos amigos que levo do curso, que me ajudaram não só agora mas em toda a Licenciatura e Mestrado.



## Resumo

A indústria farmacêutica lida diariamente com o dilema da produção de princípios ativos farmacêuticos que são pouco solúveis em água e conseqüentemente com uma baixa biodisponibilidade. Fármacos pouco solúveis em água vão levar a uma fraca absorção assim como biodisponibilidade. Por esta razão têm sido testadas várias maneiras de aumentar a solubilidade destes, sendo uma delas o uso de líquidos iônicos.

Esta Dissertação teve assim como objetivo principal a síntese de novos líquidos iônicos como excipientes dos fármacos cetoprofeno e ibuprofeno, de forma a perceber qual poderá ser o melhor co-solvente para atingir a maior solubilidade dos fármacos em água, tendo também em conta a sua citotoxicidade.

A partir da colina foram efetuadas mudanças nas suas cadeias, alterando o tamanho da cadeia alquílica, o número de grupo 2-hidroxietilo e mudando os seus grupos funcionais, estudando vários aniões como o bromo, acetil aminoácidos e ácidos carboxílicos, sempre tendo em conta a toxicidade de forma a ter uma variedade de líquidos iônicos viáveis para a aplicação a que se destinam. Os ensaios foram feitos a uma temperatura de 37°C para simular a temperatura do corpo humano.

O líquido iónico  $[(N_{12OH_{20H}})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  promoveu o maior aumento da solubilidade dos fármacos, tendo um  $IC_{50}$  de 138,5 mM e sendo assim um dos líquidos iónicos estudados menos tóxicos. Com este IL a 0,3 mol% o valor de solubilidade aumentou em cerca de 53 e 38 vezes para o cetoprofeno e ibuprofeno, respetivamente. O líquido iónico  $[(N_{12OH_{20H}})_2C_2OC_2][CH_3CO_2]_2$  a 0,4 mol% promoveu um aumento da solubilidade do cetoprofeno e ibuprofeno em cerca de 50 e 46 vezes, respetivamente. Os líquidos iónicos que mais promoveram a solubilidade dos fármacos foram os dicatiónicos, com catiões com quatro grupos 2-hidroxietilo, com um *linker* de seis carbonos e com ácidos carboxílicos como anião.

**Palavras-chave:** Líquidos iónicos, Cetoprofeno, Ibuprofeno, Solubilidade, Citotoxicidade



## Abstract

*The pharmaceutical industry deals everyday with the problem of producing pharmaceutical active ingredients that are poorly soluble in water and consequently have low bioavailability. Poorly water-soluble drugs will lead to poor absorption as well as bioavailability, including by oral administration. For this reason, several ways to increase their solubility have been tested, one of which is the use of ionic liquids.*

*This Dissertation had as main objective the synthesis of new ionic liquids as excipients of the drugs ketoprofen and ibuprofen, in order to understand which could be the best co-solvent to achieve the greatest possible solubility of the drugs in water, also taking into account the cytotoxicity.*

*From the choline, changes were made in its chains, changing the size of the alkyl chain, the number of 2-hydroxyethyl groups and changing its functional groups, studying various anions such as bromine, acetyl amino acids and carboxylic acids, always taking into account toxicity in order to have a variety of viable ionic liquids for the intended application. The tests were carried out at 37°C to simulate the temperature of the human body.*

*The ionic liquid  $[(N_{12OH2OH})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  promoted the greatest increase in the solubility of the drugs, having an  $IC_{50}$  of 138,5 mM. With this IL at 0,3 mol% the solubility increased by about 53 and 38 times for ketoprofen and ibuprofen, respectively. At 0,4 mol%, the ionic liquid  $[(N_{12OH2OH})_2C_2OC_2][CH_3CO_2]_2$  promoted an increase in the solubility of ketoprofen and ibuprofen by around 50 and 46 times, respectively. The ionic liquids that most promoted the solubility of drugs were dicationic, with cations with four 2-hydroxyethyl groups, with a six-carbon linker and with carboxylic acids as an anion.*

**Keywords:** *Ionic liquids, Ketoprofen, Ibuprofen, Solubility, Cytotoxicity*



# Índice

Agradecimentos.....	VII
Resumo .....	IX
<i>Abstract</i> .....	XI
Índice .....	XIII
Índice de figuras .....	XV
Índice de tabelas .....	XXI
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XXIII
1. Introdução .....	1
1.1. Líquidos iônicos.....	2
1.1.1. Catião .....	2
1.1.2. Anião.....	3
1.1.3. Síntese .....	4
1.2. Coeficiente de partição (Kow) e log P .....	5
1.3. Fármacos.....	5
1.4. Biodisponibilidade.....	6
1.4.1. Solubilidade .....	6
1.4.2. Permeabilidade.....	6
1.5. Toxicidade .....	7
1.6. Objetivos.....	8
2. Materiais e Métodos.....	9
2.1. Síntese .....	9
2.1.1. Coluna de permuta iônica .....	13
2.1.2. Ressonância magnética nuclear .....	18
2.1.3. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) .....	19
2.2. Coeficiente de partição e log P .....	20
2.3. Biodisponibilidade.....	21
2.3.1. Retas de calibração dos fármacos .....	21
2.3.2. Testes de solubilidade.....	21
2.3.3. Permeabilidade.....	21
2.4. Espectroscopia de UV/Visível .....	22
2.5. Citotoxicidade .....	24
2.5.1. Sub-cultura de células .....	24
2.5.2. Contagem de células.....	25
2.5.3. Ensaio de citotoxicidade em cultura 2D .....	25
2.5.4. Tratamento de dados .....	26
3. Resultados e Discussão.....	27
3.1. Síntese dos líquidos iônicos.....	27

3.1.1.	Caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN) .....	27
3.1.2.	Caracterização por Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC).....	29
3.2.	Coeficiente de partição (log P) .....	31
3.3.	Biodisponibilidade.....	31
3.3.1.	Solubilidade .....	32
3.3.1.1.	Efeito do tamanho da cadeia alquílica do catião.....	33
3.3.1.2.	Efeito do número de grupos 2-hidroxietilo do catião.....	36
3.3.1.3.	Efeito da alteração do anião.....	38
3.3.1.4.	Diferenças na solubilidade com a utilização de líquidos iônicos mono- e dicatiónicos 40	
3.3.1.5.	Efeito de diferentes concentrações de líquido iônico.....	41
3.3.1.6.	Efeito da variação do tempo de agitação e temperatura .....	45
3.3.1.7.	Os melhores resultados de solubilidade .....	48
3.3.2.	Permeabilidade.....	51
3.4.	Citotoxicidade .....	52
4.	Conclusões.....	57
5.	Trabalho Futuro.....	59
6.	Referências .....	61
Anexos	.....	65

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Imidazol.....	3
Figura 1.2 - Colina.....	3
Figura 1.3 - a) Acetato; b) Sulfato; c) Fosfato.....	3
Figura 1.4 - Cetoprofeno.....	5
Figura 1.5 - Ibuprofeno.....	6
Figura 2.1 - Desvios típicos de ressonância magnética nuclear para o $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em compostos orgânicos. (Levitt, M. H. (2013). ).....	19
Figura 2.2 - Curvas típicas de arrefecimento (1) e aquecimento (2) da Calorimetria Diferencial de Varrimento dum polímero. (Kalogeras, I. M. (2016).).....	19
Figura 2.3 - Características da transmissão da luz de diferentes tipos de materiais de cuvettes. (Upstone, S. L. (2006).).....	23
Figura 2.4 - Esquema de um espectrofotômetro de feixe duplo. (Upstone, S. L. (2006).).....	24
Figura 2.5 - Esquema de inoculação numa placa de 96 poços.....	26
Figura 3.1 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do líquido iónico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] \text{Br}_2$ (1) em $\text{D}_2\text{O}$ .....	27
Figura 3.2 - Espectro $^{13}\text{C}$ RMN do líquido iónico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] \text{Br}_2$ (1) em $\text{D}_2\text{O}$ .....	28
Figura 3.3 - Termograma obtido para o líquido iónico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12) e respetivos ciclos.....	30
Figura 3.4 - Termograma obtido para o líquido iónico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_{10}] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (16) e respetivos ciclos.....	30
Figura 3.5 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos que melhoraram a solubilidade do cetoprofeno.....	32
Figura 3.6 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos que melhoraram a solubilidade do ibuprofeno.....	33
Figura 3.7 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_{10}] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (16) e $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12), $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_{10}] [\text{AcAla}]_2$ (17) e $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] [\text{AcAla}]_2$ (6) e $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_{10}] \text{Br}_2$ (15) e $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] \text{Br}_2$ (1), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno.....	34
Figura 3.8 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12), $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_{10}] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (16), $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_4] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (22) e $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_2\text{OC}_2] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (21), todos a 0,3 mol% para o cetoprofeno.....	34
Figura 3.9 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12) e $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_{10}] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (16), ambos a 0,2 mol% para o ibuprofeno.....	35
Figura 3.10 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_2\text{OC}_2] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (21), $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_4] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (22), $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12) e $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_{10}] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (16), todos a 0,3 mol% para o ibuprofeno.....	36

Figura 3.11 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6), [(N<sub>2</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (13) e [(N<sub>1</sub> 1 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (10), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno. .... 37

Figura 3.12 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6) e [(N<sub>2</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (13), ambos a 0,2 mol% para o ibuprofeno. 37

Figura 3.13 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcGly]<sub>2</sub> (9), [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6) e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12), a 0,2 e 0,3 mol% e o líquido iónico [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (14) a 0,2 mol%, todos para o ibuprofeno..... 38

Figura 3.14 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [N<sub>1</sub> 6 2OH<sub>2</sub> 2OH] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>] (18), [N<sub>1</sub> 6 2OH<sub>2</sub> 2OH] [AcAla] (8) e [N<sub>1</sub> 6 2OH<sub>2</sub> 2OH] Br (2), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno..... 39

Figura 3.15 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>10</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (16), [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>10</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (17) e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>10</sub>] Br<sub>2</sub> (15), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno. .... 39

Figura 3.16 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] Br<sub>2</sub> (1), [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcPhe]<sub>2</sub> (7) e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (14) a 0,2 mol% e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcGly]<sub>2</sub> (9), [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6) e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12) a 0,2 e 0,3 mol%, para o cetoprofeno..... 40

Figura 3.17 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] Br<sub>2</sub> (1) e [N<sub>1</sub> 6 2OH<sub>2</sub> 2OH] Br (2), [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6) e [N<sub>1</sub> 6 2OH<sub>2</sub> 2OH] [AcAla] (8) e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12) e [N<sub>1</sub> 6 2OH<sub>2</sub> 2OH] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>] (18), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno. .... 41

Figura 3.18 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6) a 0,1, 0,2 e 0,3 mol%, [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcGly]<sub>2</sub> (9) a 0,2 e 0,3 mol%, [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12) a 0,1, 0,2 e 0,3 mol% e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (14) a 0,05, 0,1 e 0,2 mol%, todos para o cetoprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelos símbolos \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* que correspondem a p = 0,0029, p = 0,0006 e p < 0,0001, respetivamente..... 42

Figura 3.19 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>10</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (16) a 0,2 e 0,3 mol% e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (21) e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (22) a 0,3 e 0,4 mol% todos para o cetoprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelos símbolos \*\* e \*\*\*\* que correspondem a p = 0,0045 e p < 0,0001, respetivamente. .... 43

Figura 3.20 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcGly]<sub>2</sub> (9) a 0,2 e 0,3 mol%, [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub> 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6) a 0,2 e 0,3 mol% e [(N<sub>1</sub> 2OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12), todos para o ibuprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelo símbolo \*\*\*\* que corresponde a p < 0,0001..... 44

Figura 3.21 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (16) a 0,2 e 0,3 mol% e [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> OC <sub>2</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (21) e [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (22) a 0,3 e 0,4 mol%, todos para o ibuprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelo símbolo **** que corresponde a p < 0,0001. ....	45
Figura 3.22 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos e 24 horas do líquido iónico [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12) a 0,1 mol% para o cetoprofeno. ....	46
Figura 3.23 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 30 minutos e 24 horas dos líquidos iónicos [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12) e [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (16), ambos a 0,3 mol% para o cetoprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelos símbolos ** e *** que correspondem a p = 0,0038 e p = 0,0006, respetivamente.....	46
Figura 3.24 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos, 30 minutos e 24 horas do líquido iónico [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (16) a 0,3 mol% para o ibuprofeno. ...	47
Figura 3.25 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos e 24 horas do líquido iónico [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12) a 0,1 mol% para o ibuprofeno. ....	47
Figura 3.26 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos do líquido iónico [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12) a 0,05 e 0,1 mol% para o ibuprofeno. ....	48
Figura 3.27 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12) e [(N <sub>1</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] Br <sub>2</sub> (4), ambos a 0,2 mol% para o cetoprofeno. ....	49
Figura 3.28 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> OC <sub>2</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (21) e [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcGly] <sub>2</sub> (9), ambos a 0,3 mol% para o ibuprofeno. ....	49
Figura 3.29 - Espetro 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY do cetoprofeno com o líquido iónico 12 ([N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> ) a 0,3 mol% em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	50
Figura 3.30 - Espetro 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY do ibuprofeno com o líquido iónico 12 ([N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> ) a 0,3 mol% em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	51
Figura 3.31 - Citotoxicidade dos líquidos iónicos 1, 6, 9, 12, 13, 16, 21 e 22 em células de fibroblastos de L929. Os resultados estão expressos como a média ± desvio padrão de três ensaios biológicos independentes. Os símbolos *, **, *** e **** indicam que as viabilidades são estatisticamente significantes com p = 0.0468 (0,0138 para o IL12), p = 0.0035 (0,0054 para o IL12), p = 0.0005 e p = 0.0001, respetivamente, quando comparados com o controlo. ....	53
Figura A.1 - [(N <sub>1</sub> 2OH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] Br <sub>2</sub> . Dibrometo de N,N' – dimetil – N, N, N', N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (1) .....	65
Figura A.2 - [N <sub>1</sub> 6 2OH <sub>2</sub> OH] Br. Brometo de N, N – di(2 – hidroxietil) – N – metil – 1 – hexanoamónio (2) .....	65
Figura A.3 - [(N <sub>1</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] Br <sub>2</sub> . Dibrometo de N, N' – di(2 – hidroxietil) – N, N, N', N' – tetrametil – 1,6 – hexanodiamónio (3) .....	65
Figura A.4 - [(N <sub>1</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] Br <sub>2</sub> . Dibrometo de N, N' – di(2 – hidroxietil) – N, N, N', N' – tetrametil – 1,4 – butanodiamónio (4).....	65

Figura A.5 - $[(N_{2OH\ 2OH\ 2OH})_2C_6] Br_2$ . Dibrometo de N,N,N',N',N' – hexa(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (5) .....	65
Figura A.6 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_6] [AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (6) .....	66
Figura A.7 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_6] [AcPhe]_2$ . Diacetilfenilalalinato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (7) .....	66
Figura A.8 - $[N_{162(OH)2(OH)}][AcAla]$ . Acetilalalinato de N,N – di(2 – hidroxietil) – N – metil – 1 – hexanoamónio (8) .....	66
Figura A.9 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_6] [AcGly]_2$ . Diacetilglicinato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (9) .....	66
Figura A.10 - $[(N_{1\ 1\ 2OH})_2C_6] [AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de N,N' – di(2 – hidroxietil) – N,N,N',N' – tetrametil – 1,6 – hexanodiamónio (10) .....	66
Figura A.11 - $[(N_{1\ 1\ 2OH})_2C_4] [AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de N,N' – di(2 – hidroxietil) – N,N,N',N' – tetrametil – 1,4 – butanodiamónio (11) .....	66
Figura A.12 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_6] [CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (12) .....	66
Figura A.13 - $[(N_{2OH\ 2OH\ 2OH})_2C_6] [AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de N,N,N,N',N',N' – hexa(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (13) .....	66
Figura A.14 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_6] [CH_3CH_2CH_2CO_2]_2$ . Dibutanoato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (14) .....	66
Figura A.15 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_{10}] Br_2$ . Dibrometo de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,10 – decanodiamónio (15) .....	66
Figura A.16 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_{10}] [CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,10 – decanodiamónio (16) .....	66
Figura A.17 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_{10}] [AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,10 – decanodiamónio (17) .....	66
Figura A.18 - $[N_{162(OH)2(OH)}][CH_3CO_2]$ . Acetato de N,N – di(2 – hidroxietil) – N – metil – 1 – hexanoamónio (18) .....	66
Figura A.19 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_2OC_2] Br_2$ . Dibrometo de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – dietiléteramónio (19) .....	66
Figura A.20 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_4] Br_2$ . Dibrometo de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,4 – butanodiamónio (20) .....	66
Figura A.21 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_2OC_2] [CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – dietiléteramónio (21) .....	66
Figura A.22 - $[(N_{1\ 2OH\ 2OH})_2C_4] [CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,4 – butanodiamónio (22) .....	66
Figura A.23 - Retas de calibração do cetoprofeno para os ensaios do coeficiente de partição e log P. ....	66

Figura A.24 - Reta de calibração do ibuprofeno para os ensaios do coeficiente de partição e log P. ....	66
Figura A.25 - Reta de calibração do cetoprofeno para os ensaios de solubilidade.....	66
Figura A.26 - Reta de calibração do ibuprofeno para os ensaios de solubilidade.....	66
Figura A.27 - Reta de calibração do cetoprofeno para os ensaios de permeabilidade. ....	66
Figura A.28 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [N <sub>16</sub> 2OH 2OH] Br (2) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.29 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [N <sub>16</sub> 2OH 2OH] Br (2) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.30 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] Br <sub>2</sub> (3) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.31 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] Br <sub>2</sub> (3) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.32 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] Br <sub>2</sub> (4) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.33 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] Br <sub>2</sub> (4) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.34 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (6) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.35 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (6) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.36 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcPhe] <sub>2</sub> (7) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.37 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcPhe] <sub>2</sub> (7) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.38 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [N <sub>16</sub> 2OH 2OH] [AcAla] (8) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.39 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [N <sub>16</sub> 2OH 2OH] [AcAla] (8) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.40 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcGly] <sub>2</sub> (9) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.41 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcGly] <sub>2</sub> (9) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.42 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (10) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.43 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (10) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.44 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (11) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.45 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>11</sub> 2OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (11) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.46 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.47 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.48 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>20H</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (13) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.49 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>20H</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (13) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.50 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (14) em D <sub>2</sub> O. .....	66
Figura A.51 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (14) em D <sub>2</sub> O. .....	66
Figura A.52 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] Br <sub>2</sub> (15) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.53 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] Br <sub>2</sub> (15) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.54 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (16) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.55 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (16) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.56 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (17) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.57 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [(N <sub>12</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (17) em D <sub>2</sub> O.....	66
Figura A.58 - Espetro <sup>1</sup> H RMN do líquido iônico [N <sub>16</sub> 2OH 2OH] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] (18) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.59 - Espetro <sup>13</sup> C RMN do líquido iônico [N <sub>16</sub> 2OH 2OH] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] (18) em D <sub>2</sub> O. ....	66

Figura A.60 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_2\text{OC}_2]$ Br <sub>2</sub> (19) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.61 - Espectro $^{13}\text{C}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_2\text{OC}_2]$ Br <sub>2</sub> (19) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.62 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_4]$ Br <sub>2</sub> (20) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.63 - Espectro $^{13}\text{C}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_4]$ Br <sub>2</sub> (20) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.64 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_2\text{OC}_2]$ $[\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (21) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.65 - Espectro $^{13}\text{C}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_2\text{OC}_2]$ $[\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (21) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.66 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_4]$ $[\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (22) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.67 - Espectro $^{13}\text{C}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_4]$ $[\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (22) em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.68 - Espectro $^1\text{H}$ RMN da N-acetil alanina em D <sub>2</sub> O. ....	66
Figura A.69 - Espectro $^1\text{H}$ RMN da N-acetil fenilalanina em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	66
Figura A.70 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do cetoprofeno em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	66
Figura A.71 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do cetoprofeno com o líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6]$ $[\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12) em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	66
Figura A.72 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do ibuprofeno em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	66
Figura A.73 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do ibuprofeno com o líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6]$ $[\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12) em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	66
Figura A.74 - Espectro $^1\text{H}$ RMN do líquido iônico $[(\text{N}_{1,2\text{OH},2\text{OH}})_2\text{C}_6]$ $[\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$ (12) em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	66

## Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Líquidos iônicos sintetizados e respetiva estrutura e massa molar. ....	9
Tabela 2.2 - Líquidos iônicos sintetizados por coluna de permuta aniónica e respetiva massa molar, líquido iónico de partida e composto que origina o anião. ....	13
Tabela 2.3 - Volume de tripsina e meio recomendado para a área do frasco. ....	24
Tabela 3.1 - Compostos testados por DSC e respetivas temperaturas de fusão, de transição vítrea e de cristalização. ....	29
Tabela 3.2 - Valores de log P do cetoprofeno e ibuprofeno com e sem líquido iónico. ....	31
Tabela 3.3 - Valores de IC <sub>50</sub> determinados e respetivos líquidos iónicos. ....	54



## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>AcAla</b>	Acetil alanina
<b>AcGly</b>	Acetil glicina
<b>AcPhe</b>	Acetil fenilalanina
<b>Br</b>	Bromo
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Água deuterada
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>DSC</b>	Calorimetria Diferencial de Varrimento, do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
<b>FBS</b>	Soro fetal de bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>IBU</b>	Ibuprofeno
<b>IL</b>	Líquido iônico
<b>KETO</b>	Cetoprofeno
<b>log P</b>	Coefficiente de partição
<b>MEM</b>	Meio essencial mínimo, do inglês <i>Minimum Essential Medium</i>
<b>mol%</b>	Porcentagem molar
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
<b>NOESY</b>	Espetroscopia de efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino, do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>PS</b>	Penicilina-Estreptomicina, do inglês <i>Penicillin-Streptomycin</i>
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear, do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance (NMR)</i>
<b>RTILs</b>	Líquidos iônicos à temperatura ambiente, do inglês <i>Room Temperature Ionic Liquids</i>
<b>t</b>	Tempo
<b>UV</b>	Ultravioleta



# 1. Introdução

A indústria farmacêutica lida diariamente com o dilema da produção de princípios ativos farmacêuticos que são pouco solúveis em água e conseqüentemente com uma baixa biodisponibilidade. Durante a última década, os maiores desafios para a indústria farmacêutica foram a baixa produção e aumento dos custos da pesquisa e de desenvolvimento de fármacos que conseqüentemente levaram à expiração dos prazos de validade dos reagentes para a sua síntese. Estes problemas, acrescidos ao facto das empresas terem de competir com outras que vendem os fármacos a preços consideravelmente inferiores, levou a que estas desenvolvessem novas técnicas para aumentar a eficiência da síntese dos fármacos. Infelizmente, muitos dos novos fármacos promissores são pouco solúveis em água ou em solventes orgânicos aceites a nível farmacêutico, o que leva a que estes não entrem sequer no estágio de formulação. Fármacos pouco solúveis em água vão levar a uma fraca absorção assim como biodisponibilidade, incluindo por administração oral. <sup>[1]</sup> A maioria dos fármacos vendidos no mercado são de administração oral pois se o fármaco for bem absorvido este torna-se um método efetivo, conveniente, económico e seguro. No entanto existem desvantagens com este tipo de administração devido às suas propriedades, como a solubilidade em água ou pKa, que podem causar uma absorção limitada ou errada levando à ineficácia. <sup>[2]</sup>

A solubilidade é um parâmetro importante para perceber qual a concentração de fármaco que é necessária entrar no sistema da pessoa de modo a que haja a resposta farmacológica requerida. Esta é definida em termos quantitativos como a concentração de um soluto numa solução saturada a uma certa temperatura e em termos qualitativos como a interação espontânea entre duas ou mais substâncias para formar uma dispersão molecular homogénea. Uma solução saturada é aquela em que o soluto está em equilíbrio com o solvente. A solubilidade de um fármaco é a concentração máxima a que um fármaco se dissolve num solvente a condições específicas de temperatura, pH e pressão e a solubilidade do fármaco numa solução saturada é uma propriedade estática em que a taxa de dissolução do fármaco é uma propriedade dinâmica que se relaciona com a taxa de biodisponibilidade. <sup>[3]</sup>

A baixa solubilidade dos princípios ativos leva a uma fraca absorção, assim como biodisponibilidade. <sup>[3]</sup> Por esta razão têm sido testadas várias maneiras de aumentar a solubilidade destes, sendo uma delas o uso de líquidos iónicos. Os líquidos iónicos têm sido muito estudados nos últimos anos como solventes “verdes”. Os líquidos iónicos que são líquidos à temperatura ambiente (*RTILs, Room Temperature Ionic Liquids*) têm sido utilizados para várias aplicações e a sua produção prossegue devido às suas propriedades peculiares como baixa inflamabilidade e volatilidade, alta estabilidade térmica e química e solubilidade compatível com vários compostos orgânicos. <sup>[4]</sup>

A solubilidade dos líquidos iónicos em água depende muito do catião e anião presentes e, de um modo geral, diminui com o aumento do carácter orgânico (comprimento da cadeia alquílica) do catião e diminui com o carácter fluorado do anião. <sup>[5]</sup>

## 1.1. Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos são sais constituídos por uma parte catiónica orgânica e uma parte aniônica orgânica ou inorgânica, [7] que à temperatura ambiente podem ser sólidos ou líquidos. São não voláteis, termicamente estáveis e têm temperaturas de fusão inferiores a 100°C. [5] Têm como desvantagens o custo, a baixa biodegradabilidade e sustentabilidade. [7] Recentemente, os líquidos iônicos que são líquidos à temperatura ambiente têm sido muito estudados devido à sua temperatura de fusão inferior a 30°C. [5] Ao variar os seus pares de iões é possível mudar as suas propriedades tais como viscosidade, densidade, biodegradabilidade, toxicidade e solubilidade.

Os líquidos iônicos são considerados potenciais solventes para reduzir o problema da baixa solubilidade, aumentando a solubilidade dos princípios ativos na água, isto devido à sua baixa volatilidade e baixa inflamabilidade. [5] No entanto, deve ter-se em conta a toxicidade destes. Alguns estudos demonstram que podem ser produzidos líquidos iônicos não tóxicos selecionando catiões orgânicos e aniões inorgânicos biocompatíveis. [1]

Os líquidos iônicos variam também na sua higroscopicidade, ou seja, a capacidade destes absorverem água da atmosfera. O que acontece é que esta exposição ao ar pode alterar as suas propriedades físico-químicas, podendo ou não ser um problema em algumas aplicações dos líquidos iônicos. [8]

A possibilidade de alteração do catião e anião do líquido iônico leva a que haja um vasto número de combinações, podendo assim ser adaptadas características como viscosidade, ponto de fusão, hidroflicidade/hidrofobicidade e caráter ácido/básico. Na generalidade, os líquidos iônicos têm um grande poder de solvatação tanto para compostos orgânicos como inorgânicos e polímeros naturais, o que promove o seu uso em formulações de princípios ativos. [9]

A pesquisa e estudo dos líquidos iônicos começou inicialmente por ser muito focada em catiões baseados no imidazol e nos aniões tetrafluoroborato ( $[BF_4]^-$ ) e hexafluorofosfato ( $[PF_6]^-$ ), devido à facilidade da sua síntese e purificação. No entanto, foi descoberto que estes líquidos iônicos têm uma estabilidade térmica baixa e sofrem reações de hidrólise resultando na produção dos compostos tóxicos HF e  $BF_3$ . Posteriormente, estudaram-se os aniões bis(trifluorometilsulfonil)amida ( $[NTf_2]^-$ ) e tris(perfluoroalquil)trifluorofosfato ( $[FAP]^-$ ) pois têm uma boa estabilidade e muitas aplicações em vários campos da catálise. [5]

Nas últimas décadas a colina tem sido utilizada em vários estudos como catião de maneira a produzir líquidos iônicos biocompatíveis, ou seja, biodegradáveis e com baixa toxicidade. Esta faz parte do complexo B de vitaminas e pode ser obtida a partir de recursos naturais.

### 1.1.1. Catião

O imidazol (Figura 1.1) foi reportado em vários estudos como um catião utilizado em líquidos iônicos juntamente com variados aniões, formando um co-solvente “verde” dada a sua baixa volatilidade. Ganhou uma especial atenção devido à sua estabilidade térmica, estrutura ajustável, comportamento anfotérico em solução, entre outros. [10]

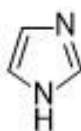


Figura 1.1 - Imidazol.

No entanto, a colina (Figura 1.2) tem sido estudada nos últimos anos e demonstra melhores resultados na solubilidade e citotoxicidade que o imidazol. <sup>[13]</sup> A colina é um catião benéfico devido à sua baixa toxicidade e à sua biodegradabilidade, emergindo assim como uma aposta eficaz na produção de compostos “verdes”. <sup>[9]</sup> <sup>[12]</sup> É um nutriente essencial aos seres humanos <sup>[13]</sup>, assim como para o normal funcionamento de todas as células e para a sua biossíntese e hidrólise através do controlo destas por mecanismos de regulação elaborados, envolvida também em funções como a memória e o controlo muscular. <sup>[9]</sup> <sup>[14]</sup>

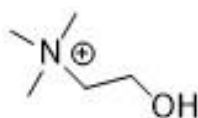


Figura 1.2 - Colina.

De acordo com Adawiyah, N., et al. a colina é o catião menos tóxico dos estudados no artigo deste e é por isso muito usada. Pode-se, alternando as suas cadeias, estudar qual poderá ser o melhor catião para obter a mais alta solubilidade do princípio ativo em água. O cloreto de colina é um líquido iónico comercial bastante estudado, sendo muito usado na síntese de líquidos iónicos baseados no catião colina. <sup>[1]</sup> <sup>[9]</sup> <sup>[15]</sup>

Desde o início dos anos 2000 têm sido reportadas várias publicações usando a colina como catião e outros compostos onde se incluem aminoácidos, adoçantes artificiais e ácidos carboxílicos como aniões, devido à sua baixa toxicidade.

### 1.1.2. Anião

Assim como o catião, o anião desempenha um papel importante na biodegradabilidade dos líquidos iónicos. Segundo Adawiyah, N., et al. aniões com cadeias lineares longas são totalmente biodegradáveis ao contrário dos com cadeias curtas. <sup>[1]</sup> Além disso, aniões orgânicos com grupos acetato, sulfato e fosfato (Figura 1.3) são considerados facilmente biodegradáveis. <sup>[9]</sup>

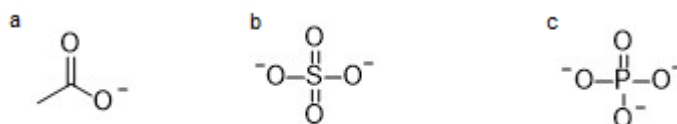


Figura 1.3 - a) Acetato; b) Sulfato; c) Fosfato.

Assim como a estrutura do catião, onde se inclui o comprimento e simetria dos grupos substituintes, também a estrutura e a deslocalização da carga do anião são cruciais para determinar as suas propriedades e características e conseqüentemente a sua toxicidade. [9] Para além destes, os aminoácidos como anião têm sido estudados devido ao seu baixo custo em grandes quantidades, disponibilidade, biodegradabilidade e atividade biológica. [16]

### 1.1.3. Síntese

O primeiro líquido iónico foi sintetizado em 1914 por Paul Walden ao descobrir que o  $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$  tinha um ponto de fusão de  $12^\circ\text{C}$ . [17] Algumas décadas depois (anos 80) e já conhecidos vários líquidos iónicos, estes não tinham muitas aplicações devido à sua baixa estabilidade química na água e ar. Para além disto, a sua síntese, que consistia num mecanismo de quaternização do heteroátomo dum composto heterocíclico como o imidazol, consumia bastante tempo, o que levou a que fossem criados os “líquidos iónicos de segunda geração”. Estes, para além de terem propriedades físicas e químicas mais interessantes que os anteriores, foram otimizados em termos de síntese. Uma das mais importantes mudanças foi a troca de aniões sensíveis à água e ar por halogéneos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) ou aniões como o,  $\text{NTf}_2^-$ ,  $\text{PF}_6^-$  e  $\text{BF}_4^-$ . Após esta permuta, o composto é purificado com grandes quantidades de solvente que é depois seco por várias horas. Isto faz com que a síntese seja mais económica do que adquirir líquidos iónicos comerciais. Mais recentemente foi criada a “terceira geração de líquidos iónicos” que são baseados em aniões mais estáveis e mais hidrofóbicos como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, alquilsulfatos ou alquifosfatos e catiões como a colina. Estes apresentam propriedades como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e não inflamabilidade tornando-os assim vantajosos em relação às gerações anteriores. [18] [19]

A síntese dos líquidos iónicos desta dissertação baseou-se numa reação de N-alquilação de uma amina terciária com um halogeneto de alquilo, seguida de uma neutralização/permuta iónica de forma a obter o anião pretendido (coluna de permuta iónica). Os reagentes são adicionados a um tubo de pressão e deixados durante várias horas, por vezes dias, em agitação e à temperatura necessária para haver a separação do composto do solvente.

Para muitos líquidos iónicos a sua preparação está fortemente associada à pureza necessária após a síntese, determinada por ressonância magnética nuclear (1.1.4.). [5]

Os líquidos iónicos dicatiónicos têm sido reportados como vantajosos em relação aos monocatiónicos enquanto mantêm o poder de solvatação que é fundamental. Estabilidade térmica e química alta, estrutura ajustável e capacidade térmica superior bem como maior ponto de fusão, viscosidade e tensão superficial são algumas das vantagens reportadas. A inserção de um “novo catião” nos líquidos iónicos dicatiónicos faz aumentar a biocompatibilidade e estes são por isso um dos objetos de estudo desta dissertação. [20]

## 1.2. Coeficiente de partição (Kow) e log P

O coeficiente de partição (Kow ou P) é definido como o rácio entre a concentração duma molécula neutra num sistema de dois solventes imiscíveis, uma fase orgânica (sistema lipídico como gorduras, óleos, solventes orgânicos) e a água, a fase aquosa (Equação 1.1). [21]

$$P = \frac{[\text{solute}]_{org}}{[\text{solute}]_{aq}} \quad \text{Equação 1.1}$$

Ou seja, o Kow mede quanto um soluto se dissolve na fase aquosa em comparação a quanto se dissolve na fase orgânica. Solutos que se dissolvem predominantemente na fase aquosa são considerados hidrofílicos e solutos que se dissolvem predominantemente na fase orgânica são considerados hidrofóbicos. Esta medida é importante para prever como os compostos se vão comportar em certos ambientes. [21] [22]

Como os líquidos iónicos não são voláteis não contribuem para a poluição atmosférica. No entanto, estes são solúveis em água e por isso o seu efeito em organismos aquáticos deve ser investigado. O coeficiente de partição é comumente usado para fazer este estudo, nomeadamente na farmacologia onde é feito o estudo da partição do fármaco entre o octanol e a água (K<sub>ow</sub>) para descrever a sua hidrofobicidade e hidrofiliabilidade. [23] [24]

## 1.3. Fármacos

Em farmácia, os fármacos classificam-se pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS). O ideal é que estes sejam altamente permeáveis e solúveis, inserindo-se na classe I. Nesta dissertação os dois fármacos alvo são o cetoprofeno e o ibuprofeno, ambos de classe II, alta permeabilidade e baixa solubilidade. [25]

O cetoprofeno (Figura 1.4), ácido (RS)-2-(3-benzoil-fenil)propanóico, de fórmula química C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, derivado do ácido propiónico é um fármaco não esteróide com efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, anti-piréticos e anti-reumáticos. É um fármaco comumente usado para tratar a artrite reumatóide aguda e crónica, osteoartrite e vários tipos de dores, incluindo no pós-parto. [26] [27] Tem uma solubilidade em água de 51 mg/L (a 22°C) [26], um peso molecular de 254,29 g/mol e apresenta uma banda de absorção a 260 nm. [27] [28]

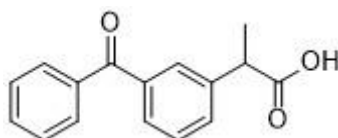


Figura 1.4 - Cetoprofeno.

O ibuprofeno (Figura 1.5), ácido 4-isobutil- $\alpha$ -metilfenilacético, de fórmula química C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub> é um derivado do ácido propiónico com efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e anti-piréticos. É

um fármaco comumente usado para tratar a febre, inchaço, dor e vermelhidão. [29] [30] Tem uma solubilidade em água de 21 mg/L (a 25°C) [30], um peso molecular de 206,29 g/mol e apresenta uma banda de absorção a 222 nm. [31]

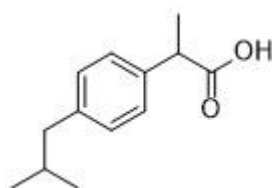


Figura 1.5 - Ibuprofeno.

Há relativamente pouco tempo foi estudada a solubilidade deste princípio ativo com líquidos iônicos. Foram utilizados vários líquidos iônicos a várias concentrações e à temperatura de 30°C. Os resultados apontam para um maior aumento da solubilidade do ibuprofeno com o [N<sub>4,4,4,4</sub>]Cl e o [P<sub>4,4,4,4</sub>]Cl. Usando a família 1-butil-3-metilimidazol, os aniões que obtiveram melhores resultados foram as dicianamidas e os tiocianatos. [31] [32]

## 1.4. Biodisponibilidade

### 1.4.1. Solubilidade

Como referido anteriormente, a solubilidade é definida em termos quantitativos como a concentração de um soluto numa solução saturada a uma certa temperatura. Esta é estudada alterando o grupo catiónico e aniónico do líquido iónico, nomeadamente a utilização de líquidos iónicos mono e dicatiónicos, a variação do tamanho da cadeia alquílica, o número de grupos hidroxietilo e o anião usado. [33] Este estudo é feito com recurso a um espetrofotómetro de UV/Visível.

### 1.4.2. Permeabilidade

A definição de permeabilidade está diretamente relacionada com a absorção intestinal do fármaco nos humanos ou indiretamente como a medida de transferência de massa deste através da membrana intestinal da pessoa. Um fármaco é considerado altamente permeável (como referido anteriormente para ambos os fármacos utilizados: cetoprofeno e ibuprofeno) quando a sua absorção pela membrana é igual ou superior a 90%. [33] Experiências *in vitro* são bastante vantajosas para avaliar a permeabilidade dos fármacos, sendo que a utilização de métodos de difusão passiva têm sido desenvolvidos para o uso com variadas membranas. Um dos métodos mais empregues baseia-se na utilização de células de Franz. Estas têm dois compartimentos, um contém a solução dadora e outro a recetora, separados por uma membrana. O ensaio é feito num banho de maneira a que o compartimento dador esteja à temperatura pretendida para o estudo e sob agitação. O tempo do ensaio é escolhido de maneira a que haja a passagem do

fármaco do compartimento dador para o recetor pela membrana e para posteriormente ser determinada a permeabilidade do fármaco. [34]

## 1.5. Toxicidade

Em estudos mais recentes, os líquidos iónicos mais comumente usados, nomeadamente os baseados nos catiões imidazol e piridínio, mostraram não ser tão favoráveis biologicamente nem ambientalmente, maioritariamente devido a não serem biodegradáveis e serem tóxicos. [20] Isto resultou no estudo mais intensivo de líquidos iónicos biocompatíveis e com uma menor toxicidade, tais como os baseados no cloreto de colina. [9]

Vários estudos foram publicados de maneira a entender melhor a biodegradabilidade, ecotoxicidade e citotoxicidade dos líquidos iónicos e a perceber a interação destes nas suas várias aplicações. Estes estudos foram realizados em linhas celulares, bactérias, fungos, crustáceos, algas, plantas e animais. [9] [35]

Como já referido anteriormente, de maneira a produzir líquidos iónicos biocompatíveis, a síntese destes com a utilização de aminoácidos, adoçantes artificiais e ácidos carboxílicos aumentou, assim como o uso da colina por ser biodegradável, pouco dispendiosa e solúvel em água. [9] Ainda em relação à biodegradabilidade destes, parâmetros como a estrutura e natureza do catião e anião desempenham um papel importante. De acordo com estudos publicados cerca de 50% dos líquidos iónicos biodegradáveis sintetizados, têm a colina como catião e um ácido orgânico como anião. Foi também verificado que a biodegradabilidade do líquido aumenta com a cadeia alquílica do anião. [9] [36]

Foi também provado que a toxicidade nos humanos diminui com a utilização de aminoácidos em comparação com o ião bromo. [35]

Líquidos iónicos muito hidrofóbicos, por exemplo os que possuem longas cadeias hidrocarbonadas ou um grupo ou anião altamente hidrofóbico, apresentam normalmente níveis mais altos de toxicidade. Isto pode dever-se à interação entre os líquidos iónicos e fragmentos de proteínas ou membranas celulares que facilitam a entrada dos líquidos iónicos nos organismos. [37] [38]

Para estudar o possível efeito citotóxico dos líquidos iónicos no corpo humano é possível fazer estudos de citotoxicidade em linhas celulares que se assemelhem ao máximo às células de humanos. A linha celular *L929* (fibroblastos de rato) é muito utilizada por esta mesma razão, estando descrita na norma ISO 10993-5 como um dos primeiros ensaios de citotoxicidade. Com a utilização destas células são feitos ensaios de viabilidade com recurso ao reagente colorimétrico MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) de maneira a determinar-se o valor de  $IC_{50}$ , correspondente à concentração de composto necessária para inibir 50% de uma função biológica específica. [39] [40]

## 1.6. Objetivos

Esta dissertação tem como objetivo a síntese de novos líquidos iónicos como solventes dos fármacos cetoprofeno e ibuprofeno, de forma a perceber qual poderá ser o melhor co-solvente para atingir a maior solubilidade possível dos princípios ativos em água sem que a toxicidade destes seja um entrave. Dado que se tratam de dois fármacos de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica <sup>[25]</sup>, a meta é deslocá-los para a classe I, alta solubilidade e alta permeabilidade.

Deste modo, a dissertação dividiu-se nos seguintes pontos:

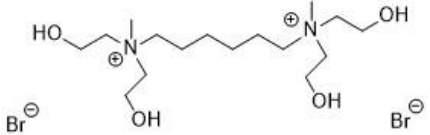
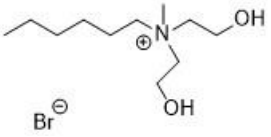
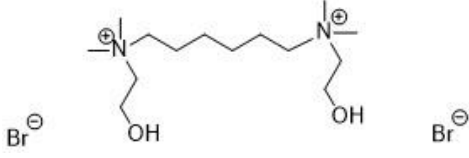
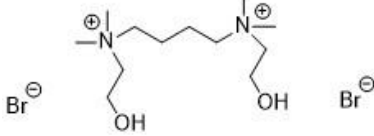
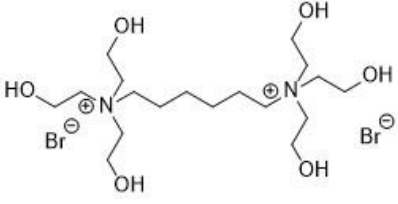
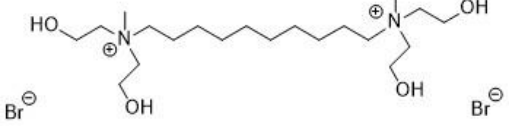
- Síntese de novos líquidos iónicos
- Avaliação da solubilidade dos fármacos na presença dos líquidos iónicos
- Avaliação da citotoxicidade dos líquidos iónicos
- Avaliação da permeabilidade e coeficiente de partição dos melhores líquidos iónicos

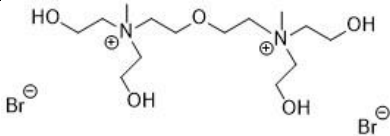
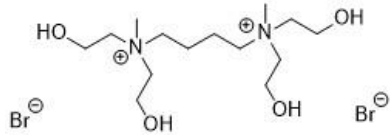
## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Síntese

Os líquidos iônicos 1, 2, 3, 4, 5, 15, 19 e 20 (Tabela 2.1) foram sintetizados, através duma reação de alquilação de uma amina terciária com um halogeneto de alquila. A síntese é feita num tubo de pressão que é colocado num banho de óleo de silicone à temperatura pretendida para a reação (descritas abaixo na síntese de cada IL), durante o tempo necessário até esta ser completa. No fim, o solvente é decantado e a solução é evaporada no rotavapor (*Büchi R-300*). O líquido iónico é seco numa linha de vácuo a 50°C e a sua pureza é confirmada por ressonância magnética nuclear.

Tabela 2.1 - Líquidos iónicos sintetizados e respetiva estrutura e massa molar.

Líquido iónico	Estrutura	Massa molar (g/mol)
1		482,30
2		284,24
3		422,25
4		394,19
5		542,35
15		538,41

19		470,24
20		454,24

### 2.1.1. Síntese de dibrometo de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamônio (1)

Foi adicionado acetonitrilo (*Carlo Erba*) como solvente a 2eq de N-metildietanolamina (*Alfa Aesar*, 98+%, MM=119,17 g/mol;  $\rho=1,040$  g/cm<sup>3</sup>) e 1eq de 1,6-dibromohexano (*Alfa Aesar*, 97+%, MM=243,97 g/mol;  $\rho=1,586$  g/cm<sup>3</sup>). A mistura reacional esteve a agitar 1 dia a 90°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo (*Carlo Erba*). O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

#### Análise por Ressonância Magnética Nuclear:

Sólido branco, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  1.45 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.83 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.19 (s, 6H, CH<sub>3</sub>N); 3.47 (t, 4H, J = 8.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.55-3.64 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.03-4.10 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz):  $\delta$  21.63, 25.06, 49.43, 55.16, 63.27, 63.43.

### 2.1.2. Síntese de brometo de N,N – di(2 – hidroxietil) – N – metil – 1 – hexanoamônio (2)

Foi adicionado hexano (*LaborSpirit*) como solvente a 1eq de N-metildietanolamina e 2eq de 1-bromohexano (*Alfa Aesar*, 99%, MM=165,08 g/mol;  $\rho=1,176$  g/cm<sup>3</sup>). A mistura reacional esteve a agitar 1 dia a 90°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo. O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

#### Análise por Ressonância Magnética Nuclear:

Líquido viscoso amarelado, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  0.89 (t, 3H, J = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.31-1.40 (m, 6H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.75-1.81 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 3.43-3.47 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.55-3.63 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.03-4.09 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz):  $\delta$  13.16, 21.58, 21.67, 25.10, 30.37, 49.41, 55.15, 63.35, 63.58.

### 2.1.3. Síntese de dibrometo de N,N' – di(2 – hidroxietil) – N,N,N',N' – tetrametil – 1,6 – hexanodiamônio (3)

Foi adicionado acetonitrilo como solvente a 2eq de 2-dimetilaminoetanol (*Sigma-Aldrich*,  $\geq 99,5\%$ , MM=89,14 g/mol;  $\rho=0,886$  g/cm<sup>3</sup>) e 1eq de 1,6-dibromohexano. A mistura reacional esteve a agitar 1 dia a 90°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo. O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

#### Análise por Ressonância Magnética Nuclear:

Sólido branco, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  1.45 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.83 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.15 (s, 12H, CH<sub>3</sub>N); 3.38-3.41 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.48-3.54 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.02-4.09 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz):  $\delta$  21.85, 25.06, 51.35, 55.35, 64.88, 65,14.

### 2.1.4. Síntese de dibrometo de N,N' – di(2 – hidroxietil) – N,N,N',N' – tetrametil – 1,4 – butanodiamônio (4)

Foi adicionado acetonitrilo como solvente a 2eq de 2-dimetilaminoetanol e 1eq de 1,4-dibromobutano (*Alfa Aesar*, 99%, MM=215,93 g/mol;  $\rho=1,820$  g/cm<sup>3</sup>). A mistura reacional esteve a agitar 1 dia a 80°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo. O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

#### Análise por Ressonância Magnética Nuclear:

Sólido branco, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  1.89 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.17 (s, 12H, CH<sub>3</sub>N); 3.46-3.55 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.04-4.08 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz):  $\delta$  19.24, 51.44, 55.34, 64.14, 65.09.

### 2.1.5. Síntese de dibrometo de N,N,N,N',N',N' – hexa(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiaminônio (5)

Foi adicionado acetonitrilo como solvente a 2eq de trietanolamina (*Carlo Erba*, MM=149,188 g/mol;  $\rho=1,13$  g/cm<sup>3</sup>) e 1eq de 1,6-dibromohexano. A mistura reacional esteve a agitar 3 dias a 90°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo. O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

### 2.1.6. Síntese de dibrometo de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,10 – decanodiamônio (15)

Foi adicionado acetonitrilo como solvente a 2eq de N-metildietanolamina e 1eq de 1,10-dibromodecano (*Alfa Aesar*, 97%, MM=300,08 g/mol;  $\rho=1,340$  g/cm<sup>3</sup>). A mistura reacional esteve

a agitar 1 dia a 90°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo. O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

Análise por Ressonância Magnética Nuclear:

Líquido viscoso amarelado, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ 1.30-1.44 (m, 12H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.80 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.19 (s, 6H, CH<sub>3</sub>N); 3.46 (t, 4H, J = 8.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.59 (s, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.06 (s, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 21.66, 25.43, 28.06, 28.25, 49.46, 55.18, 63.38, 63.58.

2.1.7. Síntese de dibrometo de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – dietiletéramônio (19)

Foi adicionado acetonitrilo como solvente a 2eq de N-metildietanolamina e 1eq de bis(2-bromoetil)éter (TCI, >98%, MM=231,92 g/mol; ρ=1,860 g/cm<sup>3</sup>). A mistura reacional esteve a agitar 1 dia a 90°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo. O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

Análise por Ressonância Magnética Nuclear:

Sólido branco, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ 3.25 (s, 6H, CH<sub>3</sub>N); 3.67 (t, 8H, J = 6.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 3.81 (t, 4H, J = 8.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.97-4.03 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 4.03-4.10 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 50.02, 55.19, 62.85, 64.33, 64.42.

2.1.8. Síntese de dibrometo de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,4 – butanodiamônio (20)

Foi adicionado acetonitrilo como solvente a 2eq de N-metildietanolamina e 1eq de 1,4-dibromobutano. A mistura reacional esteve a agitar 1 dia a 90°C. Após este tempo, foi feita a lavagem do líquido iônico com acetato de etilo. O solvente foi decantado e evaporado no rotavapor e o líquido iônico seco na linha de vácuo a 50°C.

Análise por Ressonância Magnética Nuclear:

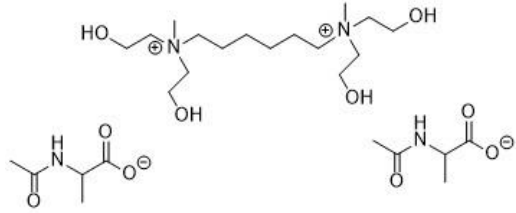
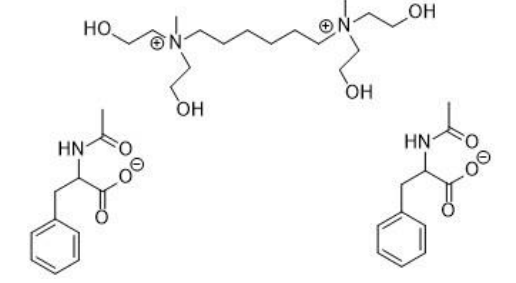
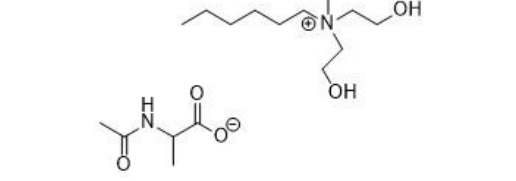
Sólido branco, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ 1.85 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.16 (s, 6H, CH<sub>3</sub>N); 3.51 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.55-3.60 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 3.99-4.06 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 19.04, 49.41, 55.13, 62.31, 63.60.

### 2.1.1. Coluna de permuta iônica

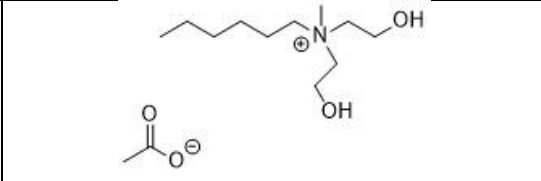
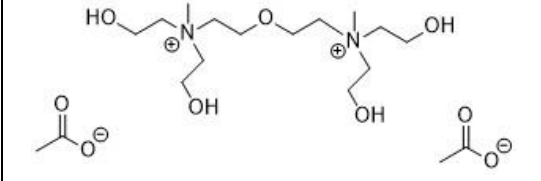
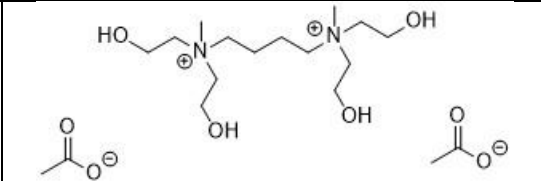
Os líquidos iônicos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 21 e 22 (Tabela 2.2) foram sintetizados a partir dos seus precursores através de uma resina de permuta aniônica (*Amberlite IRN-78, ion exchange resin, nuclear grade*). Cerca de 3/4 g do líquido iônico de partida são dissolvidos em água Milli-Q® e adicionados à coluna, onde irá ocorrer a troca do anião Br<sup>-</sup> pelo OH<sup>-</sup>. A reação de permuta aniônica termina quando o pH estiver a 7. Por fim é dissolvido o composto que dá origem ao novo anião em água Milli-Q® e adicionado à solução de hidróxido. A solução é agitada durante 1-2h e evaporada posteriormente no rotavapor.

O processo de acetilação dos aminoácidos alanina e fenilalanina passou pela adição de 10 g de DL-alanina (*Alfa Aesar, 99%*) ou DL-fenilalanina (*Alfa Aesar, 99%*), respectivamente, a 50 mL de ácido acético glacial (*Merck, 100%*) e 1,1 eq de anidrido acético (*Alfa Aesar, >99%*). A reação é feita num tubo de pressão num banho de etilenoglicol a 70°C até estar completa a dissolução do aminoácido. Por fim, o ácido acético é evaporado no rotavapor e o acetil aminoácido é lavado com acetato de etilo e seco no vácuo.

Tabela 2.2 - Líquidos iônicos sintetizados por coluna de permuta aniônica e respetiva massa molar, líquido iônico de partida e composto que origina o anião.

IL	Estrutura	Massa molar (g/mol)	Líquido iônico de partida	Composto que origina o anião
6		582,74	1	N-acetil alanina
7		734,93	1	N-acetil fenilalanina
8		334,46	2	N-acetil alanina

9		554,68	1	N-acetil glicina (Aldrich, 99%)
10		522,68	3	N-acetil alanina
11		494,63	4	N-acetil alanina
12		440,58	1	Ácido acético glacial
13		642,79	5	N-acetil alanina
14		496,69	1	Ácido butírico (Aldrich, ≥99%)
16		496,69	15	Ácido acético glacial
17		638,84	15	N-acetil alanina

18		263,38	2	Ácido acético glacial
21		428,52	19	Ácido acético glacial
22		412,52	20	Ácido acético glacial

## 2.1.2. Análise por Ressonância Magnética Nuclear dos Líquidos iônicos sintetizados por coluna de permuta aniônica

### 2.1.2.1. Diacetilalalinato de N,N' – dimetil – N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamônio (6)

Líquido viscoso amarelado,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  1.33 (d, 6H,  $J = 4.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHNHAc}$ ); 1.43 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.81 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.01 (s, 6H,  $\text{NHCOCH}_3$ ); 3.17 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.43-3.47 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.55-3.60 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.02-4.07 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.13 (q, 2H,  $J = 8.0$  Hz  $\text{CHNHAc}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz):  $\delta$  17.26, 21.59, 21.81, 25.04, 49.35, 50.84, 55.11, 63.22, 63.40, 173.28, 180.20.

### 2.1.2.2. Diacetylphenilalalinato de N,N' – dimetil – N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamônio (7)

Líquido viscoso amarelado,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  1.39 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.77 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.91 (s, 6H,  $\text{NHCOCH}_3$ ); 2.89-2.95 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ); 3.13-3.20 (m, 8H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ); 3.40-3.43 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.48-3.62 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.97-4.08 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.41-4.48 (m, 2H,  $\text{CHNHAc}$ ); 7.29-7.36 (m, 10H,  $\text{ArH}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz):  $\delta$  21.60, 21.80, 25.06, 37.65, 49.33, 55.10, 56.32, 63.21, 63.38, 126.77, 128.55, 129.21, 137.79, 173.19, 178.00.

### 2.1.2.3. Acetilalalinato de N,N – di(2 – hidroxietil) – N – metil – 1 – hexanoamônio (8)

Líquido viscoso amarelado,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.29-1.39 (m, 9H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{CH}_3\text{CHNHAc}$ ); 1.73-1.79 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.01 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ ); 3.16 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.41-3.45

(m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.52-3.61 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.01-4.07 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.17 (q, 1H, J = 8.0 Hz, CHNHAc); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 13.14, 17.35, 21.55, 21.66, 21.85, 25.09, 30.35, 49.37, 50.89, 55.12, 63.34, 63.55, 173.20, 180.20.

2.1.2.4. Diacetilglicinato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (9)

Líquido viscoso amarelado, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ 1.43 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.81 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 2.04 (s, 6H, NHCOCH<sub>3</sub>); 3.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub>N); 3.43-3.46 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.52-3.62 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 3.75 (s, 4H, CH<sub>2</sub>NHAc); 3.99-4.09 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 21.59, 21.82, 25.04, 43.27, 49.35, 55.12, 63.22, 63.40, 173.94, 176.77.

2.1.2.5. Diacetilalalinato de N,N' – di(2 – hidroxietil) – N,N,N',N' – tetrametil – 1,6 – hexanodiamónio (10)

Líquido viscoso amarelado, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ 1.32 (d, 6H, J = 4Hz, CH<sub>3</sub>CHNHAc); 1.42 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.81 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 2.00 (s, 6H, NHCOCH<sub>3</sub>); 3.13 (s, 12H, CH<sub>3</sub>N); 3.36-3.39 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.44-3.53 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 3.99-4.07 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.13 (q, 2H, J = 8.0 Hz, CHNHAc); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 17.29, 21.83, 25.05, 50.80, 51.30, 55.31, 64.85, 65.09, 173.22, 180.05.

2.1.2.6. Diacetilalalinato de N,N' – di(2 – hidroxietil) – N,N,N',N' – tetrametil – 1,4 – butanodiamónio (11)

Líquido viscoso amarelado, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ 1.32 (d, 6H, J = 4 Hz, CH<sub>3</sub>CHNHAc); 1.88 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 2.00 (s, 6H, NHCOCH<sub>3</sub>); 3.16 (s, 12H, CH<sub>3</sub>N); 3.43-3.54 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.01-4.07 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.12 (q, 2H, J = 8.0 Hz, CH<sub>3</sub>CHNHAc); <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 17.38, 19.23, 21.89, 50.93, 51.44, 55.35, 64.13, 65.11, 173.25, 180.22.

2.1.2.7. Diacetato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (12)

Sólido ceroso branco, <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): 1.43 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.82 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 1.92 (s, 6H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub>N); 3.45 (t, 4H, J = 6.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3.58 (t, 8H, J = 4.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 4.05 (s, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); δ <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100 MHz): δ 21.59, 23.26, 25.04, 49.35, 55.11, 63.22, 63.40, 181.38.

2.1.2.8. Diacetilalalinato de N,N,N,N',N',N' – hexa(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (13)

Sólido ceroso branco,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  1.34-1.43 (m, 10H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{CH}_3\text{CHNHAc}$ ); 1.81 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.02 (s, 6H,  $\text{NHCOCH}_3$ ); 3.49-3.53 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.65-3.67 (m, 12H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.03-4.05 (m, 12H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.15 (q, 2H,  $J = 6.7$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHNHAc}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz):  $\delta$  17.29, 21.32, 21.83, 24.96, 30.22, 50.85, 54.92, 60.88, 173.25, 180.17.

2.1.2.9. Dibutanoato de N, N' – dimetil – N, N, N', N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,6 – hexanodiamónio (14)

Líquido viscoso amarelado,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  0.88 (t, 6H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1.41 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.52-1.57 (m, 4H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1.80 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.14 (t, 4H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 3.15 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.41-3.45 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.51-3.62 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.97-4.11 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ )  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz):  $\delta$  13.23, 19.34, 21.60, 25.04, 39.59, 49.36, 55.11, 63.23, 63.40, 183.98.

2.1.2.10. Diacetato de N, N' – dimetil – N, N, N', N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,10 – decanodiamónio (16)

Líquido viscoso amarelado,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  1.30-1.39 (m, 12H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.77 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.91 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 3.16 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.43 (t, 4H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.56 (s, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.04 (s, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz):  $\delta$  21.59, 23.24, 25.39, 28.04, 28.23, 49.35, 55.09, 63.32, 63.51, 181.26.

2.1.2.11. Diacetilalalinato de N, N' – dimetil – N, N, N', N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,10 – decanodiamónio (17)

Líquido viscoso amarelado,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  1.29-1.41 (m, 18H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{CH}_3\text{CHNHAc}$ ); 1.78 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.01 (s, 6H,  $\text{NHCOCH}_3$ ); 3.16 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.43 (t, 4H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.53-3.60 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.01-4.07 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.13 (q, 2H,  $J = 6.7$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHNHAc}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz):  $\delta$  17.30, 21.60, 21.82, 25.40, 28.06, 28.25, 49.35, 50.90, 55.11, 63.33, 63.52, 173.24, 180.27.

2.1.2.12. Acetato de N, N – di(2 – hidroxietil) – N – metil – 1 – hexanoamónio (18)

Sólido ceroso branco,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.29-1.39 (m, 6H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.73-1.82 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.92 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 3.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.43 (t, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.54-3.59 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 4.02-4.07 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ );

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz):  $\delta$  13.41, 21.63, 23.23, 25.06, 30.33, 49.35, 55.10, 63.32, 63.53, 181.43.

2.1.2.13. Diacetato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra (2 – hidroxietil) – dietiletéramónio (21)

Líquido viscoso amarelado,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  1.88 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 3.21 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.59-3.67 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.77 (t, 4H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.92-3.99 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 4.00-4.06 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz): 23.27, 49.93, 55.11, 62.75, 64.26, 64.37, 181.30.

2.1.2.14. Diacetato de N,N' – dimetil – N,N,N',N' – tetra(2 – hidroxietil) – 1,4 – butanodiamónio (22)

Sólido ceroso branco,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  1.85 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 1.89 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 3.16 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.47-3.54 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.54-3.60 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.98-4.07 (m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz): 18.98, 23.23, 49.33, 55.08, 62,26, 63.56, 181.38.

## 2.1.2. Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica não destrutiva e onde a concentração necessária de amostra é mínima, sendo assim um método vantajoso em relação a outros. É usado para determinar o conteúdo, pureza e estrutura molecular dum composto. O princípio por trás desta técnica é que a maioria dos núcleos ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , etc) têm spin e todos os núcleos são eletricamente carregados. Quando é aplicado um campo magnético, dá-se uma transferência de energia do interior do núcleo para um estado de energia mais elevado. A transferência de energia dá-se a um comprimento de onda que corresponde a uma radiofrequência e quando o spin volta ao nível base, a energia é emitida a essa mesma frequência. O sinal que corresponde a esta transferência é medido e processado originando um espectro de RMN para os núcleos em questão. A partir do espectro é possível retirar informação acerca da composição dos grupos atômicos da molécula, dos átomos adjacentes, da dinâmica molecular e informação quantitativa que ajuda a determinar a estrutura molecular e as diferentes proporções dos diferentes compostos numa mistura. <sup>[41]</sup> <sup>[42]</sup> A Figura 1.4 mostra os desvios químicos típicos para o  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em compostos orgânicos.

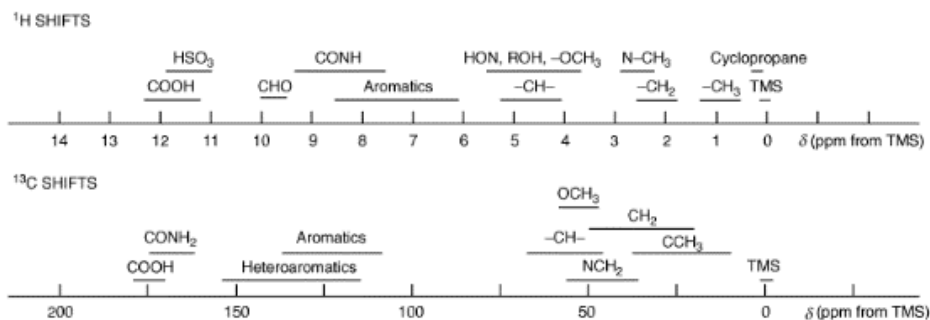


Figura 2.1 - Desvios típicos de ressonância magnética nuclear para o  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em compostos orgânicos. (Levitt, M. H. (2013).)

Estas experiências foram realizadas no Laboratório de RMN do REQUIMTE (FCT NOVA) pela Técnica Superior de Laboratório, Ana Teresa Lopes.

### 2.1.3. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) mede as temperaturas e fluxos de calor associadas às transições nos materiais como uma função de tempo e temperatura numa atmosfera controlada. A amostra é selada num cadinho, por vezes hermético, com cerca de 1-10 mg de composto. A referência é por norma um cadinho vazio selado. Cada pico no DSC é devido a uma mudança na entalpia associada a um processo físico ou químico específico, transições endotérmicas como a fusão, desnaturação da proteína, desidratação e reações de redução e transições exotérmicas como a cristalização e reações de oxidação. Existe ainda um processo denominado transição vítrea que se dá quando materiais amorfos passam ao estado líquido. [43] [44] [45] [46]

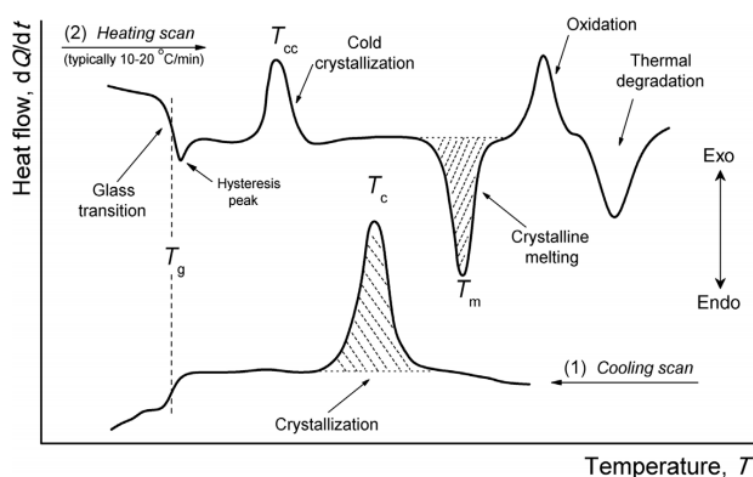


Figura 2.2 - Curvas típicas de arrefecimento (1) e aquecimento (2) da Calorimetria Diferencial de Varrimento dum polímero. (Kalogeras, I. M. (2016).)

Com o intuito de descobrir o ponto de fusão de vários líquidos iônicos que tinham um aspeto ceroso, foram realizados ensaios de DSC. Foi pesado entre 5-10 mg de líquido iónico para um cadinho hermético (*Tzero*) que foi encapsulado com uma tampa hermética (*Tzero*) que foi posteriormente furada. Todos os líquidos iônicos foram submetidos a 3 ciclos de arrefecimento e aquecimento, entre os -90°C e cerca de 30°C acima do seu ponto de fusão expectável. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Técnicas Calorimétricas sob supervisão da Prof. Madalena Dionísio (FCT NOVA).

## 2.2. Coeficiente de partição e log P

Determinaram-se as retas de calibração para ambos os fármacos numa solução de água saturada em octanol. Para o cetoprofeno pesou-se aproximadamente 1,28 mg de fármaco num balão de 25 mL e perpez-se com água saturada em octanol. Deixou-se em agitação até se dissolver todo o cetoprofeno. A partir desta solução fizeram-se cinco diluições (concentrações de 2,0, 5,1, 10,2, 12,2 e 15,3 µg/mL) de maneira a ter vários pontos na reta de calibração.

Para o ibuprofeno o processo foi idêntico sendo que na solução-mãe foi pesado 5,25 mg de fármaco num balão de 250 mL e as diluições feitas foram de 2,1, 6,3, 10,5, 13,7 e 16,8 µg/mL.

Mediu-se a absorvância no espectrofotómetro de UV/Visível das cinco diluições de cada fármaco e construíram-se as retas de calibração para cada um com  $r^2 > 0,99$  (ver em Anexos).

Para determinar o  $K_{ow}$  (coeficiente de partição n-octanol/água) e o log P dos fármacos na presença (0,1 mol%) e ausência dos líquidos iônicos foi utilizado o “*shake flask method*”. No caso dos ensaios com líquido iónico, este foi dissolvido em cerca de 1 g de água saturada em octanol, homogeneizado e adicionado a uma quantidade conhecida de fármaco. Após esta solução estar bem homogeneizada, foi adicionado cerca de 1 g de octanol saturado em água e deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante 24h. Após este tempo, o frasco foi deixado em repouso e as amostras foram sujeitas a centrifugação de maneira a haver uma completa separação entre a fase orgânica e fase aquosa. A concentração do fármaco na fase aquosa foi medida no espectrofotómetro e a concentração na fase orgânica foi retirada pela subtração da concentração na fase aquosa à concentração inicial da amostra. Os ensaios foram feitos em triplicado.

Os valores de  $K_{ow}$  e de log P foram determinados a partir das equações 2.1 e 2.2:

$$K_{ow} = \frac{[fármaco]_{oct}}{[fármaco]_{H_2O}} \quad \text{Equação 2.1}$$

$$\log P = \log K_{ow} \quad \text{Equação 2.2}$$

## 2.3. Biodisponibilidade

### 2.3.1. Retas de calibração dos fármacos

O procedimento experimental consistiu em determinar inicialmente a reta de calibração para ambos os fármacos para a temperatura pretendida para os ensaios (37°C).

No caso do cetoprofeno, pesou-se 12,8 mg de cetoprofeno (*Alfa Aesar*) num balão de 250 mL e perpez-se com água Milli-Q®. Deixou-se em agitação até se dissolver todo o cetoprofeno. A partir desta solução fizeram-se quatro diluições (concentrações de 2,0, 5,1, 10,2 e 15,3 µg/mL) de maneira a ter vários pontos na reta de calibração.

Para o ibuprofeno o procedimento experimental foi idêntico ao realizado para o cetoprofeno. Pesou-se 5,25 mg de ibuprofeno (*Alfa Aesar*, 99%) num balão de 250 mL e perpez-se com água Milli-Q®. Deixou-se em agitação até se dissolver todo o ibuprofeno. A partir desta solução fizeram-se cinco diluições (concentrações de 4,2, 8,4, 10,5, 13,4 e 16,8 µg/mL). Mediu-se a absorvância no espectrofotómetro de UV/Visível (*VWR UV-6300PC*) das diluições e construiu-se a reta de calibração para cada fármaco com  $r^2 > 0,99$  (ver em Anexos).

### 2.3.2. Testes de solubilidade

Os líquidos iónicos com a finalidade de serem utilizados no dia seguinte para testes de solubilidade foram deixados a secar na linha de vácuo a 50°C, de forma a retirar todo o solvente ou água existente. Posteriormente, o procedimento experimental consistiu em pesar para um balão volumétrico de 2 mL, cerca de 20 mg de fármaco, de forma a ter uma concentração acima do limite de solubilidade, e a quantidade de líquido iónico correspondente à percentagem molar pretendida juntamente com água Milli-Q®. Foram feitos testes a diferentes percentagens para vários líquidos iónicos. As soluções foram deixadas em agitação e a 37°C durante 24h. Após as 24h, filtrou-se as soluções em material aquecido a 37°C, diluiu-se tendo em conta a dissolução do fármaco na solução e mediu-se a sua absorvância no espectrofotómetro. A referência utilizada foi água Milli-Q® no caso do cetoprofeno e uma solução com líquido iónico em igual percentagem à da solução a ser medida no caso do ibuprofeno, de maneira a garantir que se estava apenas a medir a absorvância deste princípio ativo pois os líquidos iónicos absorvem ligeiramente na gama 190-230 nm, onde se encontra a banda de absorção do ibuprofeno. [28]

Após a medição da absorvância, utilizando a reta de calibração e tendo em conta as diluições feitas, foi calculado o valor da solubilidade em mg/L.

### 2.3.3. Permeabilidade

Os testes de permeabilidade foram feitos com 0,1 mol% de líquido iónico em cerca de 2,8 mL de água Milli-Q® e 28 mg de fármaco. Esta solução foi deixada a agitar 24h a 37°C e após as 24h foi filtrada. Os ensaios foram feitos usando células de Franz (*PermeGear*) com uma área de transferência de massa efetiva de 1 cm<sup>2</sup>, um compartimento recetor de 8 mL onde foi colocada

água Milli-Q® e um compartimento dador de 2 mL onde foi colocada a solução aquosa de líquido iônico com o fármaco. A membrana usada (*Sartorius Stedim Biotech*) foi uma membrana hidrofílica de polietersulfona (PES-U) com uma espessura de 150 µm e tamanho de poro de 0,45 µm. Foram retirados 200µL do compartimento recetor aos 0, 5, 15, 30, 45min e 1h, 1h30, 2h, 2h30 e 3h, adicionando depois água Milli-Q® até completar o volume. Após as 3h, a placa de quartzo foi lida no leitor de placas (*VICTOR Nivo™ PerkinElmer*) de 259 a 262 nm para o cetoprofeno. Os ensaios foram feitos em triplicado num banho a 37°C com uma agitação de 60 rpm. A permeabilidade (cm s<sup>-1</sup>) foi calculada através da Equação 2.3:

$$-\ln \left( 1 - 2 \frac{C_t}{C_0} \right) = \frac{2A}{V} * P * t \quad \text{Equação 2.3}^{[76]}$$

Em que C<sub>t</sub> é a concentração no compartimento recetor no tempo t, C<sub>0</sub> é a concentração inicial no compartimento dador, A é a área de transferência de massa efetiva e V é o volume total nos dois compartimentos.

A partir da Lei de Difusão de Fick foi determinado o coeficiente de difusão, D (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) dos fármacos na presença e ausência dos líquidos iónicos (Equação 2.4).

$$D = \frac{V_1 * V_2}{V_1 + V_2} * \frac{h}{A} * \frac{1}{t} \ln \left( \frac{C_f - C_i}{C_f - C_t} \right) \quad \text{Equação 2.4}^{[47]}$$

Em que V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub> são o volume no compartimento dador e recetor, respetivamente, h é a espessura da membrana, C<sub>f</sub> e C<sub>i</sub> são a concentração final e inicial, respetivamente, no compartimento recetor e C<sub>t</sub> é a concentração no compartimento recetor no tempo t.

Por fim é também possível determinar o coeficiente de partição, K<sub>d</sub> segundo a Equação 2.5, uma medida da solubilidade do soluto na membrana.

$$K_d = \frac{P * h}{D} \quad \text{Equação 2.5}^{[47]}$$

Para a reta de calibração do cetoprofeno foram pesados cerca de 1,3 mg de fármaco para um balão de 25 mL que se perpez com água Milli-Q®. Deixou-se em agitação até se dissolver todo o cetoprofeno e a partir desta solução fez-se cinco diluições (concentrações de 5,1, 12,8, 19,1, 23,0 e 25,5 mg/L) de maneira a ter vários pontos na reta de calibração. Mediu-se a absorvância no leitor de placas e construiu-se a reta de calibração (ver em Anexos).

## 2.4. Espectroscopia de UV/Visível

A espectroscopia de UV/Visível estuda a resposta de uma amostra à luz. Quando a luz passa pela solução, uma parte dela é absorvida e a restante é transmitida. A razão entre a luz que entra

na amostra ( $I_0$ ) e a que sai ( $I_t$ ) a um dado comprimento de onda é definida por transmitância (T), que é expressa por norma em percentagem (%T) multiplicando esta por 100 (equação 2.6). [48]

$$\%T = \left(\frac{I_0}{I_t}\right) * 100 \quad \text{Equação 2.6}$$

A absorvância (A) de uma amostra é o logaritmo negativo da transmitância, como representado na equação 2.7. [48]

$$A = -\log T \quad \text{Equação 2.7}$$

Além do aparelho utilizado, também devem ser tidos em conta as cuvettes e os solventes. As cuvettes de quartzo são mais indicadas para utilização pois as de vidro ótico transmitem acima de 320nm enquanto que as de quartzo transmitem abaixo de 190nm, o comprimento de onda mínimo usual dos espectrofotômetros de UV/Visível (Figura 2.3). [48]

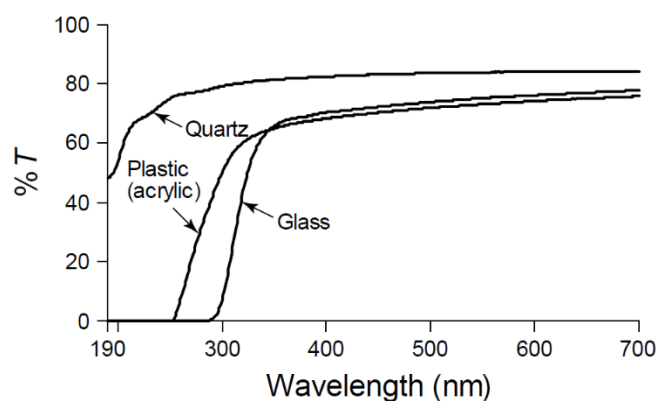


Figura 2.3 - Características da transmissão da luz de diferentes tipos de materiais de cuvettes. (Upstone, S. L. (2006).)

Existem também *cuvettes* de plástico descartáveis feitas de poliestireno e acrílico. Estas não necessitam de lavagem entre amostras, o que pode muitas vezes ser uma mais valia, mas têm como desvantagem um intervalo de comprimento de onda restrito e um baixo desempenho ótico.

Como solvente, a água é o mais utilizado devido ao seu intervalo amplo de comprimentos de onda e devido a ter o menor *cutoff* dos mesmos. [48] Quando um dos compostos da amostra que estamos a analisar absorve na zona de interesse, deve fazer-se um branco com tudo o que a amostra a analisar contém, menos o composto de interesse.

Existem espectrofotômetros de um ou dois feixes, sendo que este último pode ter dois detetores ou apenas um. O mesmo encontra-se representado na Figura 2.4.

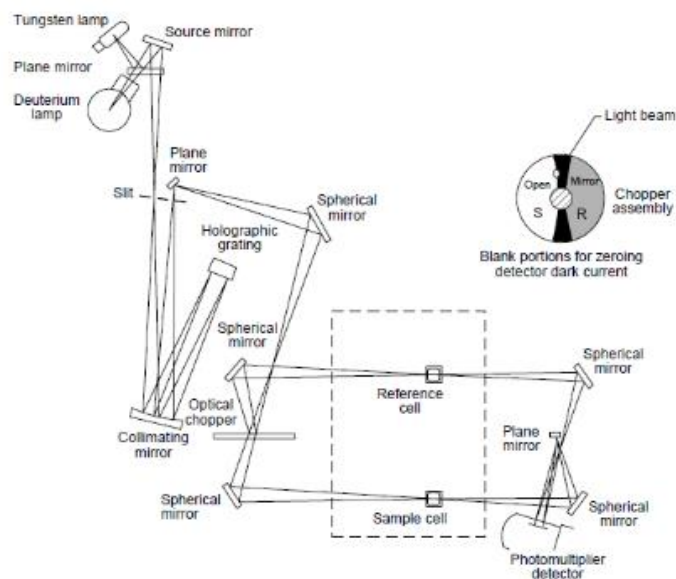


Figura 2.4 - Esquema de um espectrofotômetro de feixe duplo. (Upstone, S. L. (2006).)

## 2.5. Citotoxicidade

As células utilizadas nos ensaios foram as L929 e o meio utilizado foi MEM (Meio mínimo essencial, *Corning®*) com 10% de FBS (Soro fetal de bovino, *Corning®*) e 1% de PS (Penicilina-Estreptomicina).

### 2.5.1. Sub-cultura de células

As células devem atingir uma confluência de 80-90%. Ao atingirem esta percentagem de confluência na superfície, devem ser sub-cultivadas.

O sobrenadante é removido, a parede do frasco é lavada com uma pequena quantidade de PBS (*Tampão fosfato salino*), a tripsina (*Corning®*) é adicionada até cobrir totalmente a parede e o frasco é incubado a 37°C durante 5-10 minutos. Quando as células começarem a emergir, retira-se o frasco e se for necessário bate-se nas paredes deste para as células desaderirem. Adiciona-se um volume de meio adequado à área do frasco (Tabela 2.3) para inativar a enzima. Ressuspende-se as células contra a parede do frasco até a cultura celular estar homogênea. Transfere-se para um tubo de *Falcon* e centrifuga-se 10 minutos a 200g (*HERMLE*). Após a centrifugação remove-se o sobrenadante, ressuspende-se o *pellet* em meio de acordo com a diluição pretendida e transfere-se para um novo frasco com a quantidade necessária de meio.

Tabela 2.3 - Volume de tripsina e meio recomendado para a área do frasco.

Área frasco (cm <sup>2</sup> )	Volume tripsina (mL)	Volume meio (mL)	Volume final (mL)
25	1-3	7-10	10
75	2.5-5	5-7.5	15
150	7-15	15-23	30

## 2.5.2. Contagem de células

Após as células serem tripsinizadas e centrifugadas como descrito no passo 2.5.1. ressuspende-se as células em 3 mL de meio e transfere-se 100-200 µL da suspensão de células para um *Eppendorf*. Retira-se 20 µl desta suspensão, adiciona-se 180 µl de *trypan blue* e adiciona-se à Câmara de *Neubauer*. Faz-se a contagem das células ao microscópio e calcula-se a concentração através da Equação 2.8:

$$\text{Concentração células} = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{número de quadrados}} * \text{fator diluição} * 10000 \quad \text{Equação 2.8}$$

## 2.5.3. Ensaio de citotoxicidade em cultura 2D

### 2.5.3.1. Preparação da placa

Após ser feita a passagem (passo 2.5.1.) e a contagem das células (passo 2.5.2.), prepara-se o inóculo de modo a ter-se  $1 \times 10^5$  células/mL. Cada placa de 96 poços terá um volume final de 6mL, então no cálculo do volume final deve ser incluído um volume de 2mL considerando o erro.

$$V_i * c_i = V_f * c_f \quad \text{Equação 2.9}$$

$$V_i * \text{concentração células} = V_f * \text{concentração inóculo} \quad \text{Equação 2.10}$$

Coloca-se meio numa banheira tendo em conta os cálculos ( $V_f - V_i$ ) e adiciona-se o inóculo calculado ao meio. Adiciona-se 100 µL da mistura a cada poço e 100 µL de água estéril aos poços periféricos. Incuba-se 24h a 37°C com uma percentagem de CO<sub>2</sub> de 5%.

### 2.5.3.2. Preparação extrato/compostos

A experiência deve ser feita em triplicados, ou seja, para cada diluição do composto são utilizados três poços. São então precisos 300 µL por diluição.

Como os líquidos iónicos são solúveis em MEM, não necessitam de ser diluídos em nenhum solvente e o controlo é feito apenas com meio. A cada poço são adicionados 100 µL da correspondente diluição de acordo com o esquema representado na Figura 2.5 e aos poços periféricos é adicionada água. A placa é incubada 24h a 37°C com uma percentagem de 5% de CO<sub>2</sub>.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Controlo										
C						Amostra 1						
D			- Concentrado						+ Concentrado			
E											Controlo	
F						Amostra 2						
G		+ Concentrado							- Concentrado			
H												

Figura 2.5 - Esquema de inoculação numa placa de 96 poços.

### 2.5.3.3. Ensaio de viabilidade

O MTS é um reagente colorimétrico solúvel em água e sensível à luz por isso este ensaio é feito com a luz da câmara de fluxo laminar desligada. A diluição utilizada deste reagente é 1:10 em meio a uma concentração de 16%.

É removido o conteúdo da placa invertendo esta para papel embebido em etanol. Os poços são lavados com 100 µL PBS e este é removido também para papel embebido em etanol. Pipeta-se 100 µL da solução de reagente para cada poço e aos poços periféricos é adicionada água. A placa é incubada 2h30-3h a 37°C com uma percentagem de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo é lida no leitor de placas (*VICTOR Nivo™ PerkinElmer*) a 490 nm.

### 2.5.4. Tratamento de dados

Após leitura da placa, os dados são recolhidos e tratados no programa *GraphPad Prism 7*. Neste, é possível retirar o valor de IC<sub>50</sub> do líquido iónico bem como os dados estatísticos.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Síntese dos líquidos iônicos

Todos os líquidos iônicos foram sintetizados e posteriormente caracterizados por RMN e alguns por DSC.

A síntese, como referido anteriormente, dá-se pela reação de alquilação de uma amina terciária com um halogeneto de alquilo. Após a reação ser completa, o solvente foi decantado e a solução evaporada no rotavapor. O líquido iônico após ser seco na linha de vácuo a 50°C foi caracterizado por ressonância magnética nuclear.

##### 3.1.1. Caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN)

A caracterização dos líquidos iônicos por RMN foi feita num espectrómetro de 400 MHz. Para o líquido iônico 1, colocamos como exemplo os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , que se encontram representadas nas figuras 3.1 e 3.2, respetivamente.

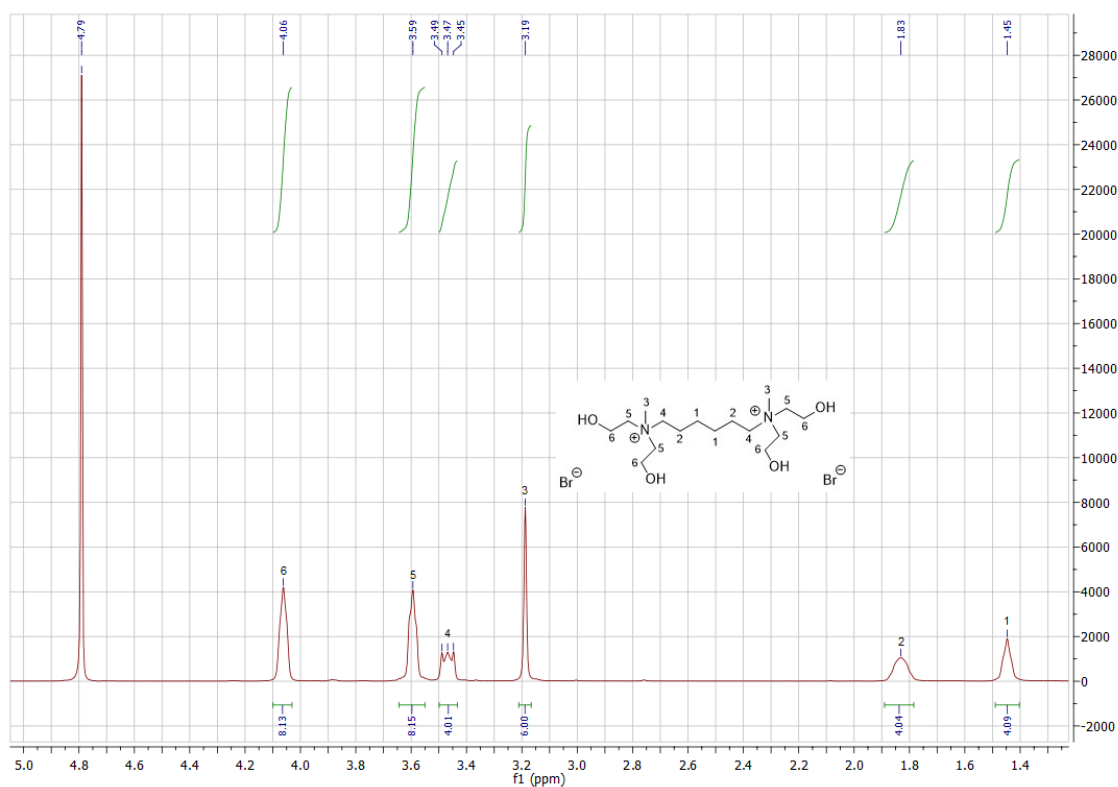


Figura 3.1 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(N_{1,2OH_2OH})_2C_6]Br_2$  (1) em  $D_2O$ .

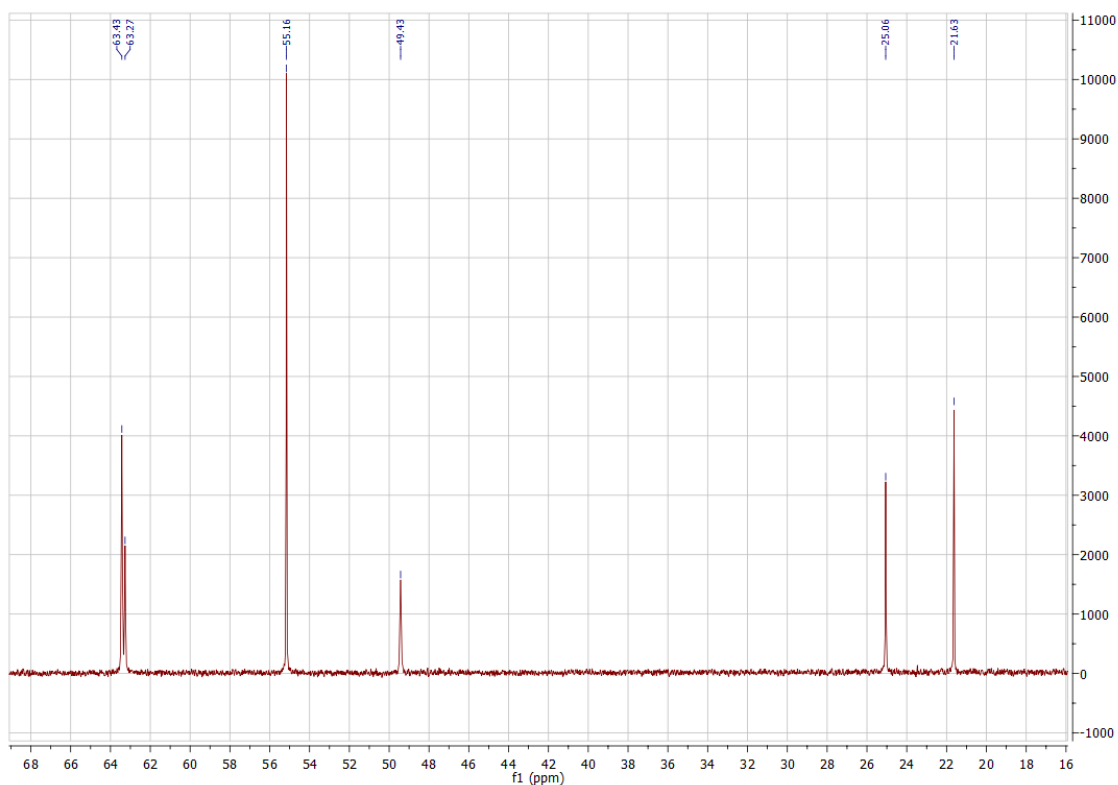


Figura 3.2 - Espetro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_{2}\text{OH})_2\text{C}_6]\text{Br}_2$  (1) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Pela Figura 3.1 é possível observar um singlete amplo a  $\delta$  1.45 que representa quatro prótons da cadeia alquílica ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) representados pelo número 1. A  $\delta$  1.83 (2) encontra-se outro singlete ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ). A  $\delta$  3.19 (3) está um singlete dos seis prótons correspondentes aos grupos metil ( $\text{CH}_3\text{N}$ ). A  $\delta$  3.47 (4) encontra-se um tripleto que representa os quatro prótons dos metilenos ligados aos átomos de azoto da cadeia alquílica ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ). Por fim temos dois multipletos que representam os 16 prótons dos quatro grupos 2-hidroxietilo: oito a  $\delta$  3.55-3.64 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) e os outros oito a  $\delta$  4.03-4.10 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ). Por  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 3.2) conseguimos observar os desvios  $\delta$  21.63, 25.06, 49.43, 55.16, 63.27, 63.43.

A caracterização é feita para todos os líquidos iônicos (ver em Anexos) de maneira a estudar o seu estado de pureza.

Todos os líquidos iônicos apresentaram-se solúveis em  $\text{D}_2\text{O}$  (água deuterada) e por isso este foi o solvente utilizado para esta experiência. A água deuterada apresenta um pico residual que é visível nos espectros de  $^1\text{H}$  RMN a  $\delta$  4.79. [49]

### 3.1.2. Caracterização por Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

Após síntese dos líquidos iônicos, alguns demonstraram um aspeto ceroso. Por esta razão foram feitos ensaios de Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) de maneira a determinar a sua temperatura de fusão e confirmar se estaria abaixo de 100°C (temperatura máxima para um composto ser denominado líquido iónico). Os líquidos iónicos testados foram o 6, 12, 13, 16, 18 e 22 e os valores da temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e temperatura de cristalização ( $T_c$ ) determinados encontram-se representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Compostos testados por DSC e respetivas temperaturas de fusão, de transição vítrea e de cristalização.

Líquido iónico	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)
$[(N_{12}OH_2)C_6][AcAla]_2$ (6)	108,23	Não apresenta	Não apresenta
$[(N_{12}OH_2)C_6][CH_3CO_2]_2$ (12)	89,18	-35,75	Não apresenta
$[(N_{13}OH_3)C_6][AcAla]_2$ (13)	107,80	-76,32	Não apresenta
$[(N_{16}OH_2)C_{10}][CH_3CO_2]_2$ (16)	83,19	-37,61	Não apresenta
$[N_{18}OH_2][CH_3CO_2]_2$ (18)	48,13	-64,50	-18,31
$[(N_{22}OH_2)C_4][CH_3CO_2]_2$ (22)	148,41	-49,39	Não apresenta

Os compostos 12, 16 e 18 apresentam temperaturas de fusão inferiores a 100°C podendo assim ser considerados líquidos iónicos. Podemos também observar que o  $[(N_{22}OH_2)C_4][CH_3CO_2]_2$  (22) possui uma temperatura de fusão consideravelmente superior a 100°C, sendo excluído da denominação de líquido iónico e não fazendo assim parte do objetivo do trabalho, apesar dos bons resultados de solubilidade e citotoxicidade. Os compostos 6 e 13 após estes ensaios deixaram também de ser considerados líquidos iónicos pois, apesar de pouco, a sua temperatura de fusão encontra-se acima dos 100°C.

Todos os compostos apresentaram temperatura de transição vítrea, à exceção do líquido iónico 6. Esta dá-se no aquecimento quando a amostra passa do estado amorfo ao estado líquido. O líquido iónico 18 apresentou ainda um pico exotérmico no aquecimento que é originado quando uma amostra está no estado líquido abaixo da sua temperatura de fusão e passa ao estado cristalino, denominada temperatura de cristalização fria. <sup>[43]</sup>

Nas figuras seguintes (3.3 e 3.4) encontram-se representados os gráficos resultantes dos ensaios de Calorimetria Diferencial de Varrimento dos líquidos iónicos 12 e 16, respetivamente.

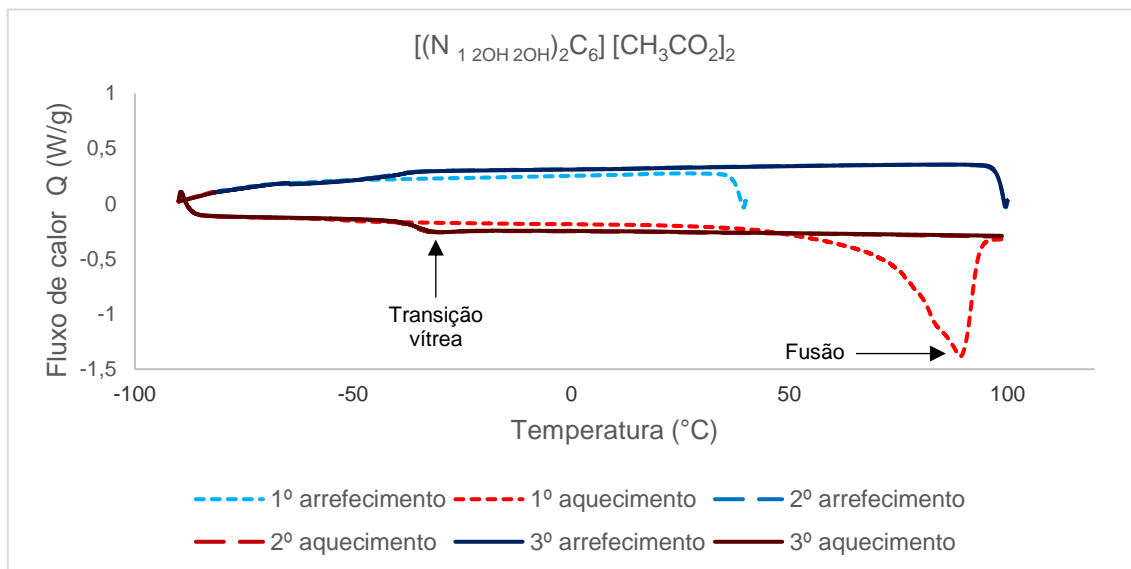


Figura 3.3 - Termograma obtido para o líquido iônico  $[(N_{1,2OH})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  (12) e respetivos ciclos.

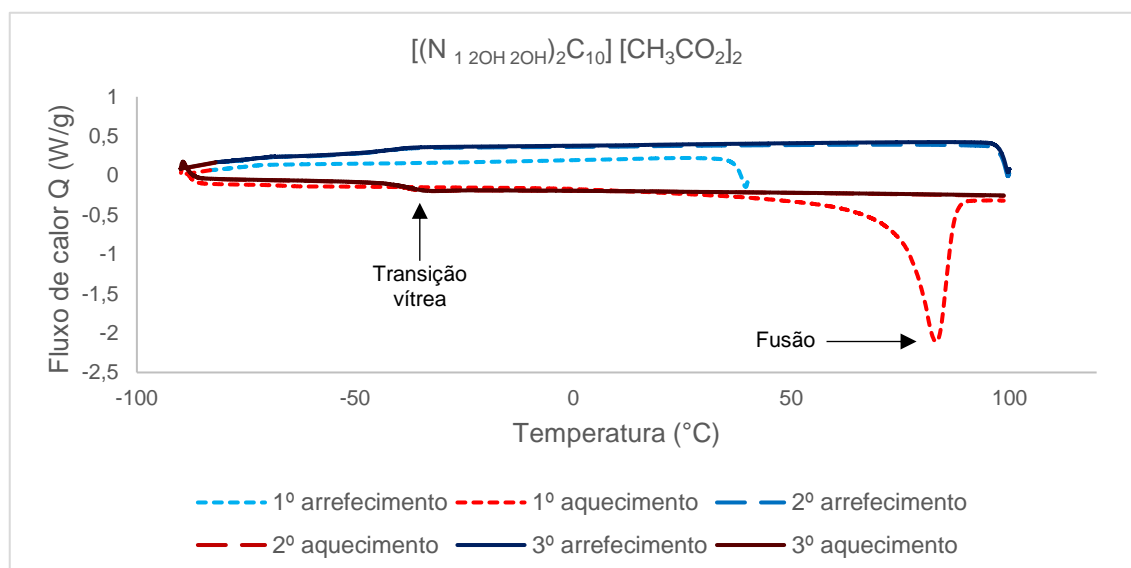


Figura 3.4 - Termograma obtido para o líquido iônico  $[(N_{1,2OH})_2C_{10}][CH_3CO_2]_2$  (16) e respetivos ciclos.

Para ambos os líquidos iônicos é possível observar o pico da temperatura de fusão quando se faz o aquecimento até aos 100°C no 1º ciclo, a 89,18°C para o líquido iônico 12 e a 83,19°C para o líquido iônico 16. Nos ciclos 2 e 3, também no aquecimento, os líquidos iônicos apresentaram uma transição vítrea por volta dos -35°C. Nenhum dos dois apresentou pico de cristalização.

### 3.2. Coeficiente de partição (log P)

O coeficiente de partição (log P) é importante para saber como os compostos se vão comportar em certos ambientes [21] [22], sendo muito utilizado em farmacologia para perceber como os fármacos se vão distribuir no corpo humano. Como referido anteriormente, o cetoprofeno e o ibuprofeno são fármacos de classe II, tendo assim uma baixa solubilidade e uma alta permeabilidade. [25] Como estes fármacos são de administração oral, têm de ser permeáveis para passar as bicamadas lipídicas do epitélio intestinal. É assim necessária uma certa lipofilicidade para passar esta bicamada, mas também hidrofiliicidade para não sair. Segundo a literatura o cetoprofeno possui um log P de 3.12 [50] e o ibuprofeno de 3.97 [50] e este deve estar idealmente entre 0 e 3 [51], de maneira a que estes sejam mais hidrofílicos.

Foram determinados os valores de log P de ambos os fármacos com o líquido iónico 12  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  a 0,1 mol% recorrendo ao “*shake flask method*”.

O valor do log P do ibuprofeno em água não foi possível de determinar porque não houve separação da fase aquosa da fase do octanol (apresentava três fases) e por isso foi considerado o valor da literatura. Os valores de log P determinados do cetoprofeno e dos fármacos com o líquido iónico encontram-se representados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores de log P do cetoprofeno e ibuprofeno com e sem líquido iónico.

Composto	Log P
Cetoprofeno	2,70
Ibuprofeno	3,97 [50]
Cetoprofeno + $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6][CH_3CO_2]_2$ 0,1 mol%	0,39 ± 0,04
Ibuprofeno + $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6][CH_3CO_2]_2$ 0,1 mol%	1,28 ± 0,08

O valor de log P do cetoprofeno determinado experimentalmente revelou-se um pouco mais baixo que o da literatura.

Ao utilizar o líquido iónico 12 conseguiu baixar-se o valor de log P de ambos os fármacos tornando-os assim mais hidrofílicos como era o objetivo e ficando no intervalo recomendado de  $0 < \log P < 3$ .

### 3.3. Biodisponibilidade

Um grande desafio da produção de fármacos é a sua biodisponibilidade. A biodisponibilidade oral depende de fatores como a solubilidade em água, permeabilidade do fármaco, taxa de dissolução, metabolismo de primeira passagem e suscetibilidade a mecanismos de efluxo. As causas mais comuns da baixa biodisponibilidade são a baixa solubilidade e baixa permeabilidade do fármaco. [52]

Por estas razões foi feito o estudo da solubilidade dos fármacos com os líquidos iónicos, assim como da sua permeabilidade.

### 3.3.1. Solubilidade

As soluções, após serem deixadas em agitação e a 37°C durante 24h, foram filtradas e medidas no espectrofotômetro contra uma referência apenas de água no caso do cetoprofeno e de líquido iônico com água Milli-Q®, no caso do ibuprofeno. A partir do valor de absorvância retirado do espectro e utilizando o valor do declive da reta de calibração é possível retirar o valor de solubilidade do líquido iônico pretendido, tendo em conta as diluições feitas para a medição no espectrofotômetro. Por comparação ao valor obtido de solubilidade dos fármacos (a 37°C na ausência de líquido iônico) determinado experimentalmente, 187,63 mg/L para o cetoprofeno e 60,44 mg/L para o ibuprofeno, é feito o estudo do aumento da solubilidade com recurso aos líquidos iônicos sintetizados.

O valor da solubilidade em mg/L de todos os líquidos iônicos que foram possíveis de medir encontra-se representado na Figura 3.5 para o cetoprofeno e na Figura 3.6 para o ibuprofeno.

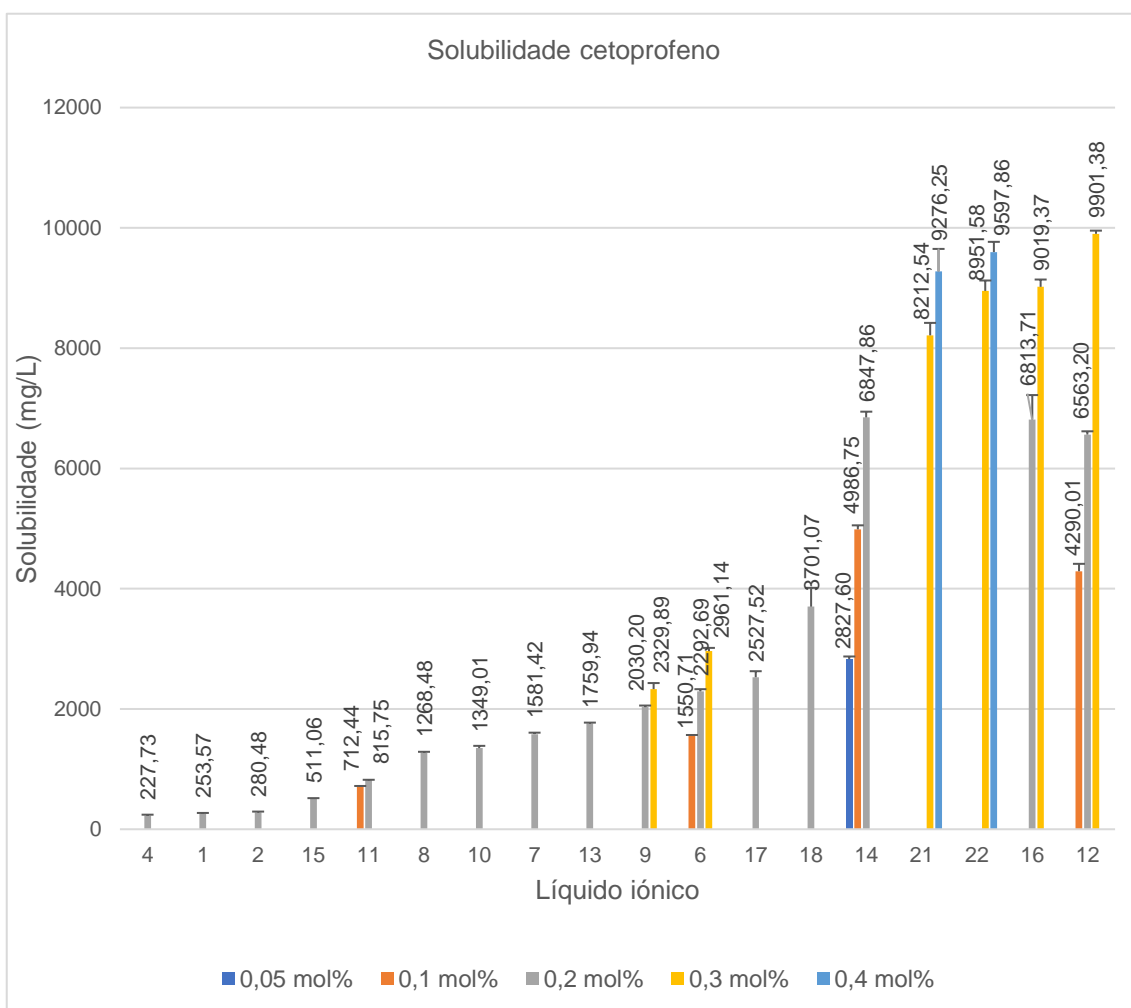


Figura 3.5 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iônicos que melhoraram a solubilidade do cetoprofeno.

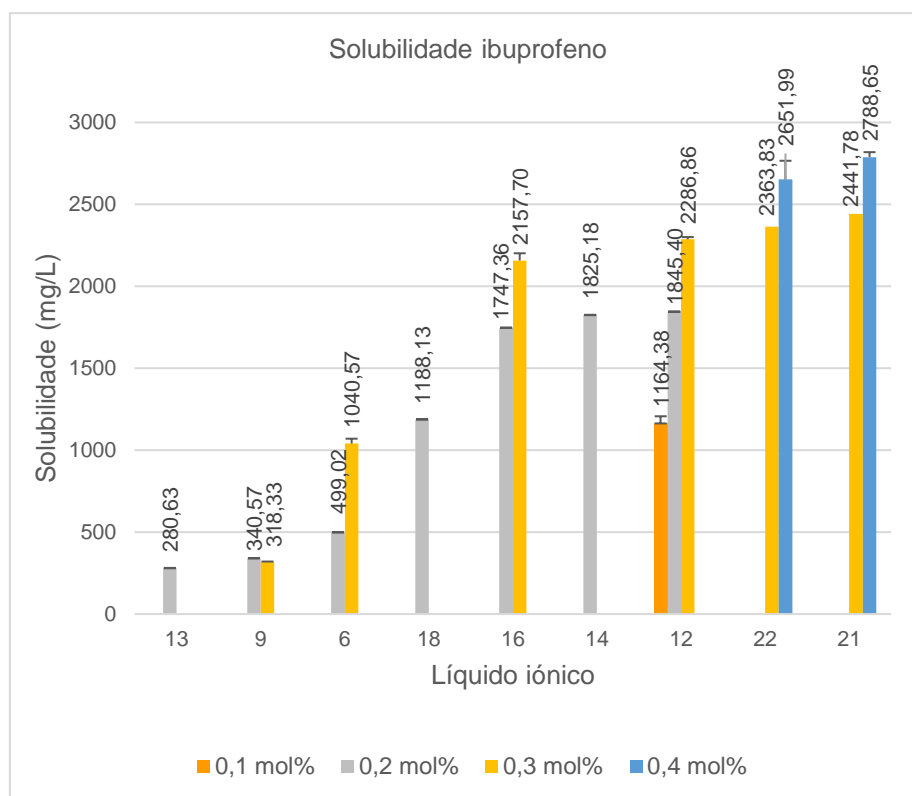


Figura 3.6 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iônicos que melhoraram a solubilidade do ibuprofeno.

Houve ainda alguns líquidos iônicos que não tiveram qualquer efeito na solubilidade ao serem testados com o ibuprofeno. É o caso dos líquidos iônicos 1 ( $[(N_{12OH_{20H}})_2C_6] Br_2$ ) e 17 ( $[(N_{12OH_{20H}})_2C_{10}] [AcAla]_2$ ), ambos testados a 0,2 mol%.

### 3.3.1.1. Efeito do tamanho da cadeia alquílica do catião

A partir do catião colina foram feitas alterações nas suas cadeias alquílicas, alternando entre um grupo éter, quatro, seis e dez carbonos no *linker* nos líquidos iônicos dicatiónicos e também nas cadeias alquílicas no caso dos monocatiónicos. Utilizando o mesmo anião é possível perceber qual é o efeito da alteração do tamanho do *linker* do catião em ambos os fármacos.

Com o cetoprofeno foram feitos vários estudos que se encontram representados nas figuras 3.7 e 3.8.

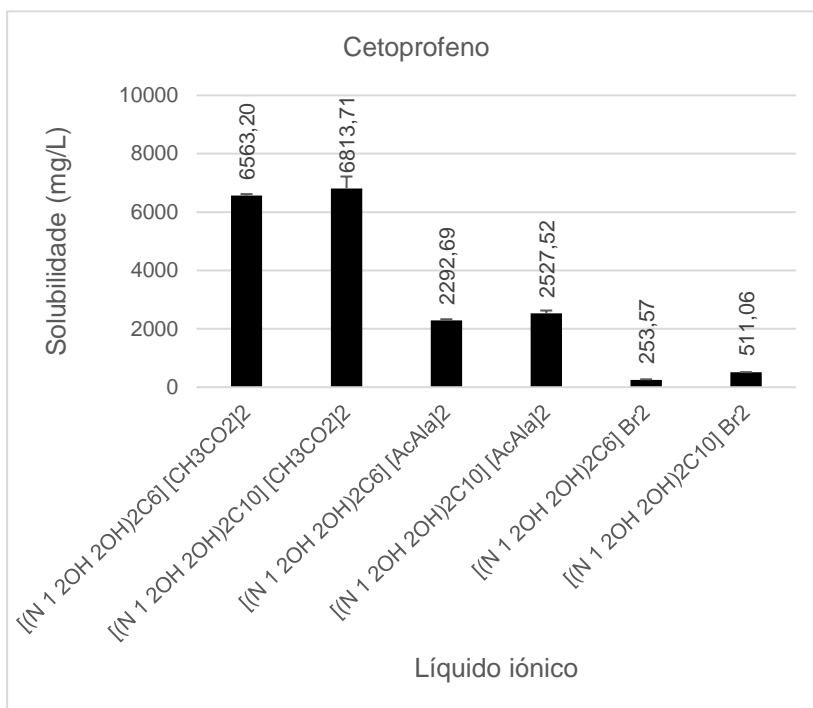


Figura 3.7 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_{10}][CH_3CO_2]_2$  (16) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6][CH_3CO_2]_2$  (12),  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_{10}][AcAla]_2$  (17) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6][AcAla]_2$  (6) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_{10}] Br_2$  (15) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] Br_2$  (1), todas a 0,2 mol% para o cetoprofeno.

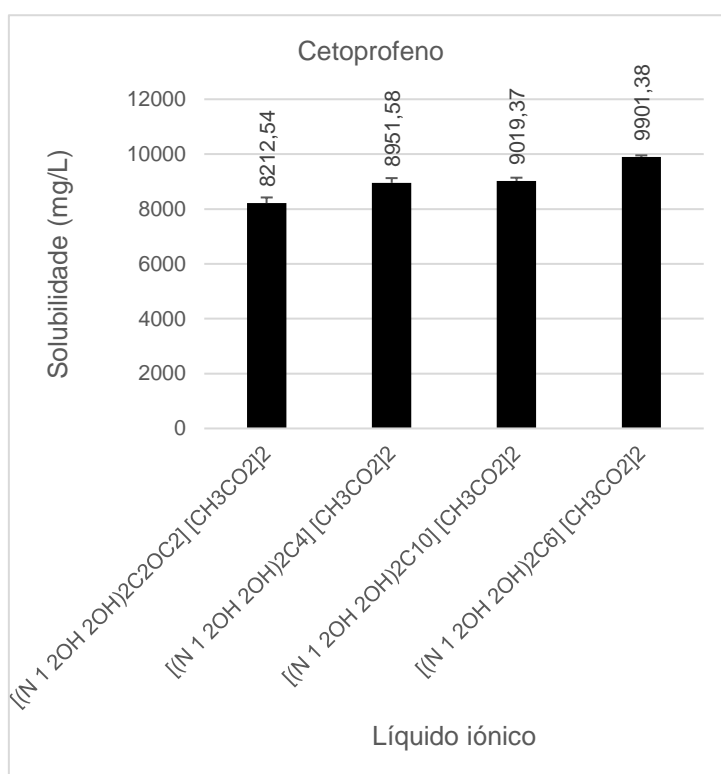


Figura 3.8 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6][CH_3CO_2]_2$  (12),  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_{10}][CH_3CO_2]_2$  (16),  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_4][CH_3CO_2]_2$  (22) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_2OC_2][CH_3CO_2]_2$  (21), todos a 0,3 mol% para o cetoprofeno..

É possível observar que a relação entre o aumento do *linker* e o aumento/diminuição do valor de solubilidade nem sempre é igual. Na Figura 3.5 a 0,2 mol% é possível observar que um *linker* de dez carbonos apresenta maior valor de solubilidade que um *linker* de seis carbonos, apesar da diferença não ser significativa, para os diferentes aniões. Quando se estudou a relação entre os quatro tipos de *linker* com o cetoprofeno a 0,3 mol% de líquido iónico (Figura 3.6), a utilização de seis carbonos aumentou mais o valor da solubilidade que a utilização de dez carbonos. No entanto pode-se afirmar que o *linker* de seis e dez promove uma melhor solubilidade quando comparamos com o *linker* de quatro ou quando se tem um grupo éter.

Para o ibuprofeno foram feitos dois estudos, a 0,2 e 0,3 mol% de líquido iónico, representados nas Figuras 3.9 e 3.10, respetivamente.

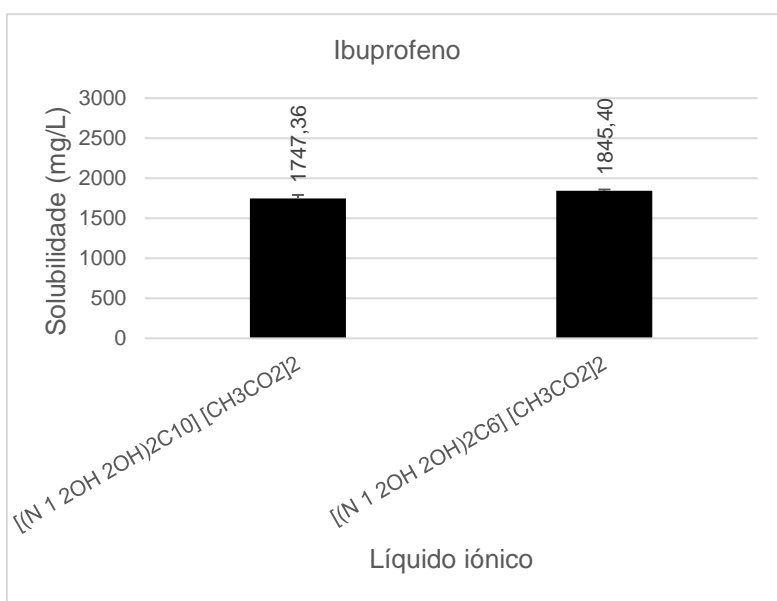


Figura 3.9 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N-1,2OH)2C6][CH3CO2]2$  (12) e  $[(N-1,2OH)2C10][CH3CO2]2$  (16), ambos a 0,2 mol% para o ibuprofeno.

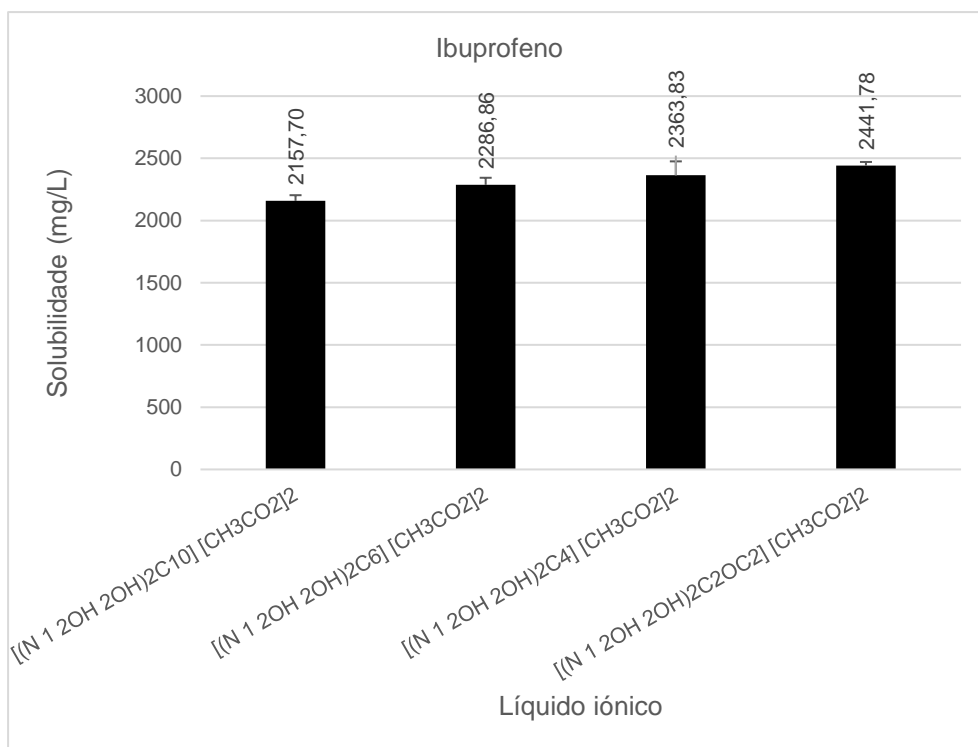


Figura 3.10 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iônicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_2OC_2] [CH_3CO_2]_2$  (21),  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_4] [CH_3CO_2]_2$  (22),  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [CH_3CO_2]_2$  (12) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_{10}] [CH_3CO_2]_2$  (16), todos a 0,3 mol% para o ibuprofeno.

No caso deste fármaco, o *linker* com a cadeia éter e com a cadeia alquílica de quatro carbonos apresentou valores de solubilidade superiores aos *linkers* de seis ou dez carbonos. No entanto os valores não são muito diferentes entre eles.

### 3.3.1.2. Efeito do número de grupos 2-hidroxietilo do catião

Outro fator que se estudou na solubilidade dos fármacos, foi o número de grupos 2-hidroxietilo do catião colina. Foram utilizados líquidos iônicos dicatiónicos em que apenas se alternou entre quatro e seis grupos 2-hidroxietilo no caso do cetoprofeno (Figura 3.11) e dois, quatro e seis grupos 2-hidroxietilo no caso do ibuprofeno (Figura 3.12).

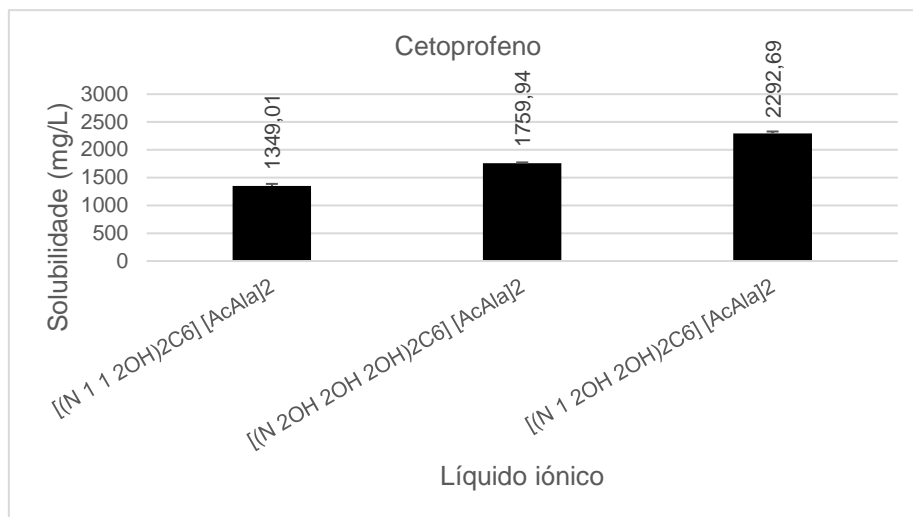


Figura 3.11 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [AcAla]_2$  (6),  $[(N 2OH 2OH 2OH)_2C_6] [AcAla]_2$  (13) e  $[(N 1 1 2OH)_2C_6] [AcAla]_2$  (10), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno.

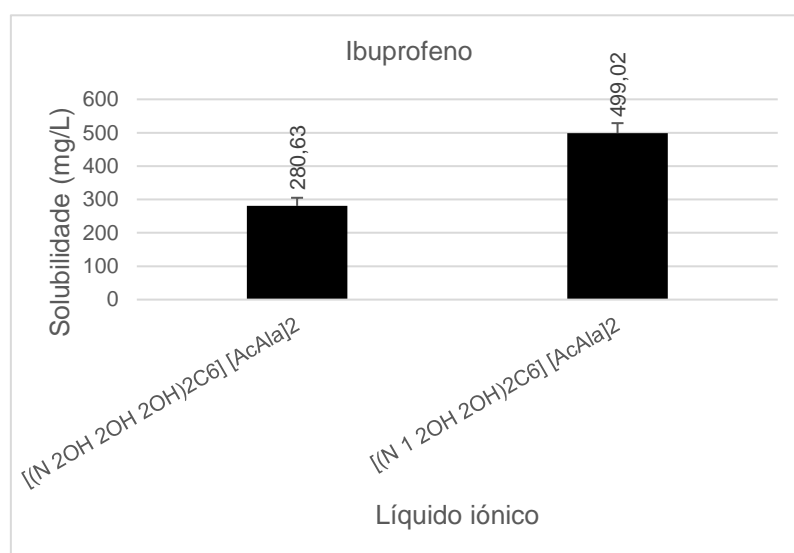


Figura 3.12 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [AcAla]_2$  (6) e  $[(N 2OH 2OH 2OH)_2C_6] [AcAla]_2$  (13), ambos a 0,2 mol% para o ibuprofeno.

Para ambos os fármacos o número de grupos 2-hidroxietilo que aumentou mais o valor de solubilidade foi de quatro, podendo ainda observar-se pelo gráfico referente ao cetoprofeno (Figura 3.10) que a utilização de dois grupos 2-hidroxietilo é a menos favorável em termos de solubilidade. Quando o líquido iónico dicatiónico tem seis grupos 2-hidroxietilo formam-se muitas pontes de hidrogénio entre o líquido iónico e a água, o que pode impedir a interação fármaco-líquido iónico. [53]

### 3.3.1.3. Efeito da alteração do anião

Apenas alterando o anião do líquido iônico é possível ainda estudar o efeito deste no valor de solubilidade. Foram estudados os aniões bromo, acetil aminoácidos e ácidos carboxílicos devido a ter sido reportado em vários estudos que estes dois últimos principalmente apresentam valores de citotoxicidade favoráveis. [9] [16]

Para o ibuprofeno foram estudados dois acetil aminoácidos, a acetil alanina e a acetil glicina, e dois ácidos carboxílicos, o ácido acético e o ácido butírico, como representado na Figura 3.13.

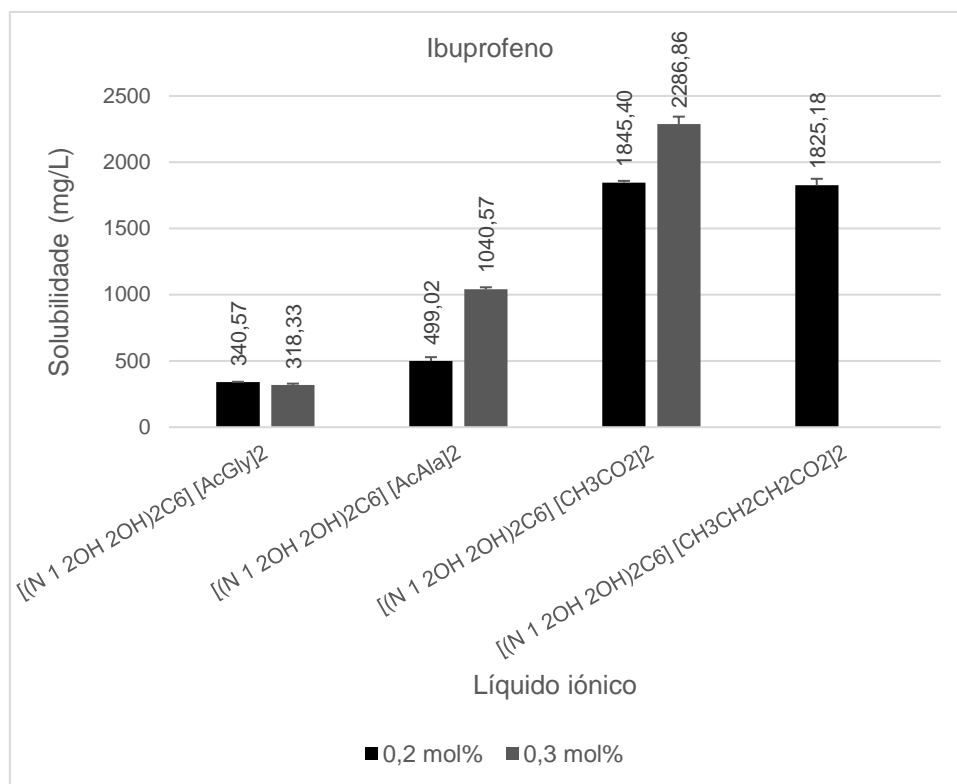


Figura 3.13 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iônicos  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6][AcGly]_2$  (9),  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6][AcAla]_2$  (6) e  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  (12), a 0,2 e 0,3 mol% e o líquido iônico  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6][CH_3CH_2CH_2CO_2]_2$  (14) a 0,2 mol%, todos para o ibuprofeno.

Desde logo é possível concluir que, para ambas as percentagens molares, os ácidos carboxílicos aumentam o valor da solubilidade consideravelmente em relação aos acetil aminoácidos, sendo que a acetil alanina apresenta melhores resultados que a acetil glicina.

Para o cetoprofeno foi também estudado o anião bromo e acetil fenilalanina, para além dos anteriores. Os resultados encontram-se representados nas figuras 3.14, 3.15 e 3.16.

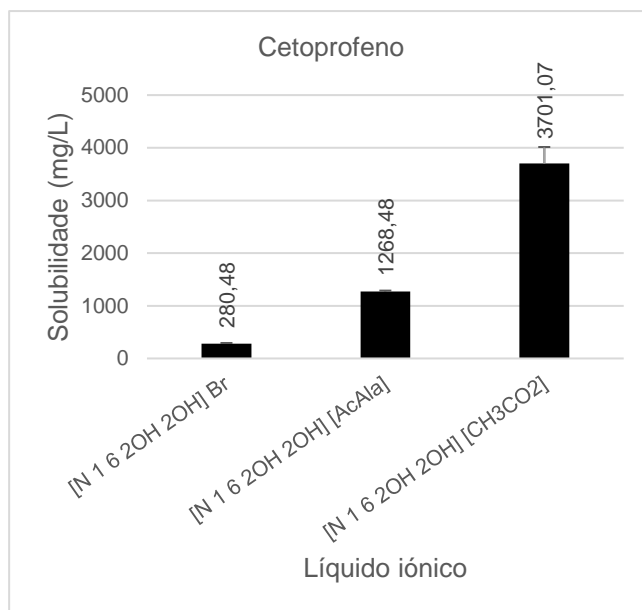


Figura 3.14 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[N_{1,6}2OH,2OH] [CH_3CO_2]$  (18),  $[N_{1,6}2OH,2OH] [AcAla]$  (8) e  $[N_{1,6}2OH,2OH] Br$  (2), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno.

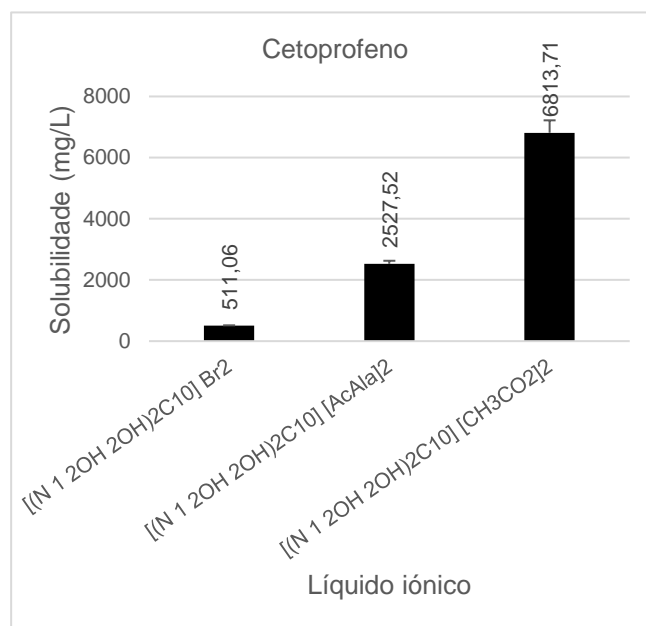


Figura 3.15 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N_{1,2}2OH,2OH)_2C_{10}] [CH_3CO_2]_2$  (16),  $[(N_{1,2}2OH,2OH)_2C_{10}] [AcAla]_2$  (17) e  $[(N_{1,2}2OH,2OH)_2C_{10}] Br_2$  (15), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno.

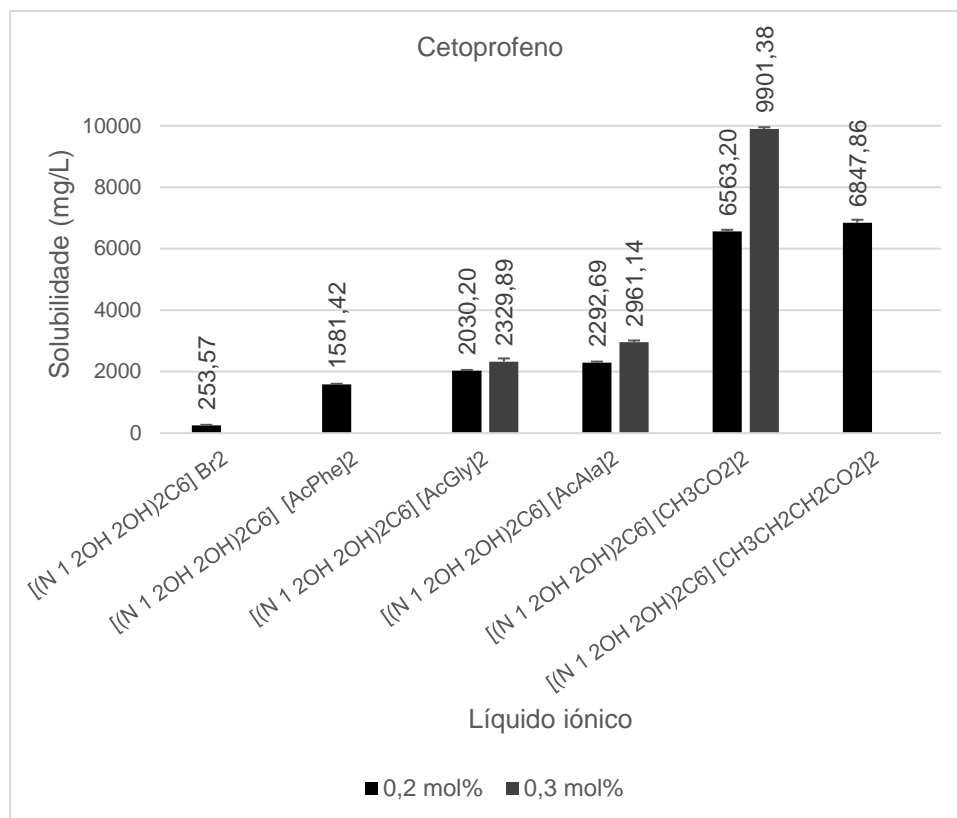


Figura 3.16 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] Br_2$  (1),  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [AcPhe]_2$  (7) e  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [CH_3CH_2CH_2CO_2]_2$  (14) a 0,2 mol% e  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [AcGly]_2$  (9),  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [AcAla]_2$  (6) e  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [CH_3CO_2]_2$  (12) a 0,2 e 0,3 mol%, para o cetoprofeno.

Nos gráficos acima onde se utilizou 0,2 mol% de líquido iónico, conclui-se que o anião bromo não apresenta grandes resultados de solubilidade em comparação aos restantes aniões, tanto nos mono- como nos dicatiónicos. Observa-se novamente que os ácidos carboxílicos apresentam melhores resultados de solubilidade em relação aos acetil aminoácidos, sendo que a acetil alanina apresenta melhores resultados que a acetil glicina e esta melhores que a acetil fenilalanina. Ao comparar os dois ácidos carboxílicos na Figura 3.16, o ácido butírico apresenta um resultado superior ao ácido acético, ao contrário do ibuprofeno.

### 3.3.1.4. Diferenças na solubilidade com a utilização de líquidos iónicos mono- e dicatiónicos

Para estudar o efeito dos líquidos iónicos mono- e dicatiónicos de maneira a ver quais promovem mais a solubilidade, foi apenas utilizado o cetoprofeno. Os resultados encontram-se representados na Figura 3.17, todos a 0,2 mol% de líquido iónico.

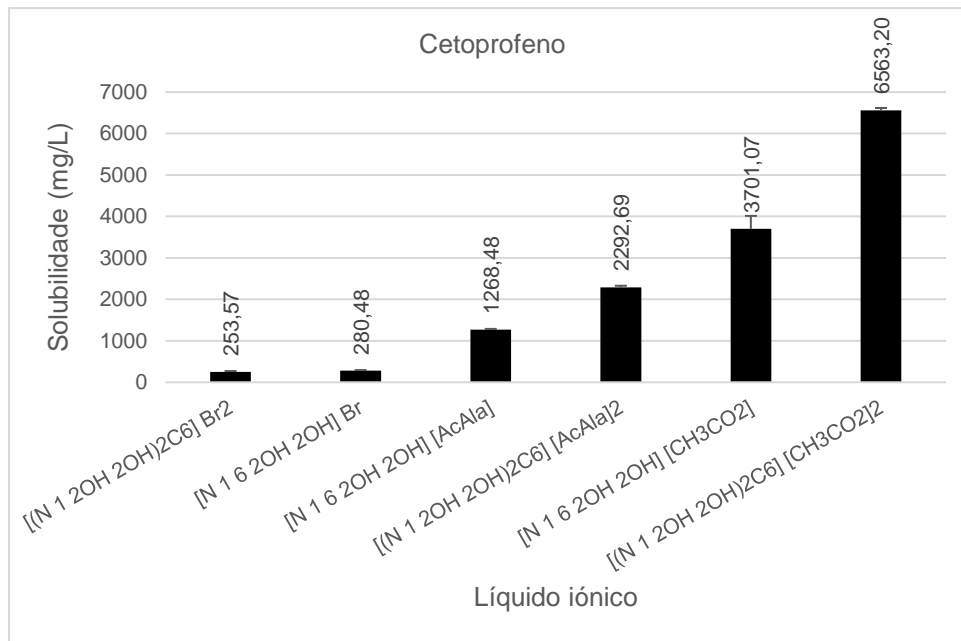
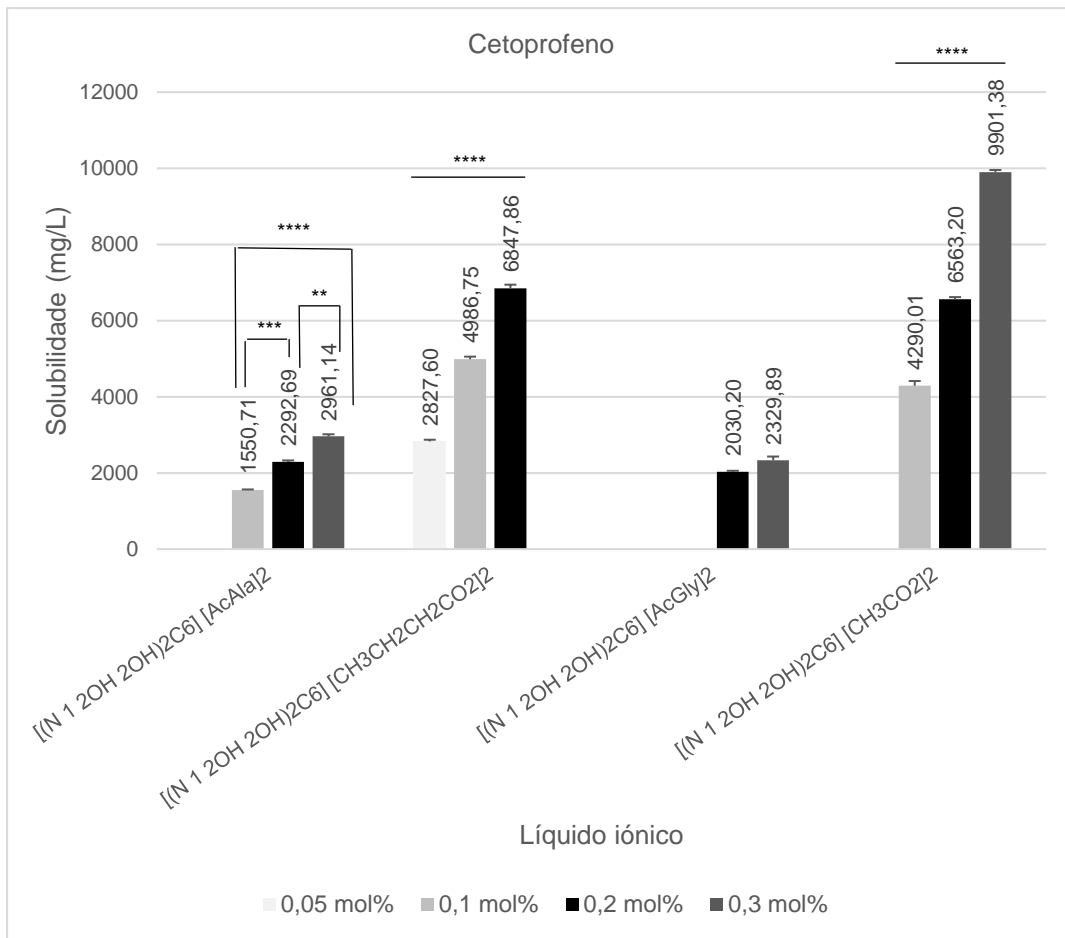


Figura 3.17 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos [(N 1 2OH 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] Br<sub>2</sub> (1) e [N 1 6 2OH 2OH] Br (2), [(N 1 2OH 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [AcAla]<sub>2</sub> (6) e [N 1 6 2OH 2OH] [AcAla] (8) e [(N 1 2OH 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12) e [N 1 6 2OH 2OH] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>] (18), todos a 0,2 mol% para o cetoprofeno.

É possível concluir que os líquidos iónicos dicatiónicos apresentam valores de solubilidade superiores aos monocatiónicos com a acetil alanina e o ácido acético.

### 3.3.1.5. Efeito de diferentes concentrações de líquido iónico

De maneira a estudar qual seria a percentagem molar de líquido iónico que mais aumentaria a solubilidade do fármaco e se a diferença seria significativa tendo em conta a citotoxicidade, foram testadas várias percentagens molares de vários líquidos iónicos. Os resultados do cetoprofeno encontram-se representados nas figuras 3.18 e 3.19.



**Figura 3.18** - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [AcAla]_2$  (6) a 0,1, 0,2 e 0,3 mol%,  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [AcGly]_2$  (9) a 0,2 e 0,3 mol%,  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [CH_3CO_2]_2$  (12) a 0,1, 0,2 e 0,3 mol% e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [CH_3CH_2CH_2CO_2]_2$  (14) a 0,05, 0,1 e 0,2 mol%, todos para o cetoprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelos símbolos \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* que correspondem a  $p = 0,0029$ ,  $p = 0,0006$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente.

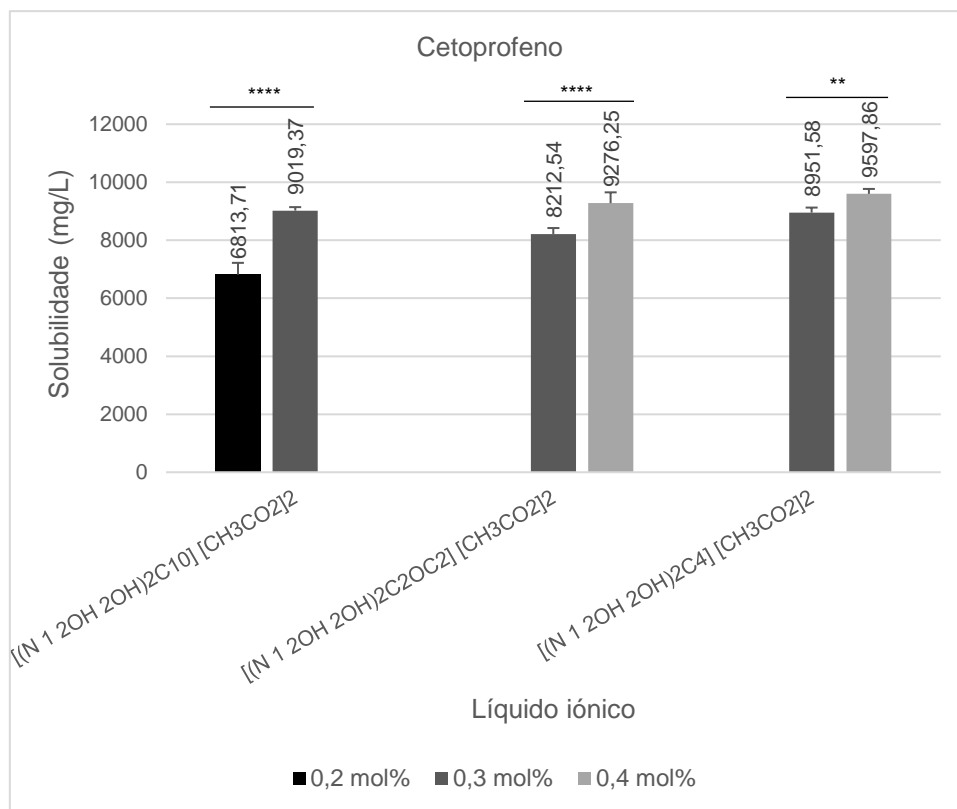


Figura 3.19 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_{10}] [CH_3CO_2]_2$  (16) a 0,2 e 0,3 mol% e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_2OC_2] [CH_3CO_2]_2$  (21) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_4] [CH_3CO_2]_2$  (22) a 0,3 e 0,4 mol% todos para o cetoprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelos símbolos \*\* e \*\*\*\* que correspondem a  $p = 0.0045$  e  $p < 0.0001$ , respetivamente.

Conclui-se que existe sempre um aumento do valor de solubilidade com o aumento da percentagem molar de líquido iónico, com especial incidência nos líquidos iónicos 12, 14, 16, 21 e 22. Nos casos em que a diferença entre percentagens molares não é muito significativa (líquidos iónicos 6 e 9) a escolha da percentagem ideal deve ter em conta o valor da citotoxicidade.

Os resultados para o ibuprofeno encontram-se representados nas figuras 3.20 e 3.21.

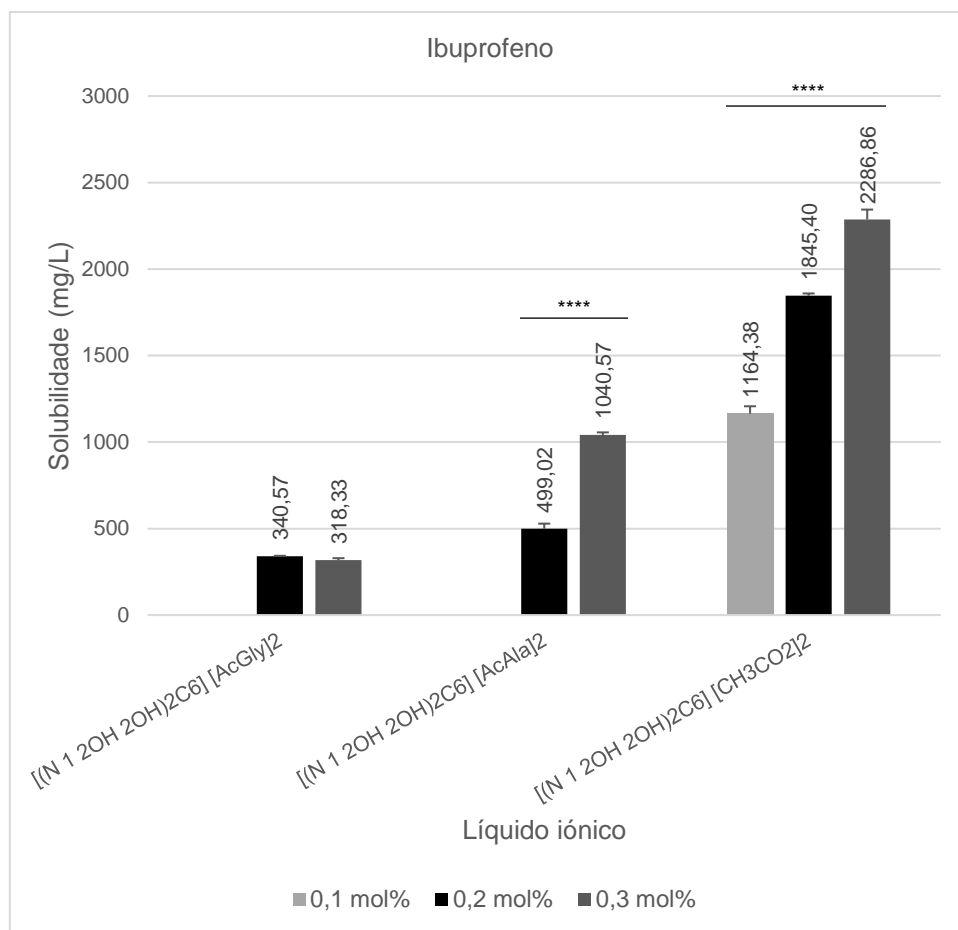


Figura 3.20 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [AcGly]_2$  (9) a 0,2 e 0,3 mol%,  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [AcAla]_2$  (6) a 0,2 e 0,3 mol% e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_6] [CH_3CO_2]_2$  (12), todos para o ibuprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelo símbolo \*\*\*\* que corresponde a  $p < 0,0001$ .

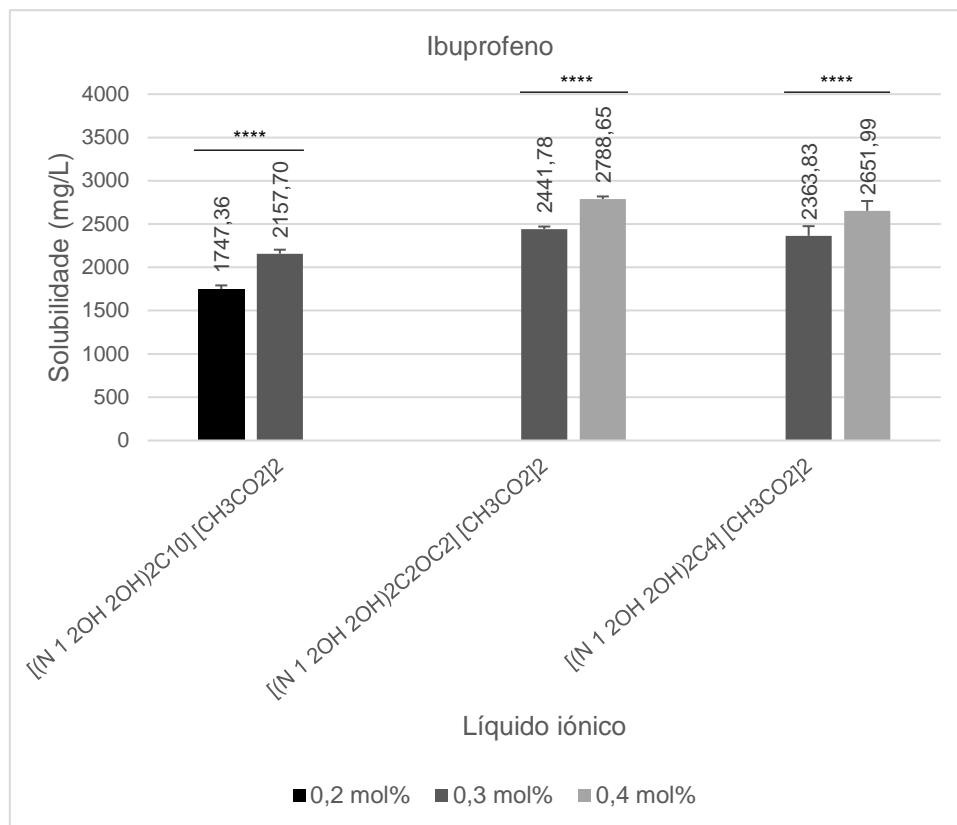


Figura 3.21 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iônicos  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_{10}] [CH_3CO_2]_2$  (16) a 0,2 e 0,3 mol% e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_2OC_2] [CH_3CO_2]_2$  (21) e  $[(N 1 2OH 2OH)_2C_4] [CH_3CO_2]_2$  (22) a 0,3 e 0,4 mol%, todos para o ibuprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelo símbolo \*\*\*\* que corresponde a  $p < 0,0001$ .

À exceção do líquido iônico 9, todos os outros apresentaram um aumento no valor de solubilidade com o aumento da percentagem molar de líquido iônico, tal como observado para o cetoprofeno. Estas diferenças entre percentagens molares não são tão significativas para o ibuprofeno como para o cetoprofeno. Isto é justificado pelo que já foi visto anteriormente de que os líquidos iônicos geralmente não têm uma capacidade tão grande para aumentar a solubilidade deste fármaco como têm para o cetoprofeno.

### 3.3.1.6. Efeito da variação do tempo de agitação e temperatura

Por fim, de maneira a entender se as 24h sob agitação e temperatura (37°C) seriam necessárias para obter o maior valor possível de solubilidade do fármaco, foram feitos estudos para avaliar o efeito do tempo, variando-o entre cinco e trinta minutos. Após preparadas as soluções estas foram deixadas sob agitação e temperatura (37°C) durante o tempo correspondente.

Foram estudados os líquidos iônicos 12 e 16 para ambos os fármacos, a diferentes percentagens molares, uma vez que foram estes os que apresentaram melhores resultados. Os resultados para o cetoprofeno encontram-se representados nas figuras 3.22 e 3.23.

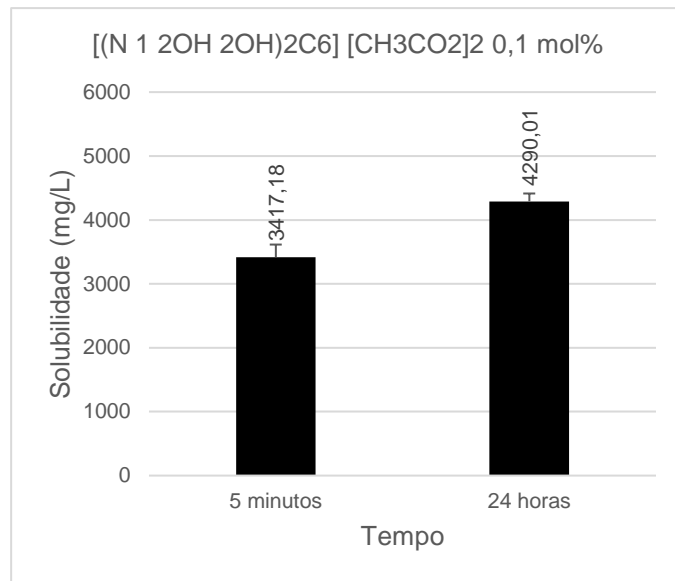


Figura 3.22 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos e 24 horas do líquido iónico [(N 1 2OH 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12) a 0,1 mol% para o cetoprofeno.

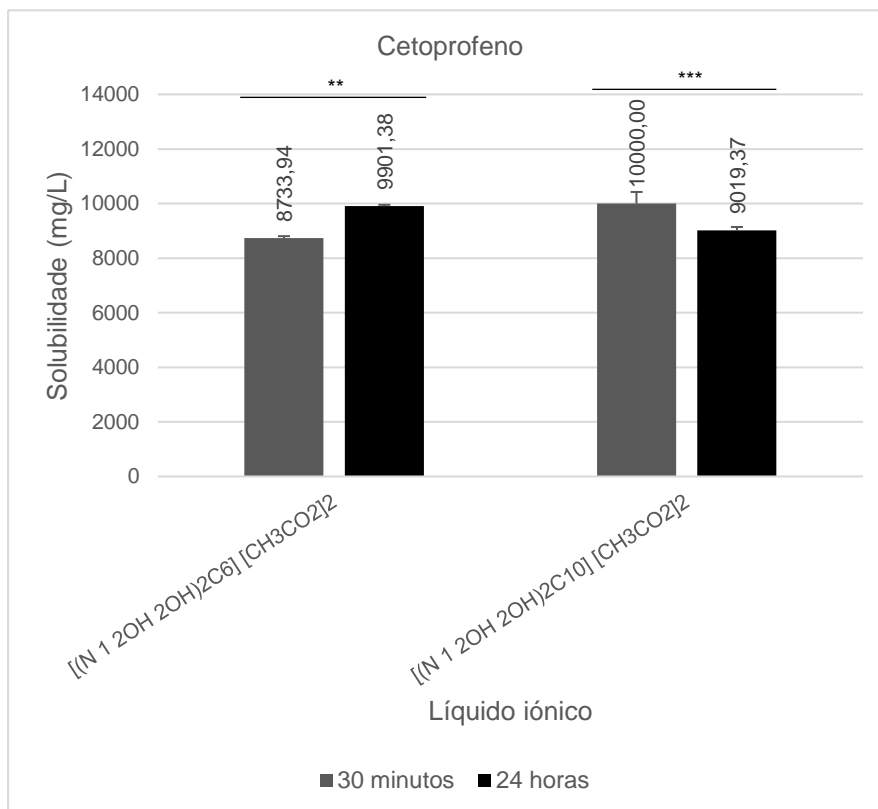


Figura 3.23 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 30 minutos e 24 horas dos líquidos iónicos [(N 1 2OH 2OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12) e [(N 1 2OH 2OH)<sub>2</sub>C<sub>10</sub>] [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (16), ambos a 0,3 mol% para o cetoprofeno. As diferenças estatísticas encontram-se representadas pelos símbolos \*\* e \*\*\* que correspondem a  $p = 0,0038$  e  $p = 0,0006$ , respetivamente.

Pela observação da Figura 3.22 é possível observar que a solubilidade obtida apenas com cinco minutos de agitação e temperatura a 37°C do líquido iônico 12 é consideravelmente alta quando comparada às 24 horas. O mesmo acontece com este líquido iônico a 0,3 mol% (Figura 3.23) e o líquido iônico 16 à mesma percentagem molar (Figura 3.23), ambos com 30 minutos de agitação e temperatura a 37°C.

Os resultados com o ibuprofeno encontram-se representados nas figuras 3.24, 3.25 e 3.26.

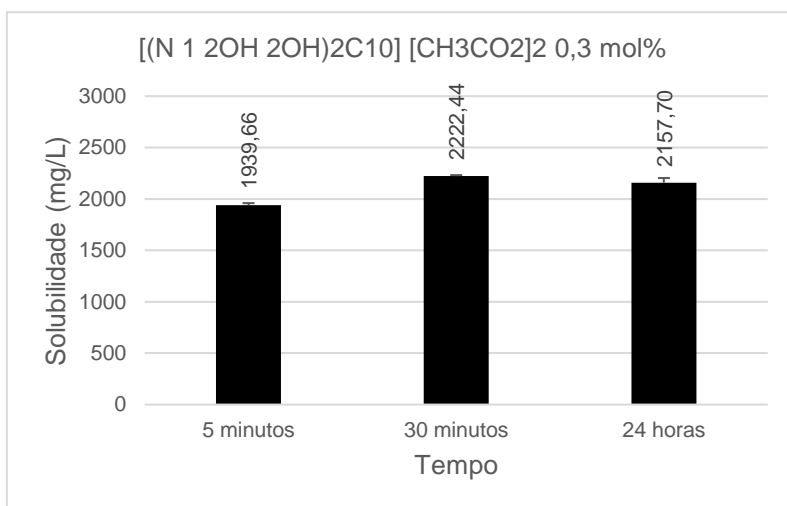


Figura 3.24 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos, 30 minutos e 24 horas do líquido iônico  $[(N_{12}OH)_{2}C_{10}][CH_3CO_2]_2$  (16) a 0,3 mol% para o ibuprofeno.

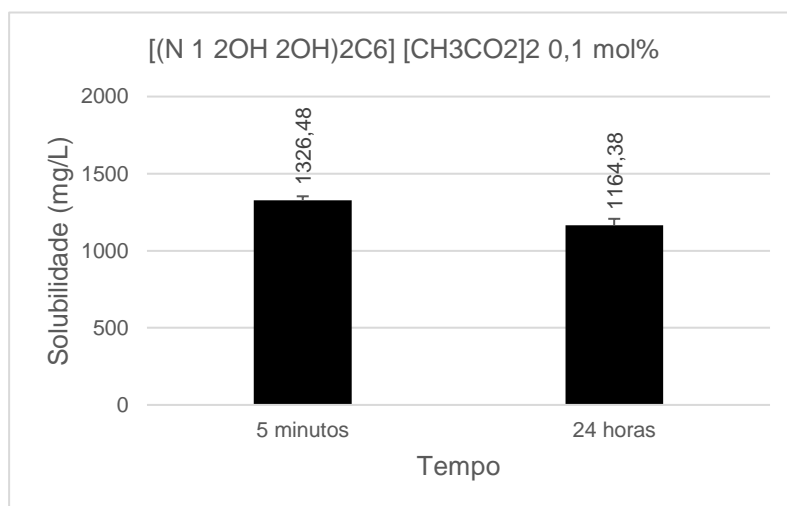


Figura 3.25 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos e 24 horas do líquido iônico  $[(N_{12}OH)_{2}C_6][CH_3CO_2]_2$  (12) a 0,1 mol% para o ibuprofeno.

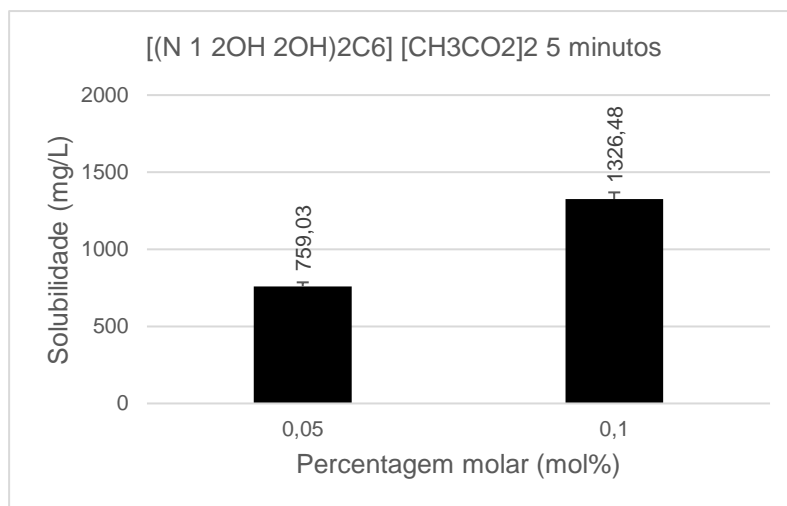


Figura 3.26 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L após 5 minutos do líquido iônico [(N 1 2OH 2OH)2C6] [CH3CO2]2 (12) a 0,05 e 0,1 mol% para o ibuprofeno.

Em relação ao ibuprofeno é ainda mais evidente a proximidade entre os valores de solubilidade a cinco e 30 minutos e os de 24 horas. O facto de certos valores estarem superiores com menor tempo de agitação pode dever-se a erros de operador. Pela Figura 3.26 é ainda possível observar que com metade da percentagem molar de líquido iónico (0,05 mol% em relação a 0,1 mol%) o valor da solubilidade desce. Ao fim de cinco minutos com apenas 0,05 mol% do líquido iónico 12, o valor de solubilidade obtido é superior ao valor da dose máxima de ibuprofeno que um adulto pode tomar de 8 em 8h, 600 mg. <sup>[54]</sup> Isto demonstra que estes líquidos iónicos promovem uma boa solubilidade do ibuprofeno, mesmo na presença de uma baixa percentagem molar de líquido iónico e em apenas cinco minutos.

### 3.3.1.7. Os melhores resultados de solubilidade

O cetoprofeno apresentou para todos os líquidos iónicos, maior aumento da solubilidade em comparação com o ibuprofeno. Os líquidos iónicos 12, 14, 16, 21 e 22 apresentaram, para ambos os fármacos, bons resultados de solubilidade (Figura 3.5 e 3.6).

No caso do cetoprofeno, com o líquido iónico 12 a 0,3 mol% foi possível dissolver praticamente todo o fármaco colocado em solução, havendo um aumento da solubilidade de cerca de 53 vezes em relação ao valor de solubilidade sem líquido iónico. Esta dissolução quase completa dos 20 mg de fármaco colocados em solução foi também possível com o líquido iónico 16 à mesma percentagem molar e com os líquidos iónicos 21 e 22 a 0,4 mol% (Figura 3.5).

Para o ibuprofeno, apesar do aumento não ser tão evidente como no cetoprofeno, com o líquido iónico 21 a 0,4 mol% a solubilidade em relação ao que foi determinado experimentalmente sem líquido iónico foi cerca de 46 vezes superior (Figura 3.6). Se compararmos a mesma percentagem molar do melhor líquido iónico com o que apresentou piores resultados, podemos ver diferenças relevantes. No caso do cetoprofeno, esta comparação encontra-se representada na Figura 3.27 e do ibuprofeno na Figura 3.28.

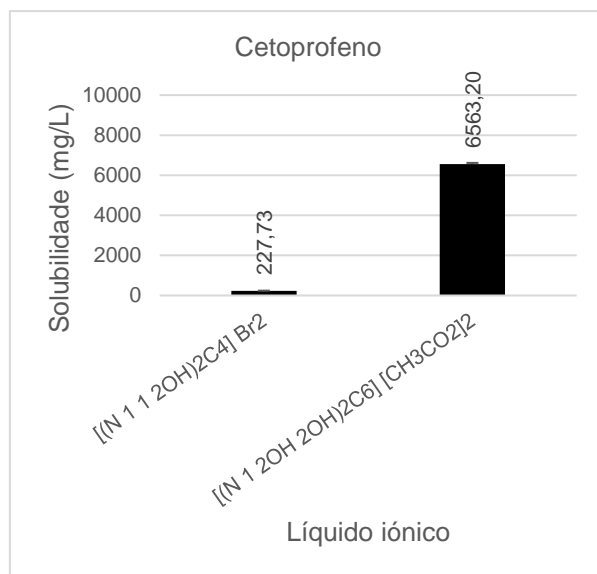


Figura 3.27 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)2C6] [CH_3CO_2]_2$  (12) e  $[(N 1 1 2OH)2C4] Br_2$  (4), ambos a 0,2 mol% para o cetoprofeno.

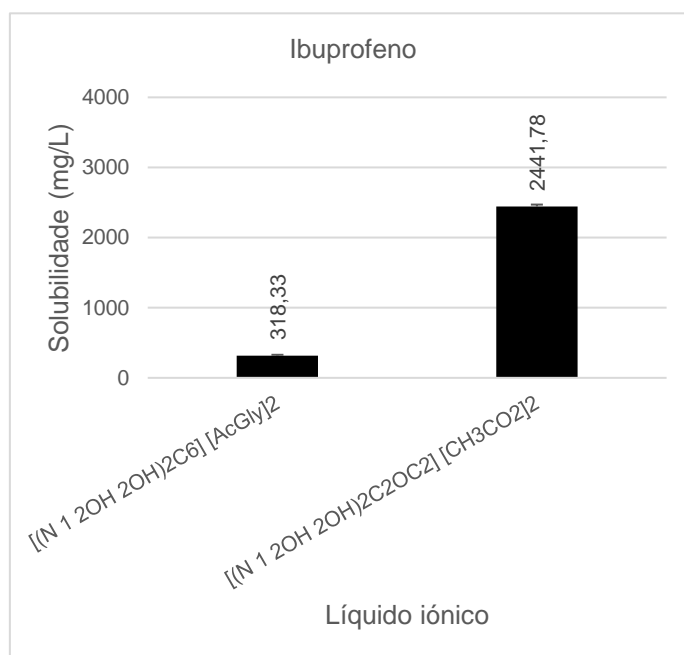


Figura 3.28 - Gráfico referente aos valores de solubilidade em mg/L dos líquidos iónicos  $[(N 1 2OH 2OH)2C2OC2] [CH_3CO_2]_2$  (21) e  $[(N 1 2OH 2OH)2C6] [AcGly]_2$  (9), ambos a 0,3 mol% para o ibuprofeno.

Pode ver-se que entre o líquido iónico que apresentou melhores resultados e o que apresentou piores, houve um aumento de cerca de 29 vezes no caso do cetoprofeno e 8 no caso do ibuprofeno. Para ambos os fármacos, os líquidos iónicos que apresentaram melhores

resultados têm quatro grupos 2-hidroxietilo, possuem o ácido acético como anião e são dicatiónicos.

As interações entre fármaco e líquido iônico podem justificar os aumentos de solubilidade observados. Para o melhor líquido iônico estudado (IL 12  $[(N_{12OH_{20H}})_2C_6][CH_3CO_2]_2$ ), foram preparadas duas amostras do líquido iônico a 0,3 mol% em DMSO- $d_6$ , uma com o cetoprofeno e outra com o ibuprofeno, de maneira a perceber a interação fármaco-líquido iônico com recurso à experiência 2D  $^1H$ - $^1H$  NOESY. Os espectros obtidos para esta experiência encontram-se representados nas figuras 3.29 e 3.30.

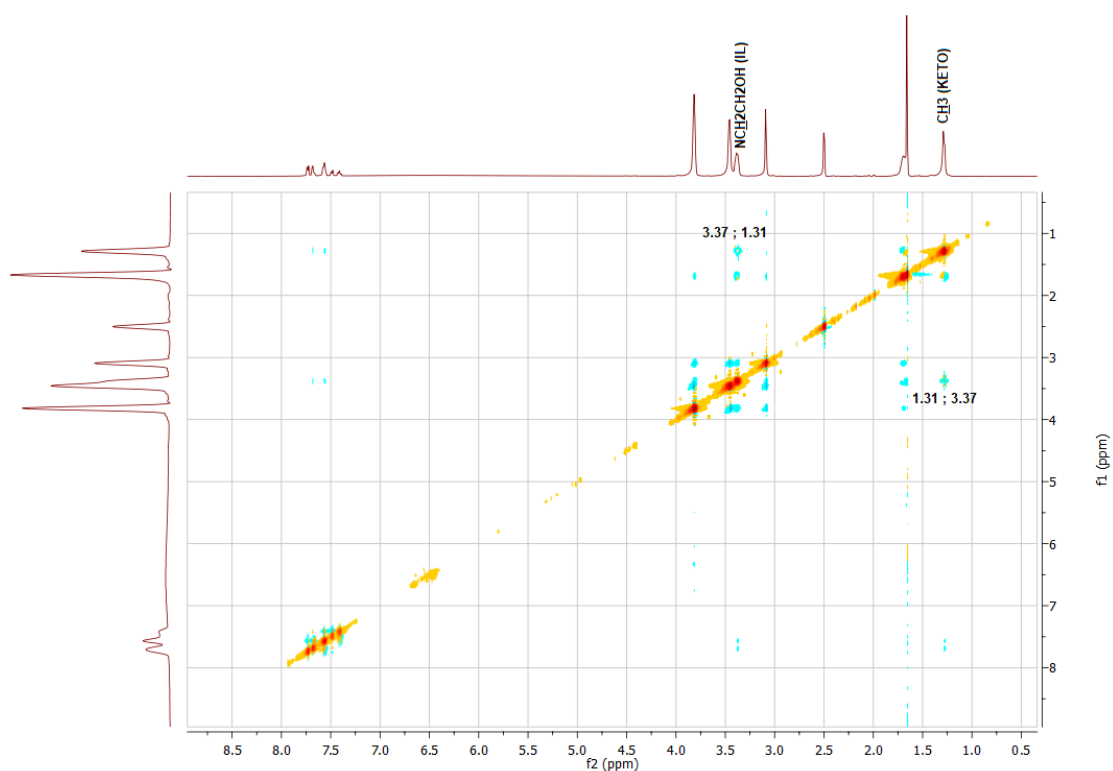


Figura 3.29 - Espectro 2D  $^1H$ - $^1H$  NOESY do cetoprofeno com o líquido iônico 12  $[(N_{12OH_{20H}})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  a 0,3 mol% em DMSO- $d_6$ .

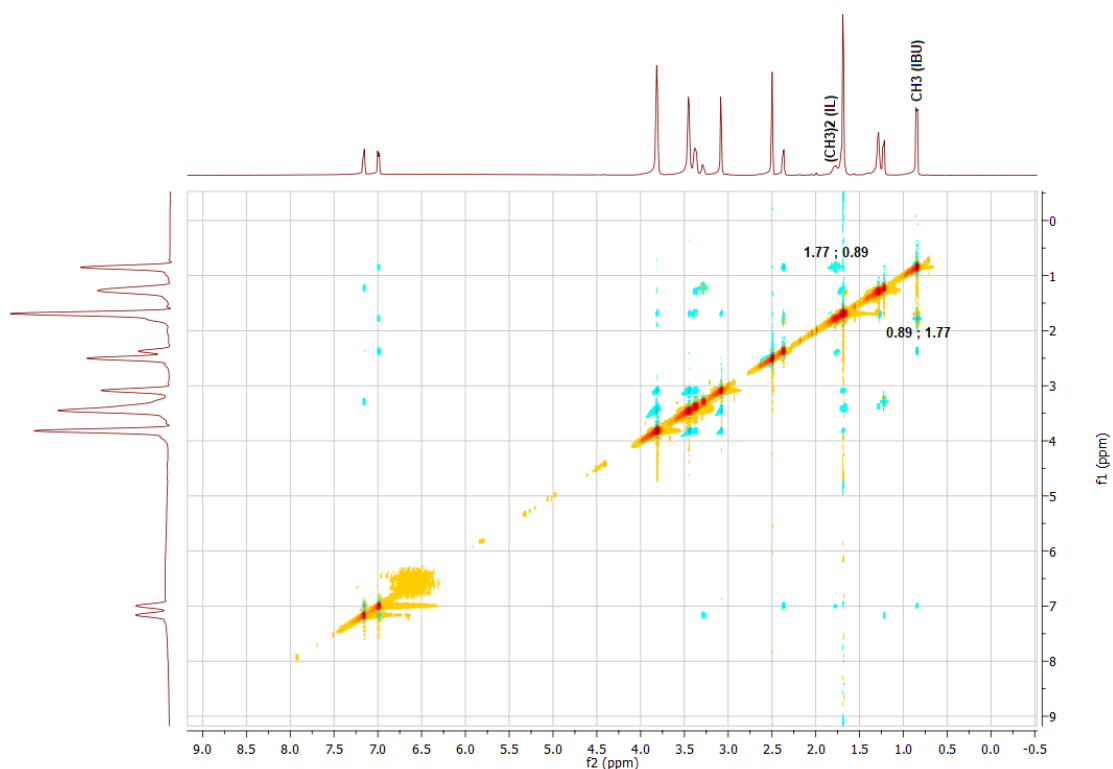


Figura 3.30 - Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY do ibuprofeno com o líquido iónico 12  $([(\text{N}_{12\text{OH}2\text{OH}})_2\text{C}_6][\text{CH}_3\text{CO}_2]_2)$  a 0,3 mol% em  $\text{DMSO-d}_6$ .

É possível observar que o OH do cetoprofeno a  $\delta$  12.46 ppm e o OH a  $\delta$  6.92 ppm do líquido iónico desapareceram, como se pode observar comparando as figuras A.70, A.71 e A.74 em anexo. É também possível observar uma interação entre os grupos prótons do grupo 2-hidroxiétilo ligados ao azoto a  $\delta$  3.37 ppm e o grupo metil do cetoprofeno a  $\delta$  1.31 ppm.

É possível perceber que o OH do ibuprofeno a  $\delta$  12.24 ppm e o OH do líquido iónico a  $\delta$  6.92 ppm desapareceram, como se pode observar nas figuras A.72, A.73 e A.74 em anexo. É também possível observar uma interação entre os grupos metil dos aniões do líquido iónico a  $\delta$  1.77 ppm e os grupos metil do ibuprofeno a  $\delta$  0.89 ppm.

Estas interações justificam o aumento da solubilidade de ambos os fármacos quando estão na presença do líquido iónico 12.

### 3.3.2. Permeabilidade

A permeabilidade do cetoprofeno foi estudada na presença e ausência do líquido iónico 12  $([(\text{N}_{12\text{OH}2\text{OH}})_2\text{C}_6][\text{CH}_3\text{CO}_2]_2)$ . Em ambos os casos, não houve alteração do valor da absorvância ao longo do tempo nem em relação a  $t = 0$ , o que significa que não se observou nada no compartimento recetor, não havendo assim difusão do fármaco através da membrana PES-U. O facto disto acontecer com a utilização deste líquido iónico pode dever-se ao facto deste ser uma molécula grande por ser dicatiónico.

### 3.4. Citotoxicidade

Após observação dos resultados de solubilidade de todos os líquidos iônicos, foram escolhidos para ser feito o estudo da sua citotoxicidade os líquidos iônicos 1, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16, 18, 21 e 22. Após otimização das concentrações de líquido iônico a utilizar, as escolhidas foram 25, 50, 75, 100, 150, 250, 350, 500 e 750 mM. Os resultados foram tratados no programa *GraphPad* e os gráficos dos líquidos iônicos que não se demonstraram tóxicos encontram-se representados na Figura 3.31. Os valores de  $IC_{50}$  determinados para todos os líquidos iônicos encontram-se representados na Tabela 3.3.

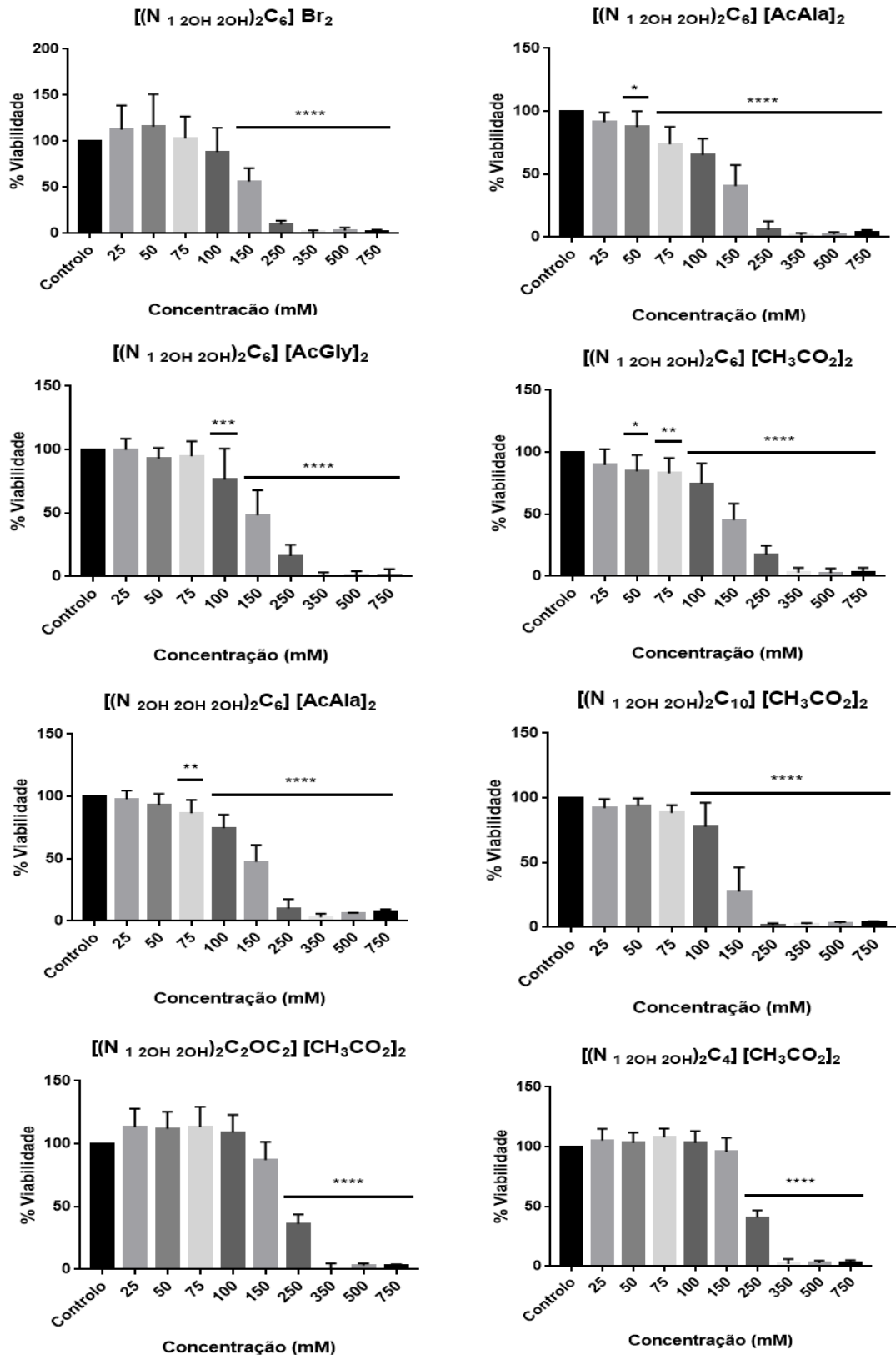


Figura 3.31 - Citotoxicidade dos líquidos iônicos 1, 6, 9, 12, 13, 16, 21 e 22 em células de fibroblastos de L929. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios biológicos independentes. Os símbolos \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* indicam que as viabilidades são estatisticamente significantes com  $p = 0.0468$  (0,0138 para o IL12),  $p = 0.0035$  (0,0054 para o IL12),  $p = 0.0005$  e  $p = 0.0001$ , respectivamente, quando comparados com o controle.

Tabela 3.3 - Valores de IC<sub>50</sub> determinados e respetivos líquidos iónicos.

Líquido iónico	IC <sub>50</sub> (mM)
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] Br <sub>2</sub> (1)	126,6 ± 6,50
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (6)	119,8 ± 11,5
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcGly] <sub>2</sub> (9)	146,4 ± 18,4
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (12)	138,5 ± 13,0
[(N <sub>2</sub> 2OH 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcAla] <sub>2</sub> (13)	140,2 ± 11,6
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>10</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (16)	124,6 ± 9,70
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> OC <sub>2</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (21)	223,8 ± 23,3
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (22)	238,4 ± 20,5
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [AcPhe] <sub>2</sub> (7)	32,40
[N <sub>1</sub> 6 2OH 2OH] [AcAla] (8)	26,30
[(N <sub>1</sub> 2OH 2OH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ] [CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (14)	7,400
[N <sub>1</sub> 6 2OH 2OH] [CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] (18)	24,20

Pela observação da Tabela 3.3 podemos concluir que os líquidos iónicos 7, 8, 14 e 18 apresentaram valores de IC<sub>50</sub> baixos em relação aos restantes, sendo assim considerados mais tóxicos. Estes líquidos iónicos perderam assim interesse para o trabalho em questão e não foram alvo de três ensaios biológicos como os anteriores (1, 6, 9, 12, 13, 16, 21, 22). O líquido iónico 14 que tinha apresentado valores de solubilidade altos (o mais alto a 0,1 e 0,2 mol% para o cetoprofeno e o segundo mais alto a 0,2 mol% para o ibuprofeno) revelou-se um líquido iónico sem vantagens, dando assim lugar ao líquido iónico 12 que apresenta valores altos de solubilidade e um valor de IC<sub>50</sub> favorável.

Ambos os líquidos iónicos monocatiónicos testados (8 e 18) revelaram-se tóxicos. Ao comparar o líquido iónico 8 (monocatiónico) com o 6 (dicatiónico) e o líquido iónico 18 (monocatiónico) com o 12 (dicatiónico), em que a cadeia alquílica, o número de grupos 2-hidroxietilo e o anião são iguais, apenas muda o facto de serem mono- ou dicatiónicos, concluiu-se que os líquidos iónicos dicatiónicos são mais adequados ao estudo feito nesta dissertação, o que vai de encontro ao reportado na literatura. <sup>[55]</sup> Este resultado também é apoiado pelo facto dos líquidos iónicos dicatiónicos fornecerem maiores aumentos no valor de solubilidade dos fármacos como visto em 3.3.1.4. Quanto ao líquido iónico 7, que possui a acetil fenilalanina como anião, para além de tóxico não obteve resultados relevantes de solubilidade, podendo assim ser retirado dos líquidos iónicos importantes para o objetivo do trabalho.

Ao comparar os líquidos iónicos 12 (*linker* de seis carbonos), 16 (*linker* de dez carbonos), 21 (*linker* com um grupo éter) e 22 (*linker* de quatro carbonos) concluiu-se que o líquido iónico que apresenta o IC<sub>50</sub> mais alto (menos tóxico) corresponde ao *linker* mais pequeno (quatro carbonos),

seguindo-se o líquido iónico com o grupo éter, depois o com o *linker* de seis carbonos e por fim o de dez carbonos. Ou seja, o aumento do *linker* do catião faz aumentar a citotoxicidade do líquido iónico.

Em relação ao número de grupos 2-hidroxietilo, pode concluir-se por comparação dos líquidos iónicos 6 (quatro grupos) e 13 (seis grupos) que há uma diminuição na citotoxicidade quando usado o líquido iónico que possui maior número de grupos, o líquido iónico 13, mas a diferença não é significativa.

Quanto aos aniões utilizados, o bromo (líquido iónico 1) e os acetil aminoácidos (líquidos iónicos 6, 7 e 9) deram bons resultados de  $IC_{50}$  à exceção da acetil fenilalanina (líquido iónico 7) como visto anteriormente. Em relação aos ácidos carboxílicos, ácido acético (líquido iónico 12) e ácido butírico (líquido iónico 14), o ácido acético é claramente mais benéfico, apresentando o líquido iónico com este anião um valor de  $IC_{50}$  cerca de 19 vezes superior ao líquido iónico com o ácido butírico.



## 4. Conclusões

O objetivo desta dissertação prendeu-se na melhoria da solubilidade dos fármacos de classe II, cetoprofeno e ibuprofeno, com recurso a líquidos iônicos sintetizados como co-solvente que fossem biocompatíveis. A solubilidade dos fármacos em água a 37°C foi determinada experimentalmente de onde resultou um valor de solubilidade de 187,63 mg/L para o cetoprofeno e 60,44 mg/L para o ibuprofeno.

Os líquidos iônicos que resultaram no maior benefício em termos de solubilidade e que não apresentaram níveis de citotoxicidade elevados foram o 12  $[(N_{12}OH_2)C_6][CH_3CO_2]_2$  e o 21  $[(N_{12}OH_2)C_2OC_2][CH_3CO_2]_2$ . O cetoprofeno apresentou um valor de solubilidade de 9901,38 mg/L na presença de 0,3 mol% do líquido iônico 12 (53 vezes maior que a do fármaco sozinho em água), o que significou uma dissolução praticamente completa da quantidade de fármaco em solução. Em termos de citotoxicidade apresentou um valor de  $IC_{50}$  de 138,5 mM, que corresponde aos 0,3 mol% aproximadamente. Para o ibuprofeno este líquido iônico resultou numa solubilidade de 2286,86 mg/L a 0,3 mol%, significando um aumento de cerca de 38 vezes em relação à solubilidade do fármaco na ausência de líquido iônico. Nos estudos do coeficiente de partição, este líquido iônico conseguiu promover a hidrofiliabilidade necessária com ambos os fármacos, colocando os seus log P dentro do intervalo desejado de 0 e 3. O líquido iônico 21 a 0,4 mol% promoveu um aumento de cerca de 50 vezes da solubilidade do cetoprofeno (9276,25 mg/L) e 46 vezes do ibuprofeno (2788,65 mg/L). Em relação à citotoxicidade, apresentou um  $IC_{50}$  de 223,8 mM, correspondendo aproximadamente aos 0,4 mol% em solução. Esta diminuição na citotoxicidade deve-se à introdução do grupo éter na cadeia alquílica do catião, como reportado na literatura. <sup>[56]</sup>

Os líquidos iônicos que possuem uma cadeia alquílica de seis e dez carbonos apresentaram melhores resultados de solubilidade para o cetoprofeno que os líquidos iônicos que possuem um grupo éter ou uma cadeia alquílica de quatro carbonos, para a mesma percentagem molar.

Os líquidos iônicos que possuem quatro grupos 2-hidroxietilo apresentaram um maior aumento da solubilidade dos fármacos que os líquidos iônicos que possuem dois ou seis grupos 2-hidroxietilo.

Os aniões que mais favoreceram o aumento da solubilidade dos fármacos foram os ácidos carboxílicos, seguidos dos acetil aminoácidos e por fim o bromo.

Os líquidos iônicos dicatiónicos apresentaram sempre melhores resultados de solubilidade que os líquidos iônicos monocatiónicos, estando este resultado de acordo com o reportado na literatura. <sup>[20]</sup>

Quando estudada a percentagem molar do líquido iônico, quanto maior esta é, maior o valor de solubilidade. No entanto, esta deve ter em conta o valor de citotoxicidade do líquido iônico.

Ao fazer os estudos solubilidade de cinco e trinta minutos, este espaço de tempo revelou valores idênticos de solubilidade aos valores obtidos quando a solução de fármaco, líquido iônico e água é deixada a agitar 24h. O líquido iônico 12 apresentou ainda um valor de solubilidade do

ibuprofeno superior a 600 mg/L, quando presente numa concentração de 0,05 mol% aos cinco minutos, sendo 600 mg a dose recomendada deste fármaco para um adulto de 8 em 8h. [54]

De maneira a determinar a toxicidade e o valor de IC<sub>50</sub> dos líquidos iónicos que obtiveram melhores resultados de solubilidade, foram feitos testes de viabilidade em células de fibroblastos L929.

Os líquidos iónicos monocatiónicos, assim como os líquidos iónicos dicatiónicos com o ácido butírico ou a acetil fenilalanina como anião revelaram-se tóxicos. O ácido butírico, devido à sua cadeia alquílica longa era expectável que fizesse aumentar a citotoxicidade do líquido iónico, como já tem vindo a ser reportado na literatura. [37] A acetil fenilalanina devido ao seu grupo aromático também era esperado que aumentasse a citotoxicidade em relação aos outros acetil aminoácidos. [48] Na generalidade os líquidos iónicos dicatiónicos apresentaram menor toxicidade que os monocatiónicos, indo de encontro ao reportado. [55]

O aumento da cadeia alquílica do catião dos líquidos iónicos promoveu um aumento na citotoxicidade enquanto que o aumento do número de grupos 2-hidroxietilo promoveu uma diminuição nesta.

Como anião, o bromo, os acetil aminoácidos (à exceção da acetil fenilalanina) e o ácido acético originaram bons resultados no valor de IC<sub>50</sub>, de acordo com o reportado na literatura. [9] [24]

Foram realizados testes de permeabilidade com o cetoprofeno na presença e ausência do líquido iónico 12 ( $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [CH_3CO_2]_2$ ), os quais não demonstraram difusão do fármaco através da membrana PES-U, podendo dever-se ao facto deste líquido iónico dicatiónico ser uma molécula grande.

Devido ao aspeto ceroso de alguns compostos sintetizados, foram realizados ensaios de Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) aos compostos 6, 12, 13, 16, 18 e 22, de maneira a determinar os seus pontos de fusão. Três compostos, nomeadamente o 6 ( $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [AcAla]_2$ ), o 13 ( $[(N_{20H_{20H}})_2C_6] [AcAla]_2$ ) e o 22 ( $[(N_{12}OH_{20H})_2C_4] [CH_3CO_2]_2$ ) apresentaram temperaturas de fusão superiores a 100°C, não podendo assim ser considerados líquidos iónicos e não correspondendo por isso ao objetivo principal desta tese.

Em suma, o objetivo proposto para esta dissertação foi atingido. Utilizando os líquidos iónicos 12 ( $[(N_{12}OH_{20H})_2C_6] [CH_3CO_2]_2$ ) e 21 ( $[(N_{12}OH_{20H})_2C_2OC_2] [CH_3CO_2]_2$ ) como co-solvente foi possível aumentar consideravelmente a solubilidade dos fármacos em água, deslocando-os para a classe I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (alta solubilidade e alta permeabilidade).

## 5. Trabalho Futuro

Futuramente seria importante fazer um estudo mais alargado da influência da utilização de certos grupos nas moléculas dos líquidos iónicos de maneira a promover a solubilidade dos fármacos cetoprofeno e ibuprofeno com menores concentrações de líquido iónico. Este estudo poderia passar por: líquidos iónicos dicatiónicos, catiões com quatro grupos 2-hidroxietilo, com um *linker* de seis carbonos e com ácidos carboxílicos como anião. Devido aos resultados de citotoxicidade e solubilidade do líquido iónico  $[(N_{12}OH_{20H})_2C_2OC_2][CH_3CO_2]_2$  (21) seria também importante estudar melhor a introdução do grupo éter na cadeia alquílica do catião.

Seria também importante estudar a solubilidade destes líquidos iónicos em meios fisiológicos como o tampão fosfato salino (PBS).



## 6. Referências

- [1] Adawiyah, N., et al. (2016). "Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems." MedChemComm **7**(10): 1881-1897.
- [2] Liu, R. (2018). Water-insoluble drug formulation, CRC press.
- [3] Jain, P., et al. (2010). "Solubility enhancement techniques with special emphasis on hydrotropy." International Journal of Pharma Professional's Research **1**(1): 34-45.
- [4] Ferraz, R., et al. (2011). "Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients." ChemMedChem **6**(6): 975-985.
- [5] Kadokawa, J.-i. (2013). Ionic Liquids: New Aspects for the Future, BoD—Books on Demand.
- [6] Itoh, T. and Y.-M. Koo (2019). Application of Ionic Liquids in Biotechnology, Springer.
- [7] Petkovic, M., et al. (2010). "Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids—toxicity and biodegradability." Green Chemistry **12**(4): 643-649.
- [8] Cuadrado-Prado, S., et al. (2009). "Experimental measurement of the hygroscopic grade on eight imidazolium based ionic liquids." Fluid phase equilibria **278**(1-2): 36-40.
- [9] Gomes, J. M., et al. (2019). "Biocompatible ionic liquids: fundamental behaviours and applications." Chemical Society Reviews **48**(15): 4317-4335.
- [10] Green, M. D. and T. E. Long (2009). "Designing imidazole-based ionic liquids and ionic liquid monomers for emerging technologies." Polymer Reviews **49**(4): 291-314.
- [11] de Almeida, T. S., et al. (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.
- [12] Gadilohar, B. L. and G. S. Shankarling (2017). "Choline based ionic liquids and their applications in organic transformation." Journal of Molecular Liquids **227**: 234-261.
- [13] Blusztajn, J. K. (1998). "Choline, a vital amine." Science **281**(5378): 794-795.
- [14] Meck, W. H. and C. L. Williams (1999). "Choline supplementation during prenatal development reduces proactive interference in spatial memory." Developmental Brain Research **118**(1-2): 51-59.
- [15] Sintra, T. E., et al. (2018). "Enhanced dissolution of ibuprofen using ionic liquids as cationic hydrotropes." Physical Chemistry Chemical Physics **20**(3): 2094-2103.
- [16] Ohno, H. and K. Fukumoto (2007). "Amino acid ionic liquids." Accounts of chemical research **40**(11): 1122-1129.
- [17] Welton, T. (2018). "Ionic liquids: a brief history." Biophysical reviews **10**(3): 691-706.
- [18] Leveque, J.-M., et al. (2007). "Synthesis of ionic liquids using non conventional activation methods: An overview." Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly **138**(11): 1103-1113.
- [19] Kaur, N. and V. Singh (2017). "Current status and future challenges in ionic liquids, functionalized ionic liquids and deep eutectic solvent-mediated synthesis of nanostructured TiO<sub>2</sub>: a review." New Journal of Chemistry **41**(8): 2844-2868.

- [20] Yang, X., et al. (2016). "Synthesis, properties and applications of dicationic ionic liquids." Progress in Chemistry **28**(2/3): 269.
- [21] Bannan, C. C., et al. (2016). "Calculating partition coefficients of small molecules in octanol/water and cyclohexane/water." Journal of chemical theory and computation **12**(8): 4015-4024.
- [22] Bhal, S. K. "LogP—Making Sense of the Value."
- [23] Ropel, L., et al. (2005). "Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids." Green Chemistry **7**(2): 83-90.
- [24] Lee, S. H. and S. B. Lee (2009). "Octanol/water partition coefficients of ionic liquids." Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology **84**(2): 202-207.
- [25] Yu, L. X., et al. (2002). "Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions." Pharmaceutical research **19**(7): 921-925.
- [26]  
[https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C47578](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47578) (consultado em 23/02/2020)
- [27] <https://go.drugbank.com/drugs/DB01009> (consultado em 23/02/2020)
- [28] Gülsu, A., et al. (2012). "Preparation and characterization of ketoprofen loaded albumin microspheres." Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi **37**(2).
- [29]  
[https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C561](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C561) (consultado em 25/02/2020)
- [30] <https://go.drugbank.com/drugs/DB01050> (consultado em 25/02/2020)
- [31] Zheng, J., et al. (2007). "Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system." Applied Clay Science **36**(4): 297-301.
- [32] Sintra, T. E., et al. (2018). "Enhanced dissolution of ibuprofen using ionic liquids as cationic hydrotropes." Physical Chemistry Chemical Physics **20**(3): 2094-2103.
- [33] e Silva, F. A., et al. (2014). "Sustainable design for environment-friendly mono and dicationic cholinium-based ionic liquids." Ecotoxicology and environmental safety **108**: 302-310.
- [34] Levintova, Y., et al. (2011). "An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells." International journal of pharmaceutics **419**(1-2): 96-106.
- [35] Gouveia, W., et al. (2014). "Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials." Chemosphere **104**: 51-56.
- [36] Hou, X.-D., et al. (2013). "Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium amino acids ionic liquids." PLoS one **8**(3): e59145.
- [37] Jing, B., et al. (2016). "Interaction of ionic liquids with a lipid bilayer: a biophysical study of ionic liquid cytotoxicity." The Journal of Physical Chemistry B **120**(10): 2781-2789.
- [38] Yu, J., et al. (2016). "Antimicrobial activity and cytotoxicity of piperazinium-and guanidinium-based ionic liquids." Journal of hazardous materials **307**: 73-81.

- [39] Silva, S. S., et al. (2011). "Green processing of porous chitin structures for biomedical applications combining ionic liquids and supercritical fluid technology." Acta biomaterialia **7**(3): 1166-1172.
- [40] Sebaugh, J. (2011). "Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation." Pharmaceutical statistics **10**(2): 128-134.
- [41] Lambert, J. B., et al. (2019). Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods, John Wiley & Sons.
- [42] Levitt, M. H. (2013). Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance, John Wiley & Sons.
- [43] Crosthwaite, J. M., et al. (2005). "Phase transition and decomposition temperatures, heat capacities and viscosities of pyridinium ionic liquids." The Journal of Chemical Thermodynamics **37**(6): 559-568.
- [44] Höhne, G., et al. (2013). Differential scanning calorimetry, Springer Science & Business Media.
- [45] Chiavaro, E. (2014). Differential scanning calorimetry: Applications in fat and oil technology, CRC Press.
- [46] Kalogerias, I. M. (2016). "Glass-transition phenomena in polymer blends." Encyclopedia of Polymer Blends, Volume 3: Structure.
- [47] Duarte, A. R. C., et al. (2017). "A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **114**: 296-304.
- [48] Upstone, S. L. (2006). "Ultraviolet/visible light absorption spectrophotometry in clinical chemistry." Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.
- [49] Gottlieb, H. E., et al. (1997). "NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities." The Journal of organic chemistry **62**(21): 7512-7515.
- [50] Czyski, A. (2019). "Determination of the lipophilicity of ibuprofen, naproxen, ketoprofen, and flurbiprofen with thin-layer chromatography." Journal of Chemistry **2019**.
- [51] Pajouhesh, H. and G. R. Lenz (2005). "Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs." NeuroRx **2**(4): 541-553.
- [52] Krishnaiah, Y. S. (2010). "Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs." J Bioequiv Availab **2**(2): 28-36.
- [53] de Ferro, A. M., et al. (2018). "Designing the ammonium cation to achieve a higher hydrophilicity of bistriflimide-based ionic liquids." Physical Chemistry Chemical Physics **20**(29): 19307-19313.
- [54] Goldenberg, N. A., et al. (2005). "Brief communication: duration of platelet dysfunction after a 7-day course of ibuprofen." Annals of internal medicine **142**(7): 506-509.
- [55] Kumar, R. A., et al. (2009). "In vitro cytotoxicities of ionic liquids: effect of cation rings, functional groups, and anions." Environmental Toxicology: An International Journal **24**(4): 388-395.
- [56] Ventura, S. P., et al. (2012). "Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria." Ecotoxicology and environmental safety **76**: 162-168.



## Anexos

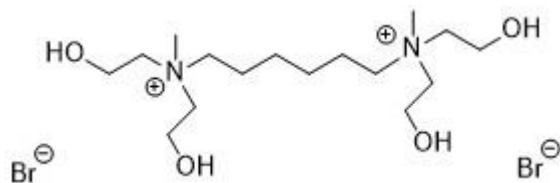


Figura 0.1 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_6] Br_2$ . Dibrometo de  $N,N'$  - dimetil -  $N,N,N',N'$  - tetra(2 - hidroxietil) - 1,6 - hexanodiamónio (1)

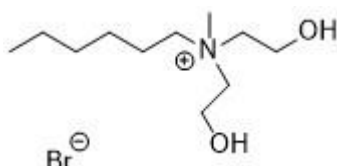


Figura 0.2 -  $[N_{1,6,2OH,2OH}] Br$ . Brometo de  $N,N$  - di(2 - hidroxietil) -  $N$  - metil - 1 - hexanoamónio (2)

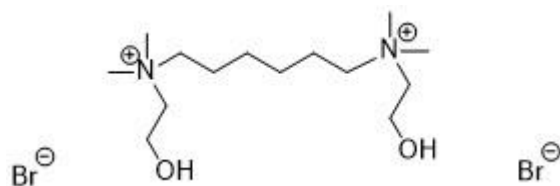


Figura 0.3 -  $[(N_{1,1,2OH})_2C_6] Br_2$ . Dibrometo de  $N,N'$  - di(2 - hidroxietil) -  $N,N,N',N'$  - tetrametil - 1,6 - hexanodiamónio (3)

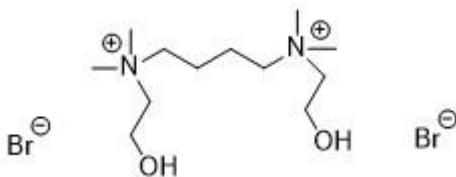


Figura 0.4 -  $[(N_{1,1,2OH})_2C_4] Br_2$ . Dibrometo de  $N,N'$  - di(2 - hidroxietil) -  $N,N,N',N'$  - tetrametil - 1,4 - butanodiamónio (4)

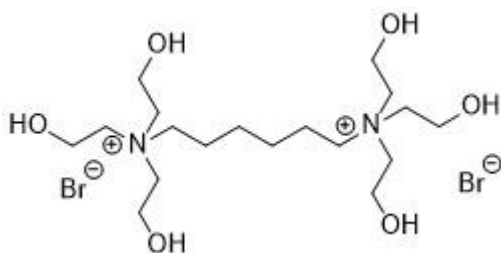


Figura 0.5 -  $[(N_{2OH,2OH,2OH})_2C_6] Br_2$ . Dibrometo de  $N,N,N',N',N'$  - hexa(2 - hidroxietil) - 1,6 - hexanodiamónio (5)

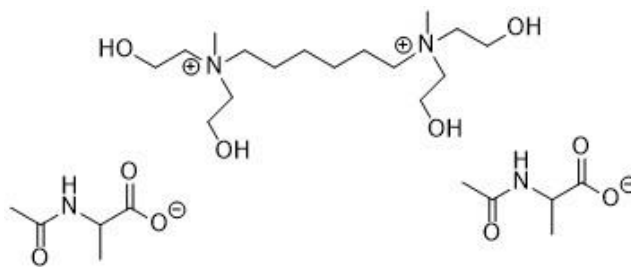


Figura 0.6 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_6][AcAla]_2$ . Diacetilalatinato de  $N,N'$ -dimetil- $N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietyl)-1,6-hexanodiamónio (6)

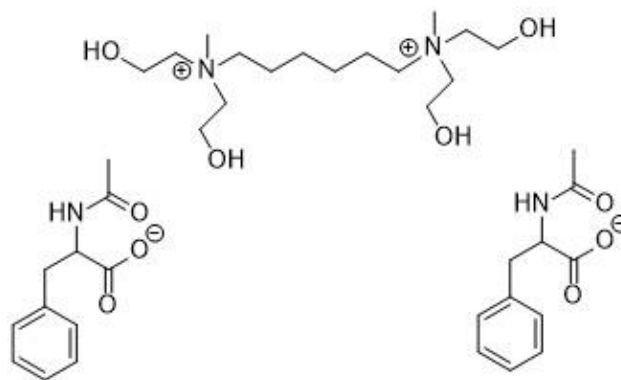


Figura 0.7 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_6][AcPhe]_2$ . Diacetilfenilalatinato de  $N,N'$ -dimetil- $N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietyl)-1,6-hexanodiamónio (7)

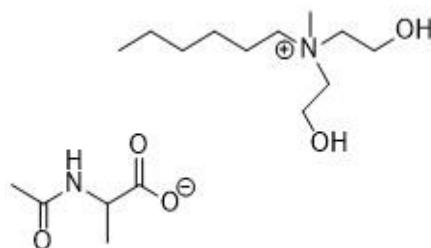


Figura 0.8 -  $[N_{1,62(OH)2(OH)}][AcAla]$ . Acetilalatinato de  $N,N$ -di(2-hidroxietyl)- $N$ -metil-1-hexanoamónio (8)

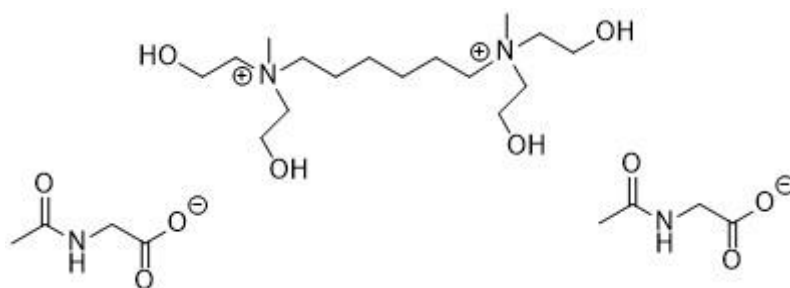


Figura 0.9 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_6][AcGly]_2$ . Diacetilglicinato de  $N,N'$ -dimetil- $N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietyl)-1,6-hexanodiamónio (9)

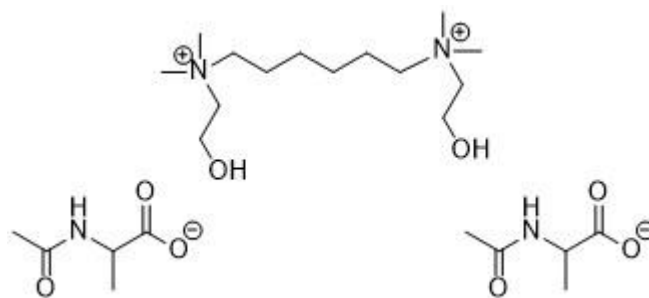


Figura 0.10 -  $[(N_{112OH})_2C_6][AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de  $N,N'$  - di(2 - hidroxietil) -  $N,N,N',N'$  - tetrametil - 1,6 - hexanodiamónio (10)

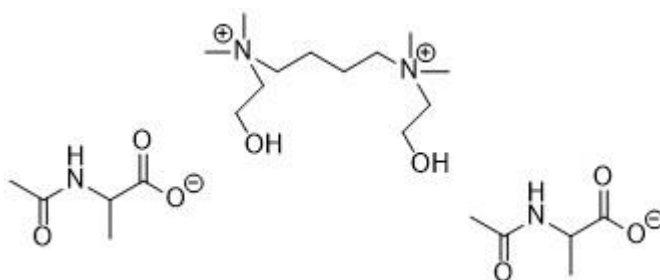


Figura 0.11 -  $[(N_{112OH})_2C_4][AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de  $N,N'$  - di(2 - hidroxietil) -  $N,N,N',N'$  - tetrametil - 1,4 - butanodiamónio (11)

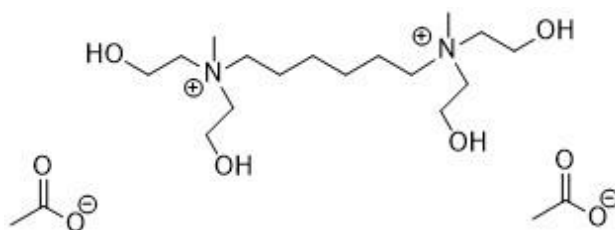


Figura 0.12 -  $[(N_{12OH2OH})_2C_6][CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de  $N,N'$  - dimetil -  $N,N,N',N'$  - tetra(2 - hidroxietil) - 1,6 - hexanodiamónio (12)

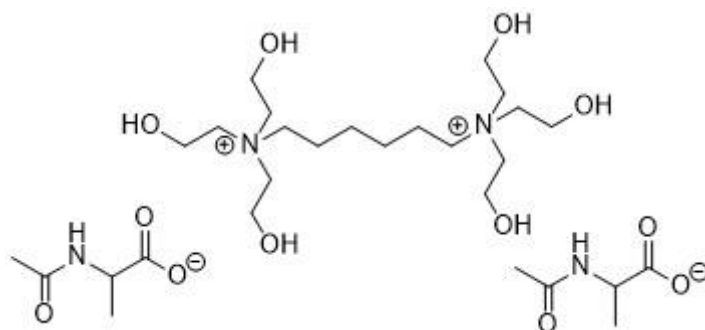


Figura 0.13 -  $[(N_{2OH2OH2OH})_2C_6][AcAla]_2$ . Diacetilalalinato de  $N,N,N',N',N',N'$  - hexa(2 - hidroxietil) - 1,6 - hexanodiamónio (13)

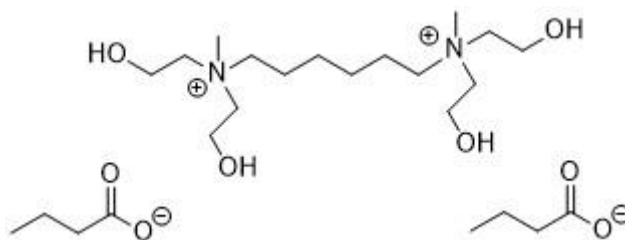


Figura 0.14 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_6][CH_3CH_2CH_2CO_2]_2$ . Dibutanoato de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietil) - 1,6-hexanodiamónio (14)

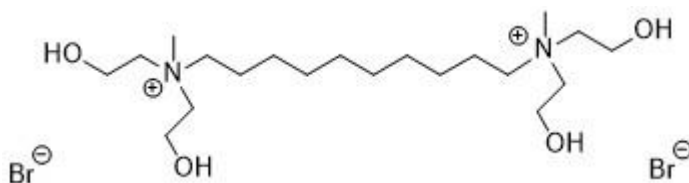


Figura 0.15 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_{10}]Br_2$ . Dibrometo de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietil) - 1,10-decanodiamónio (15)

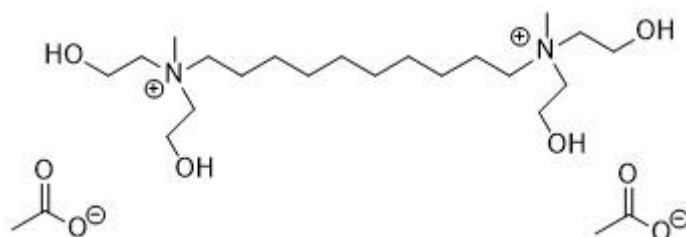


Figura 0.16 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_{10}][CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietil) - 1,10-decanodiamónio (16)

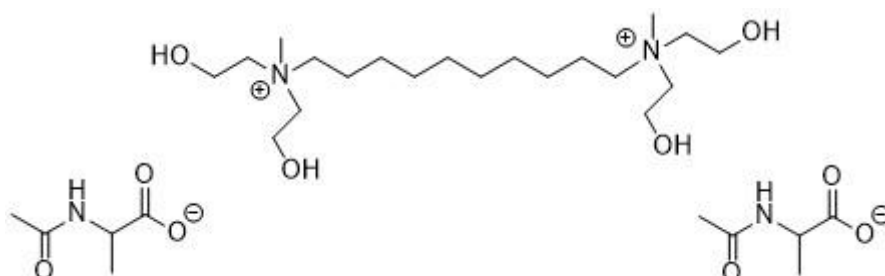


Figura 0.17 -  $[(N_{1,2OH,2OH})_2C_{10}][AcAla]_2$ . Diacetilalinato de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietil) - 1,10-decanodiamónio (17)

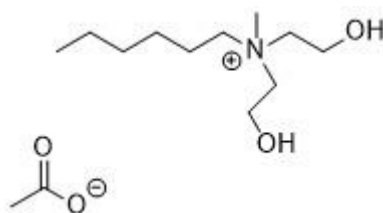


Figura 0.18 -  $[N_{162(OH)_2(OH)}][CH_3CO_2]$ . Acetato de  $N,N$ -di(2-hidroxietyl) -  $N$ -metil - 1-hexanoamónio (18)

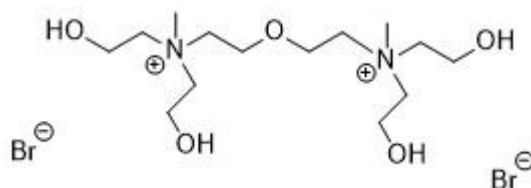


Figura 0.19 -  $[(N_{12OH2OH})_2C_2OC_2] Br_2$ . Dibrometo de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietyl) - dietiletéramónio (19)

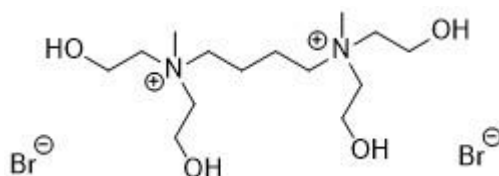


Figura 0.20 -  $[(N_{12OH2OH})_2C_4] Br_2$ . Dibrometo de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietyl) - 1,4-butanodiamónio (20)

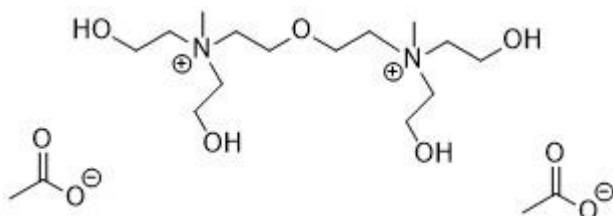


Figura 0.21 -  $[(N_{12OH2OH})_2C_2OC_2] [CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietyl) - dietiletéramónio (21)

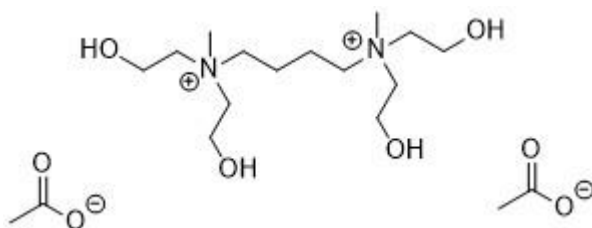


Figura 0.22 -  $[(N_{12OH2OH})_2C_4] [CH_3CO_2]_2$ . Diacetato de  $N,N'$ -dimetil -  $N,N,N',N'$ -tetra(2-hidroxietyl) - 1,4-butanodiamónio (22)

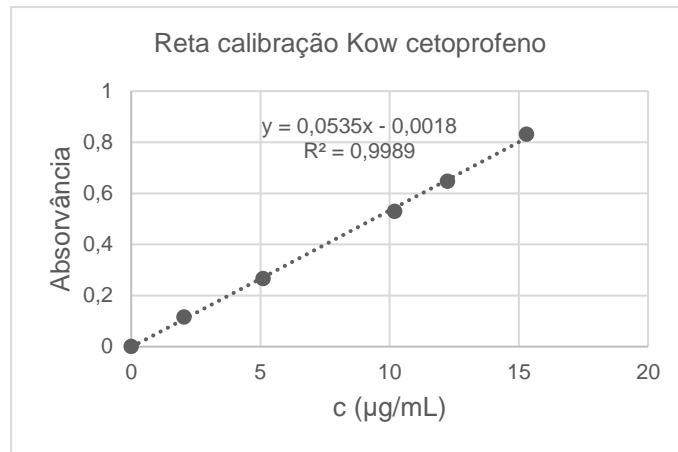


Figura 0.23 - Reta de calibração do cetoprofeno para os ensaios do coeficiente de partição e log P.

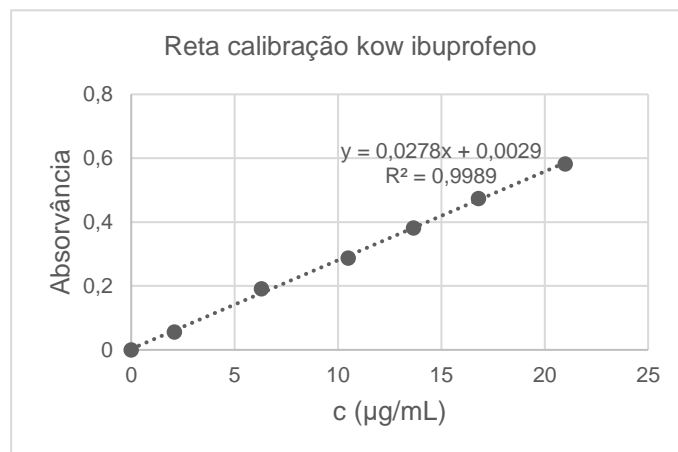


Figura 0.24 - Reta de calibração do ibuprofeno para os ensaios do coeficiente de partição e log P.

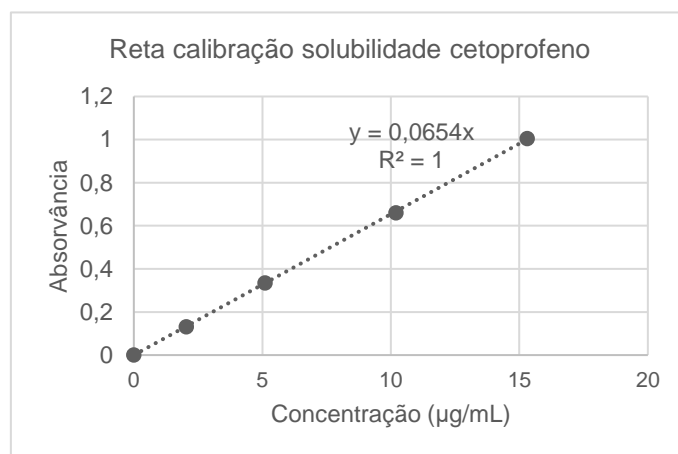


Figura 0.25 - Reta de calibração do cetoprofeno para os ensaios de solubilidade.

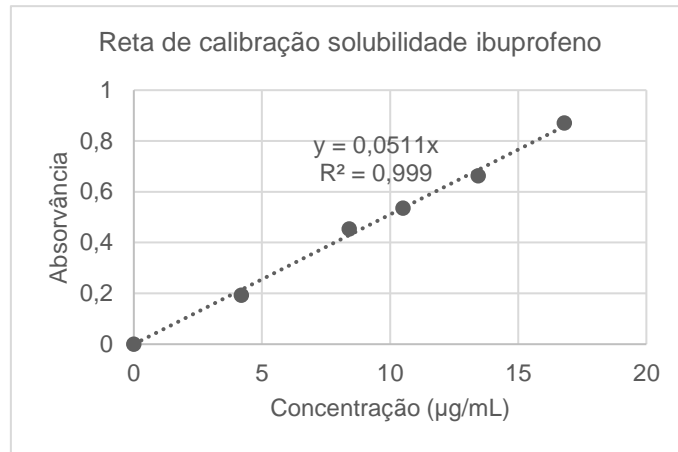


Figura 0.26 - Reta de calibração do ibuprofeno para os ensaios de solubilidade.

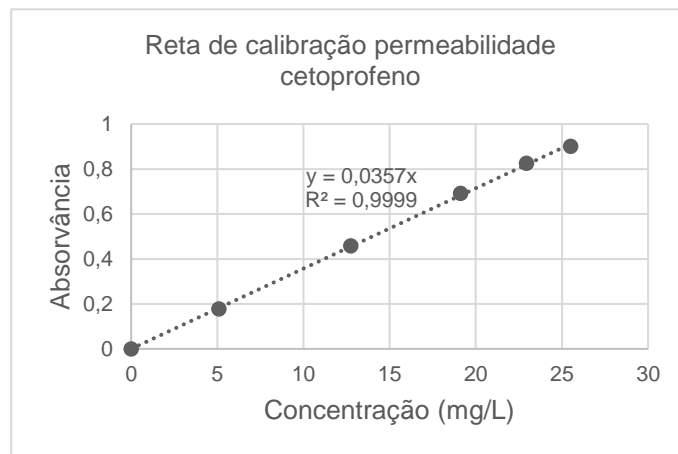


Figura 0.27 - Reta de calibração do cetoprofeno para os ensaios de permeabilidade.

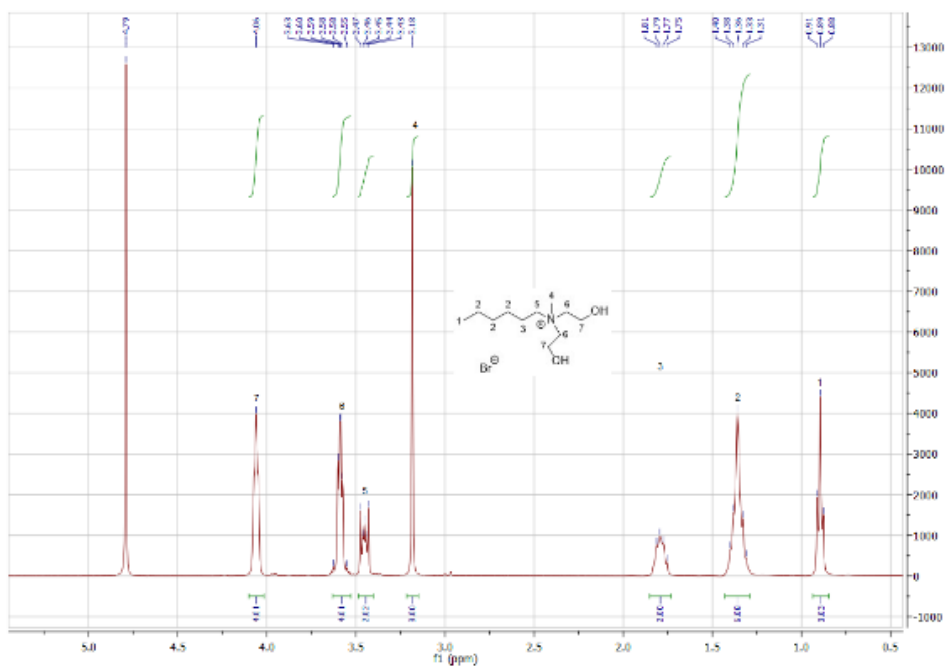


Figura 0.28 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[\text{N}_{162\text{OH}2\text{OH}}] \text{Br}$  (2) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

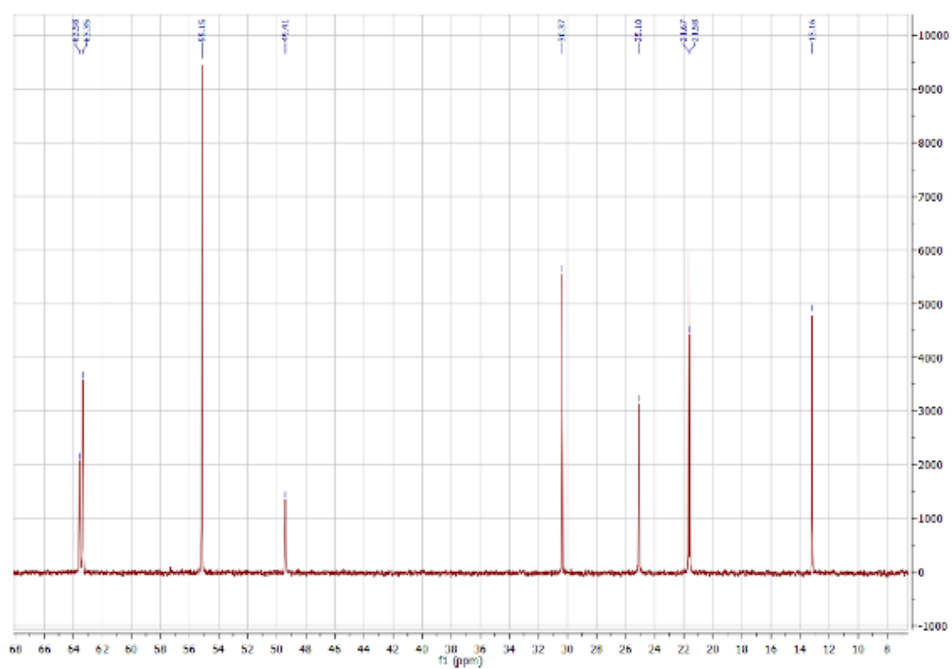


Figura 0.29 - Espetro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[\text{N}_{162\text{OH}2\text{OH}}] \text{Br}$  (2) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

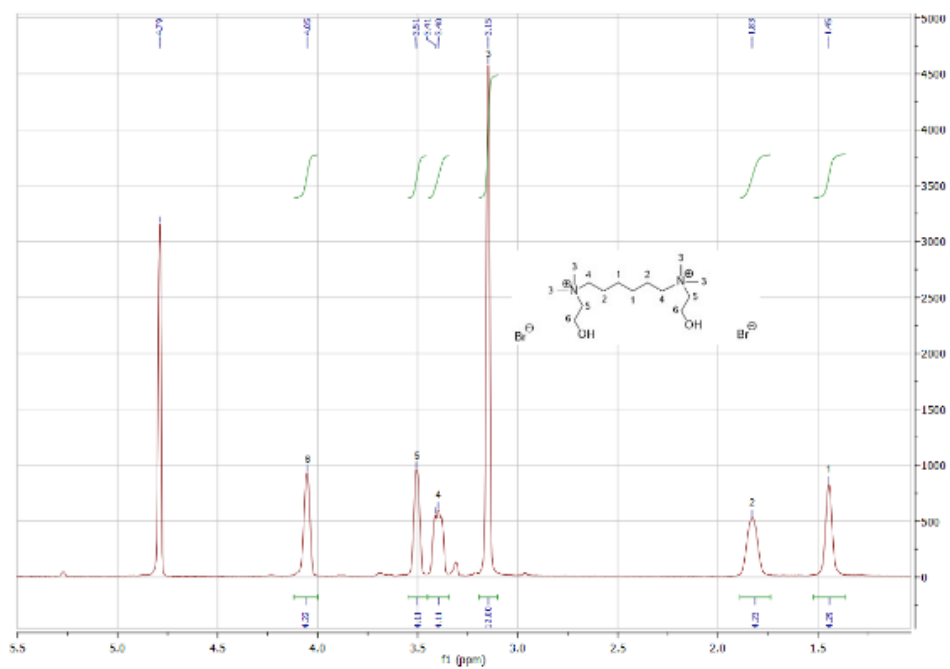


Figura 0.30 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{112}\text{OH})_2\text{C}_6]\text{Br}_2$  (3) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

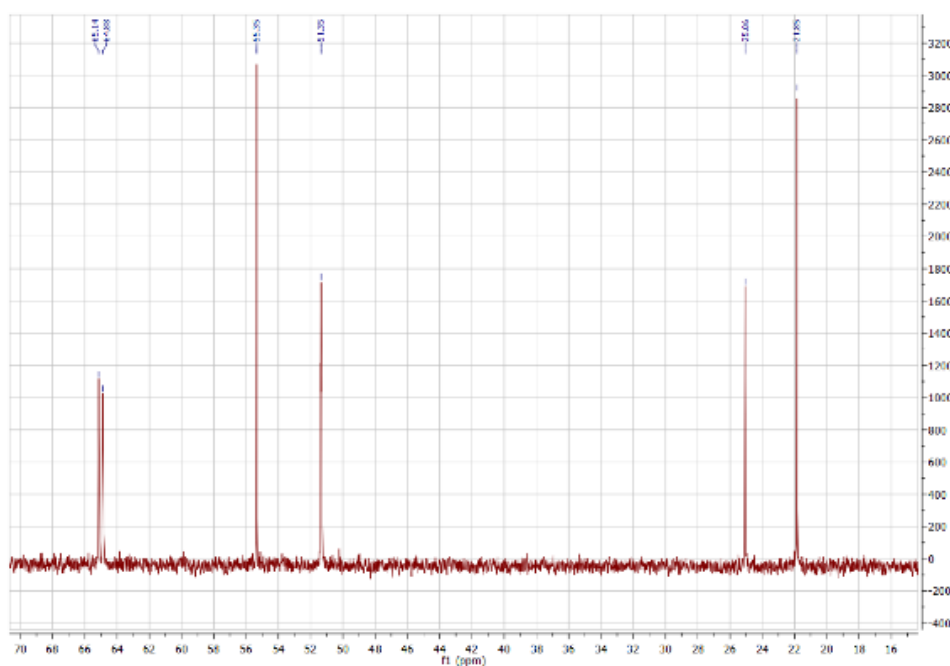


Figura 0.31 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{112}\text{OH})_2\text{C}_6]\text{Br}_2$  (3) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

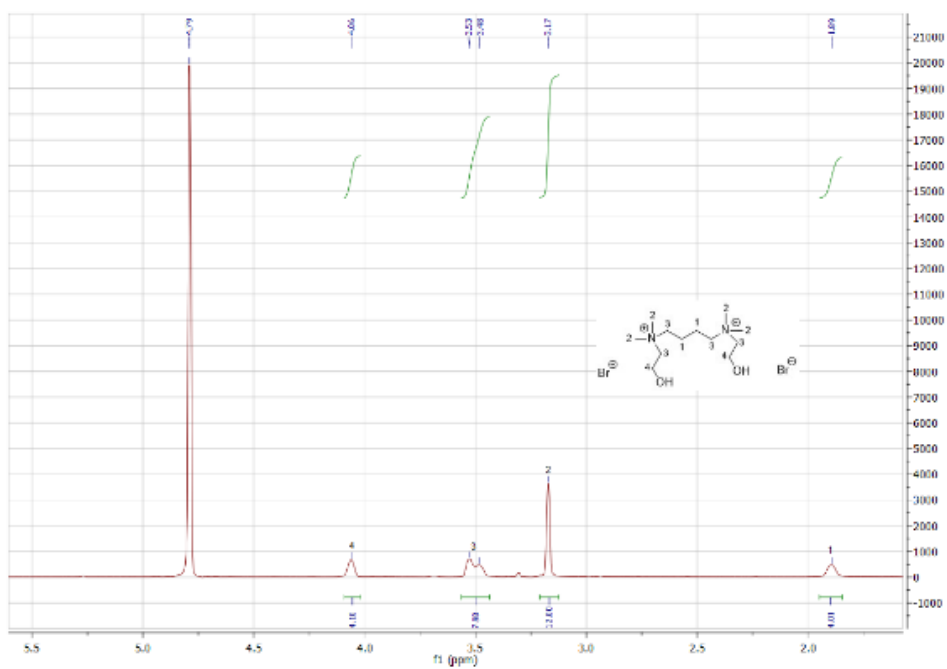


Figura 0.32 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{112}\text{OH})_2\text{C}_4] \text{Br}_2$  (4) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

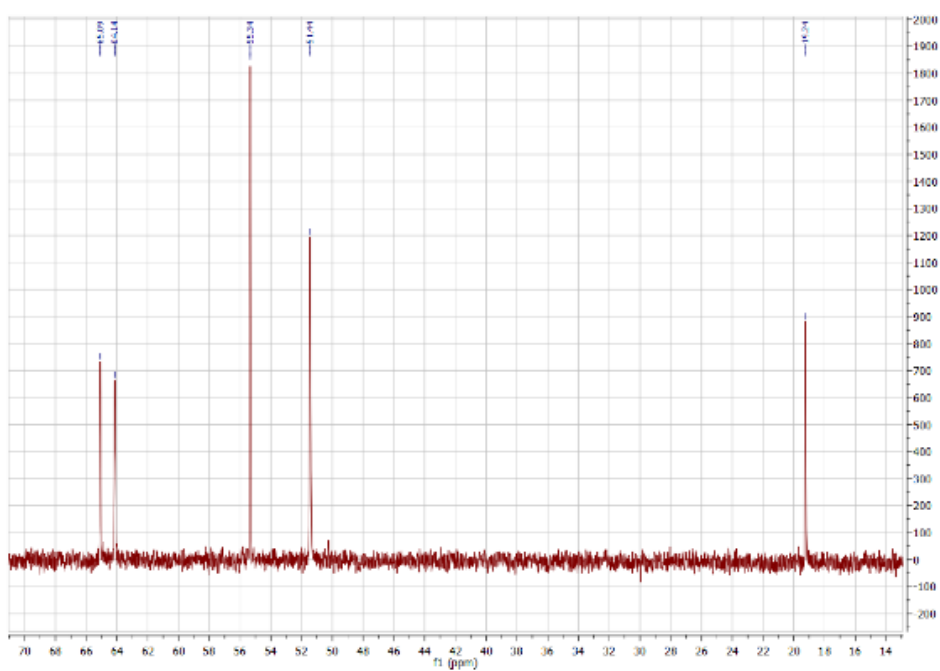


Figura 0.33 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{112}\text{OH})_2\text{C}_4] \text{Br}_2$  (4) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

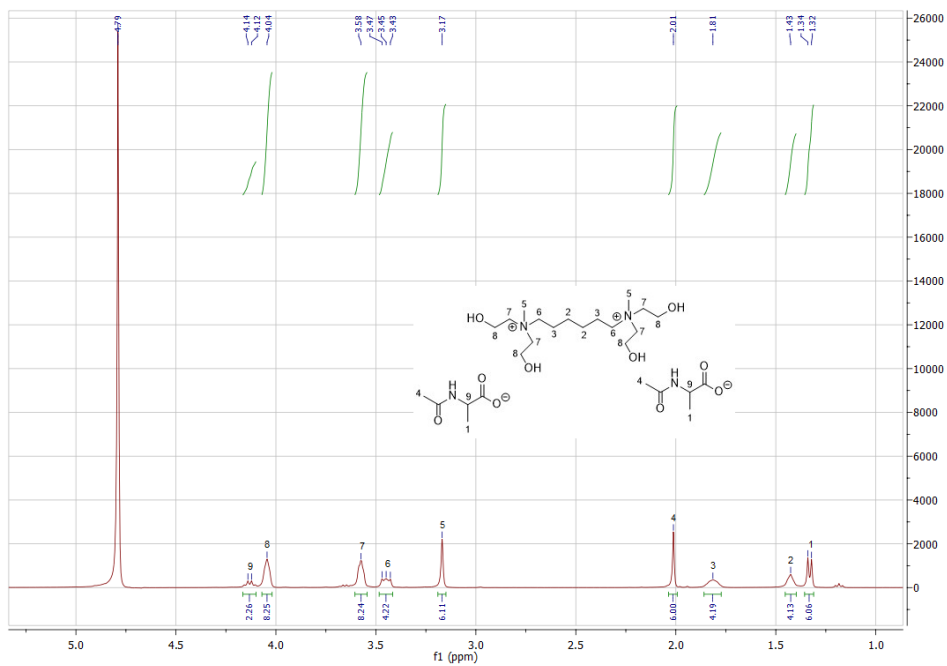


Figura 0.34 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_6][\text{AcAla}]_2$  (6) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

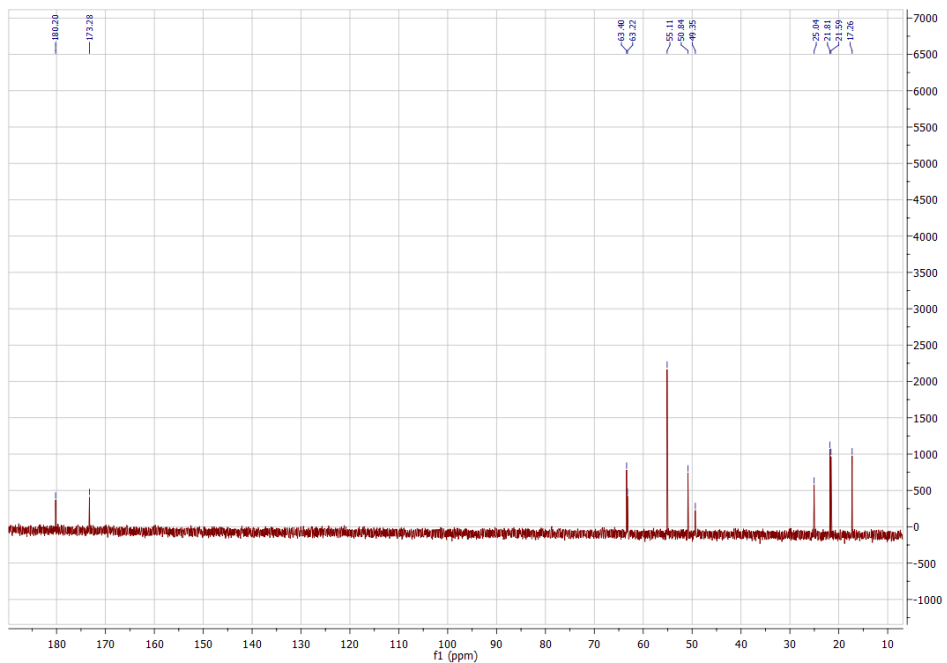


Figura 0.35 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_6][\text{AcAla}]_2$  (6) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

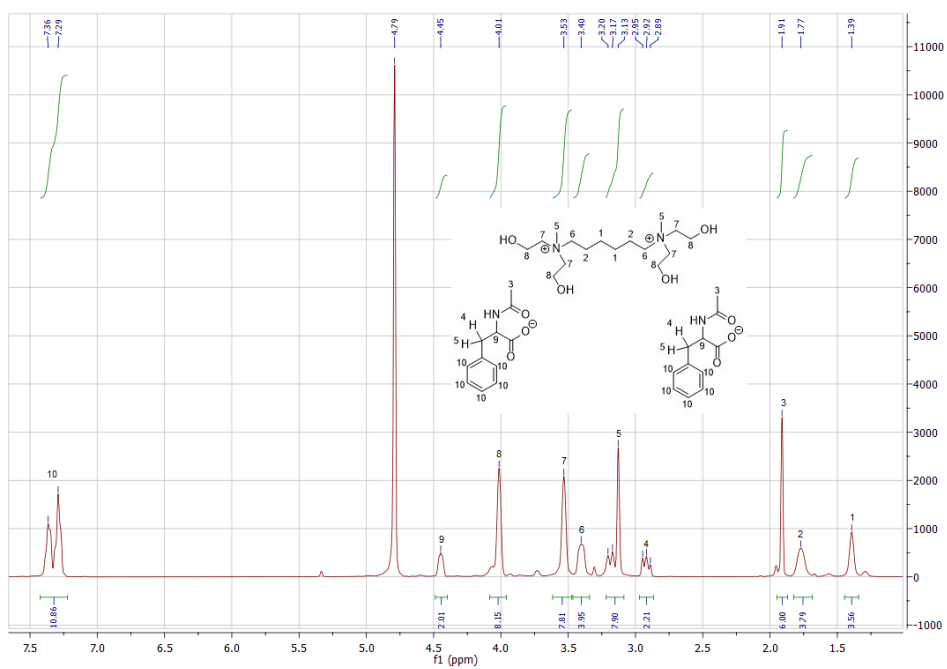


Figura 0.36 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_6][\text{AcPhe}]_2$  (7) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

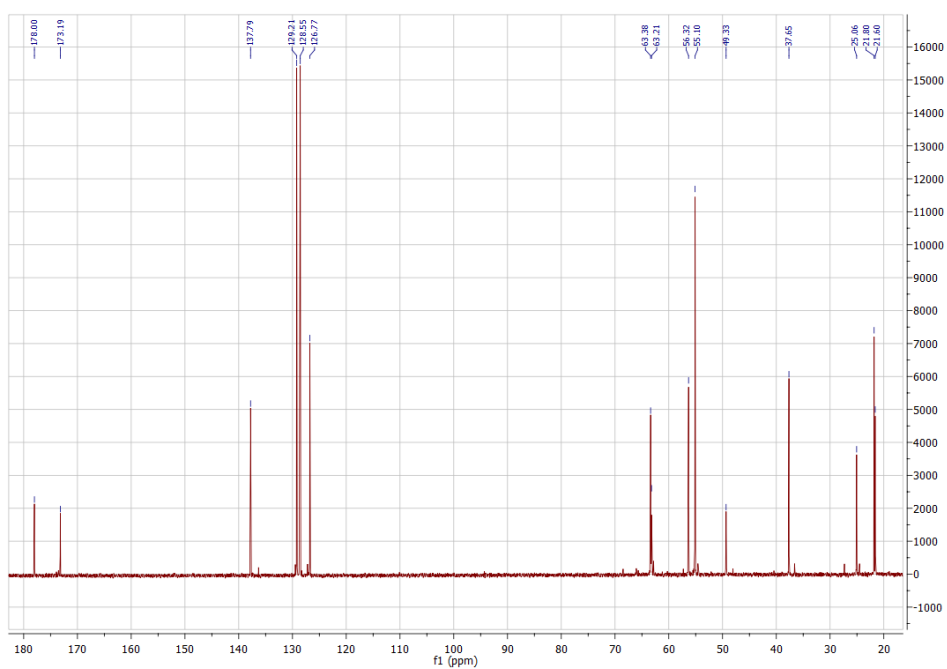


Figura 0.37 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_6][\text{AcPhe}]_2$  (7) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

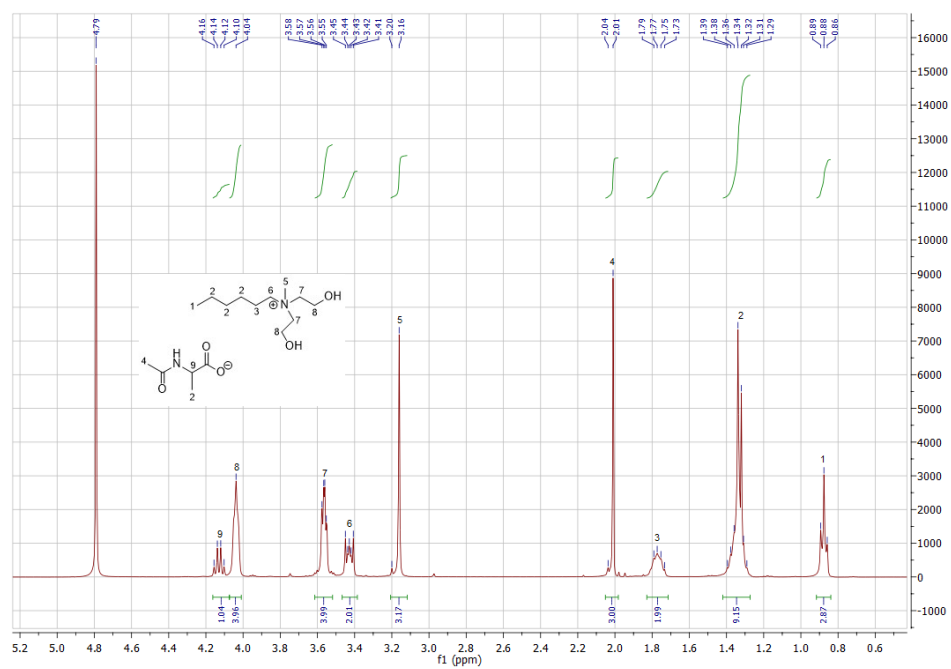


Figura 0.38 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[\text{N}_{162}\text{OH}_2\text{OH}][\text{AcAla}]$  (8) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

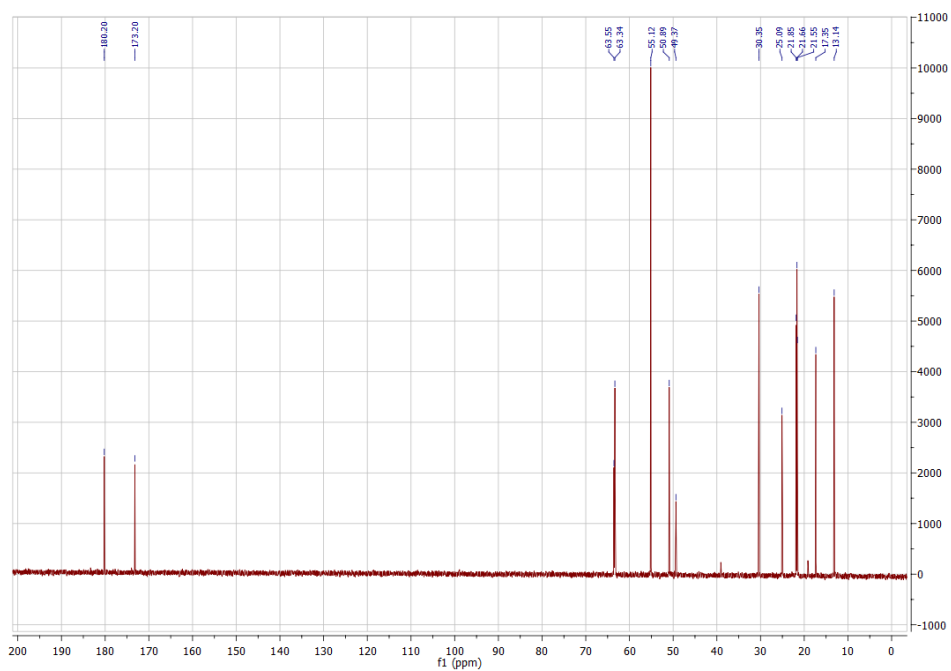


Figura 0.39 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[\text{N}_{162}\text{OH}_2\text{OH}][\text{AcAla}]$  (8) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

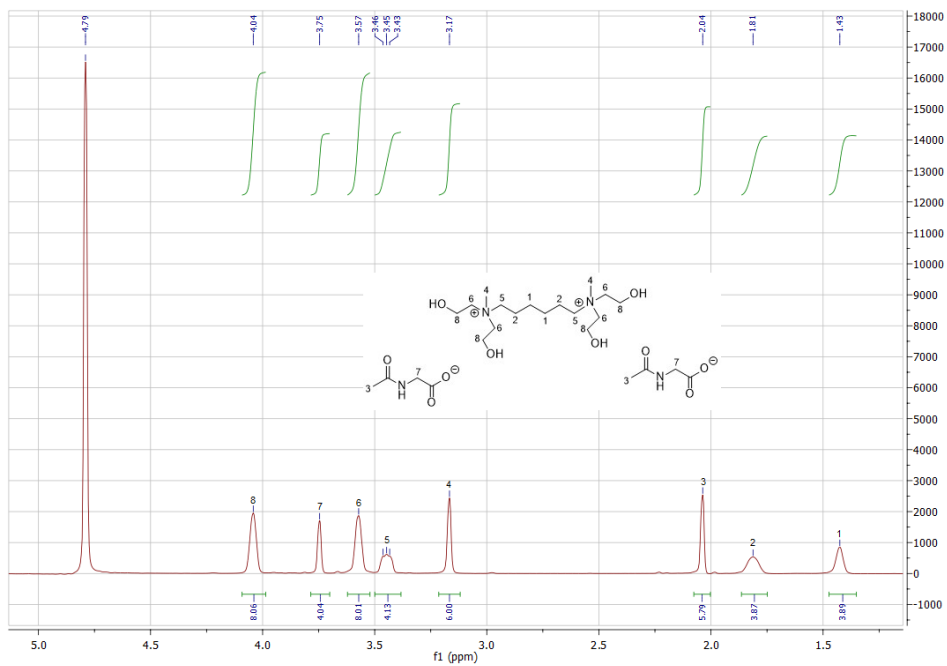


Figura 0.40 - Espetro <sup>1</sup>H RMN do líquido iônico [(N<sub>12</sub>OH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>][AcGly]<sub>2</sub> (9) em D<sub>2</sub>O.

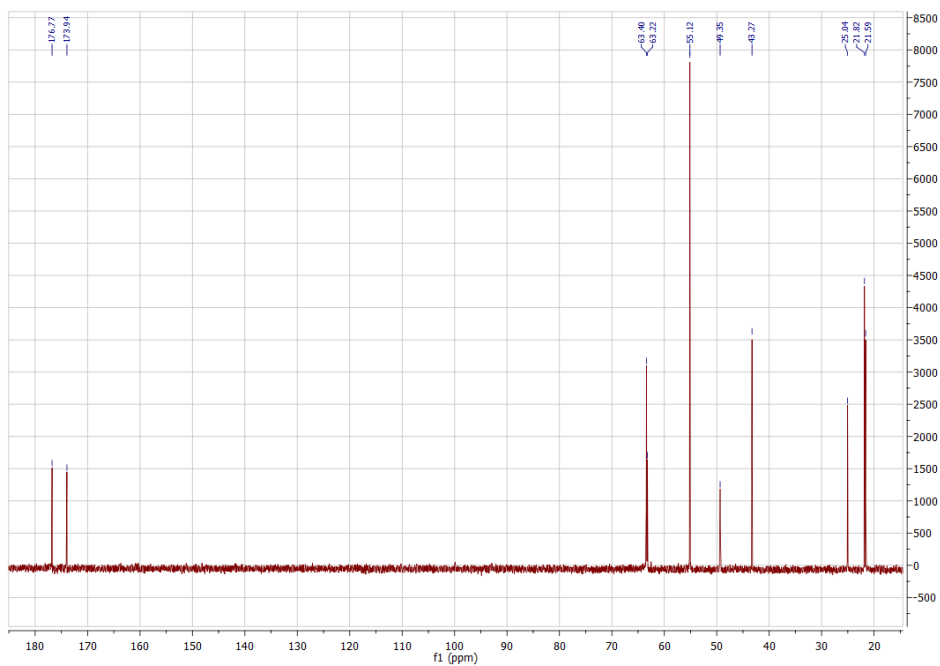


Figura 0.41 - Espetro <sup>13</sup>C RMN do líquido iônico [(N<sub>12</sub>OH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>][AcGly]<sub>2</sub> (9) em D<sub>2</sub>O.

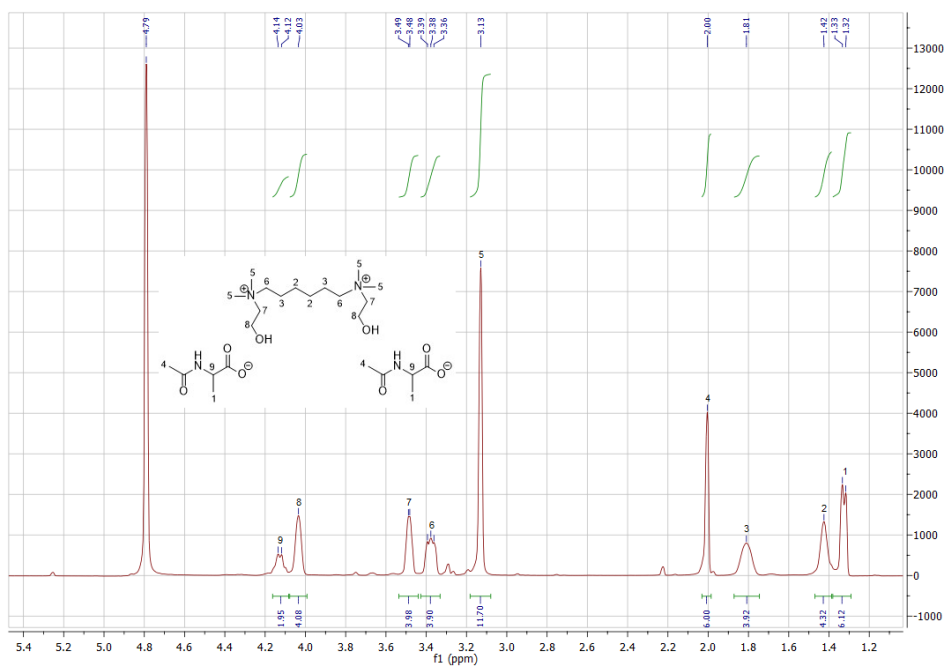


Figura 0.42 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{112}\text{OH})_2\text{C}_6][\text{AcAla}]_2$  (10) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

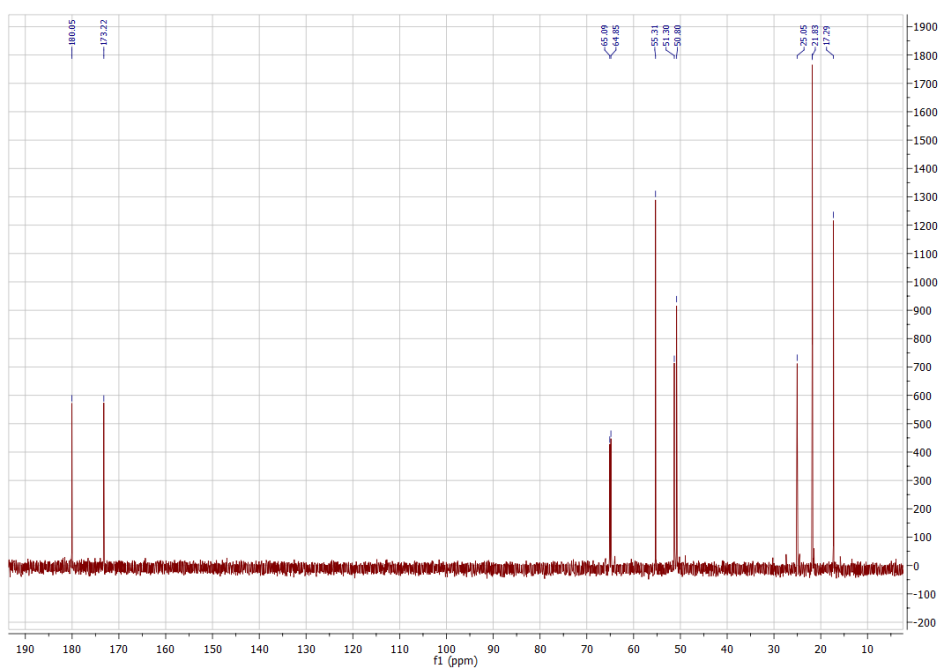


Figura 0.43 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{112}\text{OH})_2\text{C}_6][\text{AcAla}]_2$  (10) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

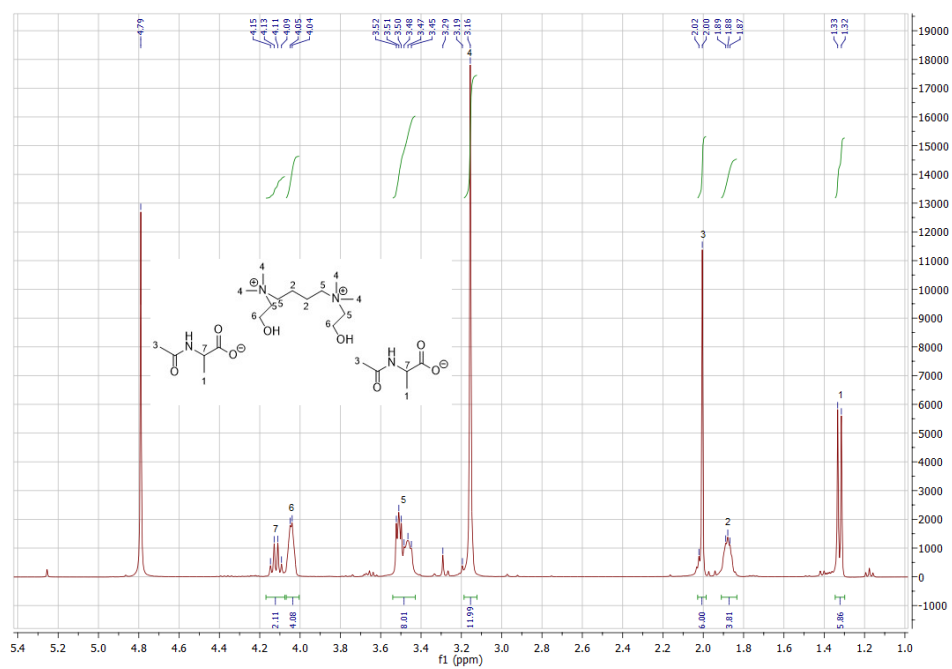


Figura 0.44 - Espectro  $^1H$  RMN do líquido iônico  $[(N_{112OH})_2C_4][AcAla]_2$  (11) em  $D_2O$ .

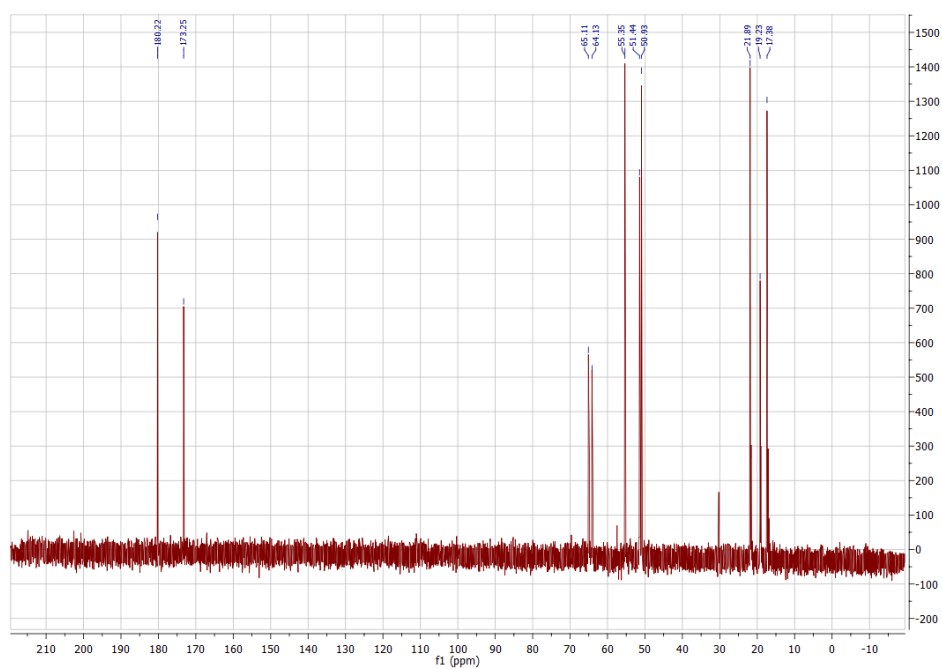


Figura 0.45 - Espectro  $^{13}C$  RMN do líquido iônico  $[(N_{112OH})_2C_4][AcAla]_2$  (11) em  $D_2O$ .

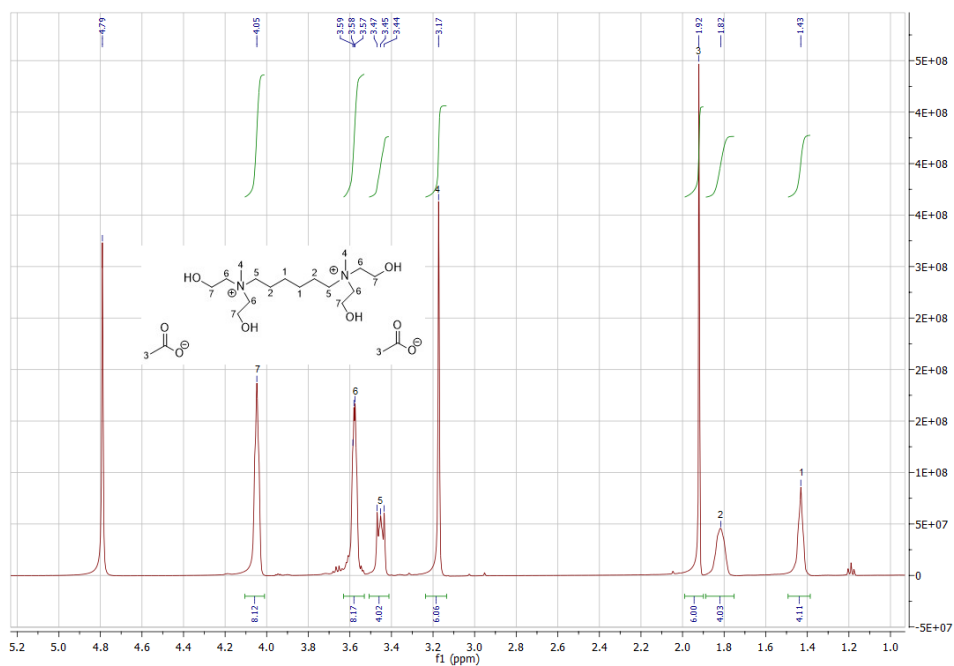


Figura 0.46 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(N_{12OH2OH})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  (12) em  $D_2O$ .

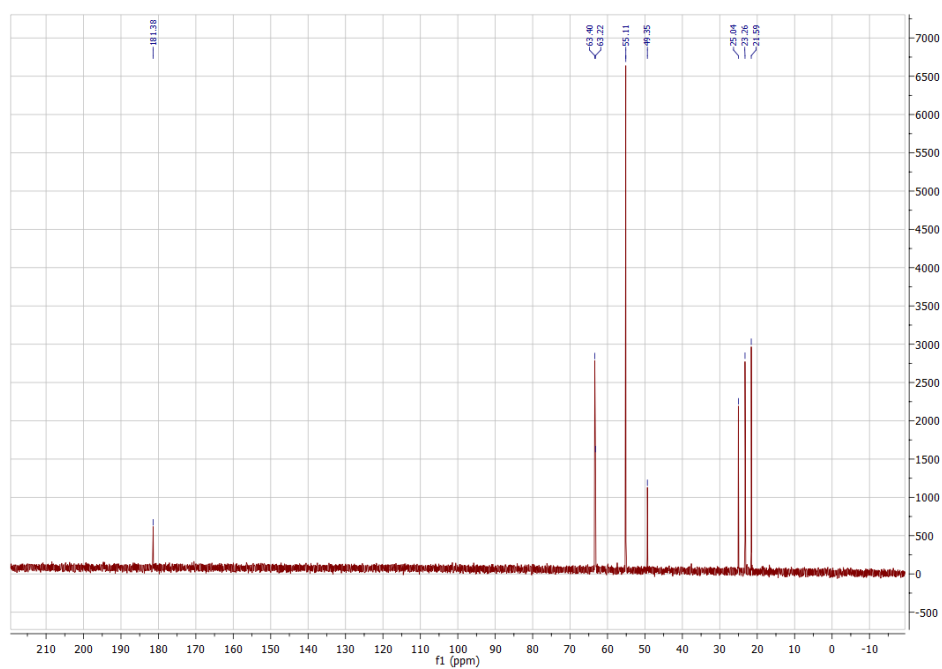


Figura 0.47 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(N_{12OH2OH})_2C_6][CH_3CO_2]_2$  (12) em  $D_2O$ .

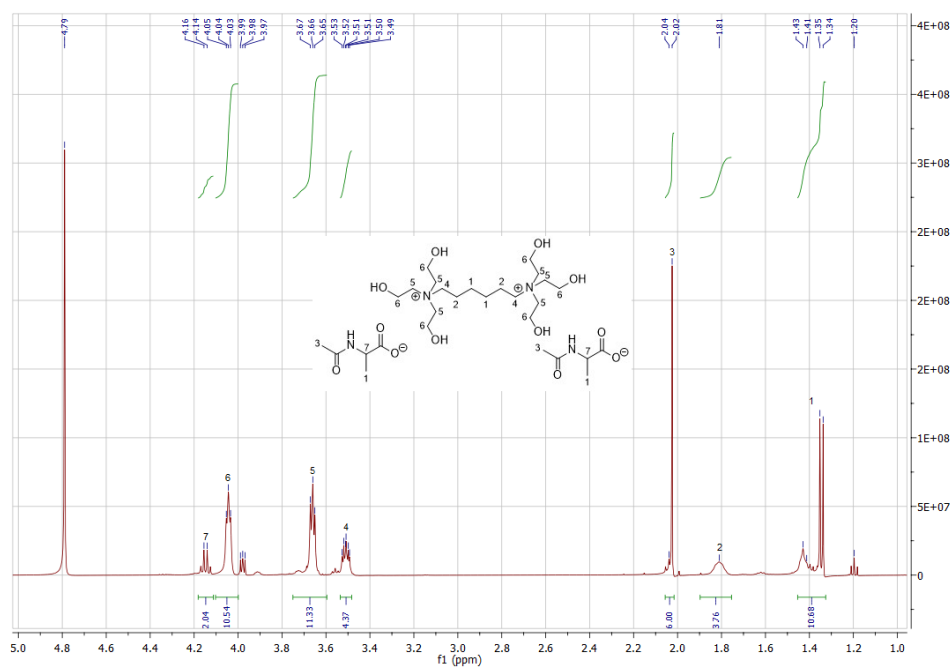


Figura 0.48 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{2\text{OH}2\text{OH}})_2\text{C}_6][\text{AcAla}]_2$  (13) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

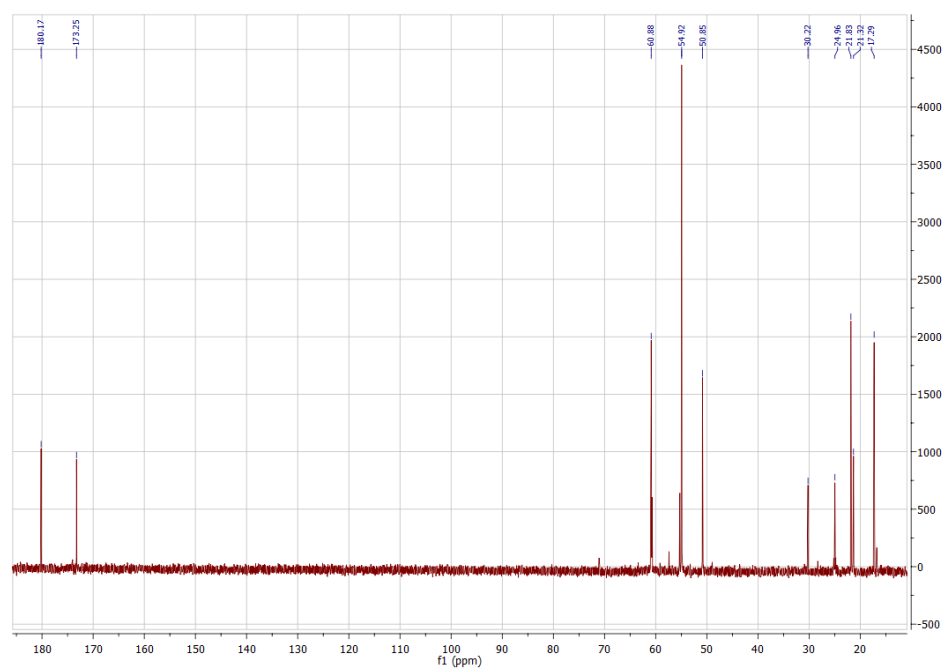


Figura 0.49 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{2\text{OH}2\text{OH}})_2\text{C}_6][\text{AcAla}]_2$  (13) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

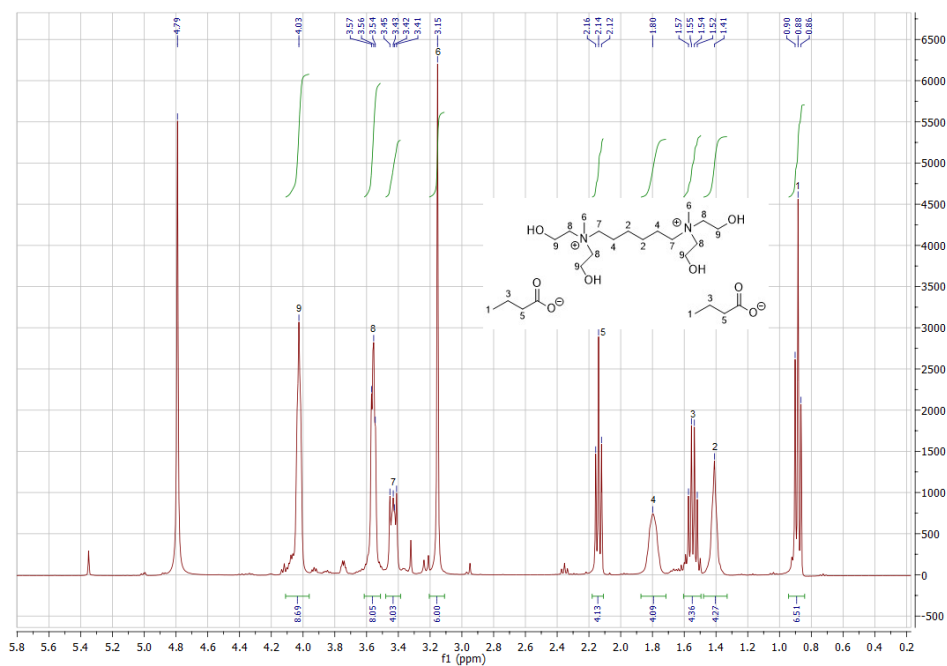


Figura 0.50 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{1,2\text{OH}})_2\text{C}_6][\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2]_2$  (14) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

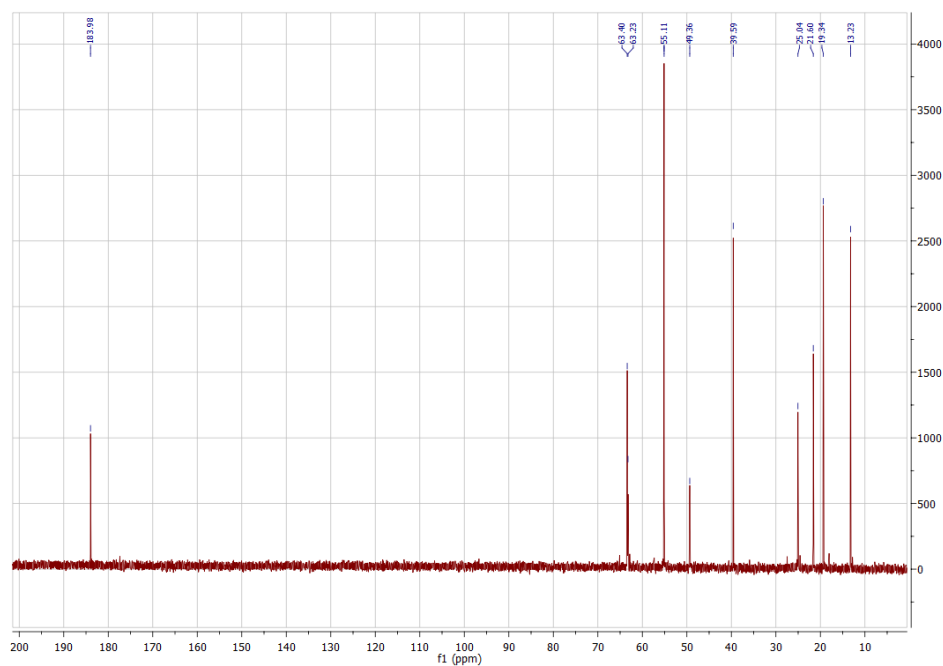


Figura 0.51 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{1,2\text{OH}})_2\text{C}_6][\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2]_2$  (14) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

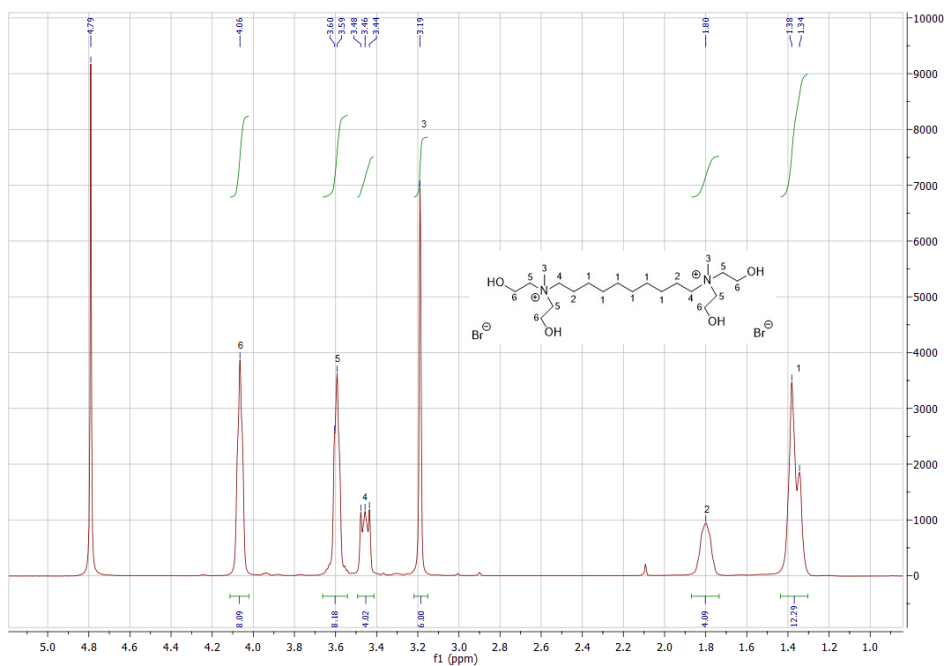


Figura 0.52 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_{10}] \text{Br}_2$  (15) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

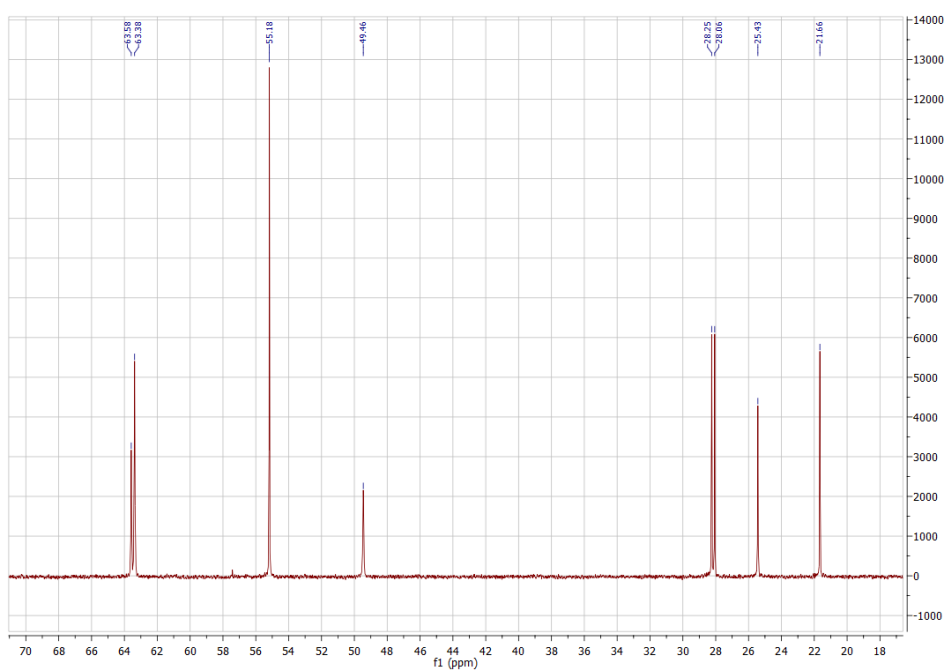


Figura 0.53 - Espetro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_{10}] \text{Br}_2$  (15) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

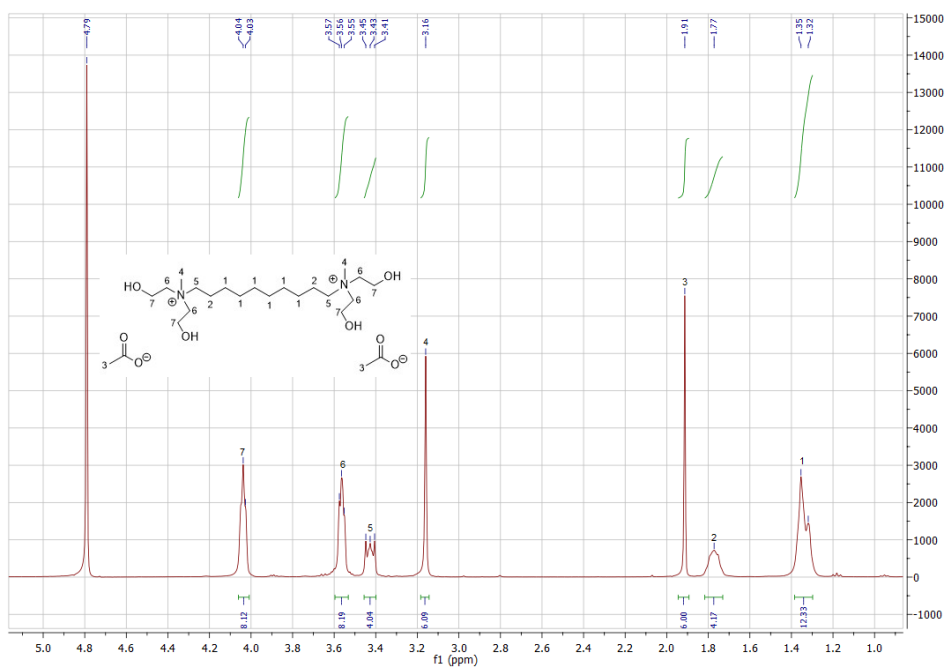


Figura 0.54 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_{10}][\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$  (16) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

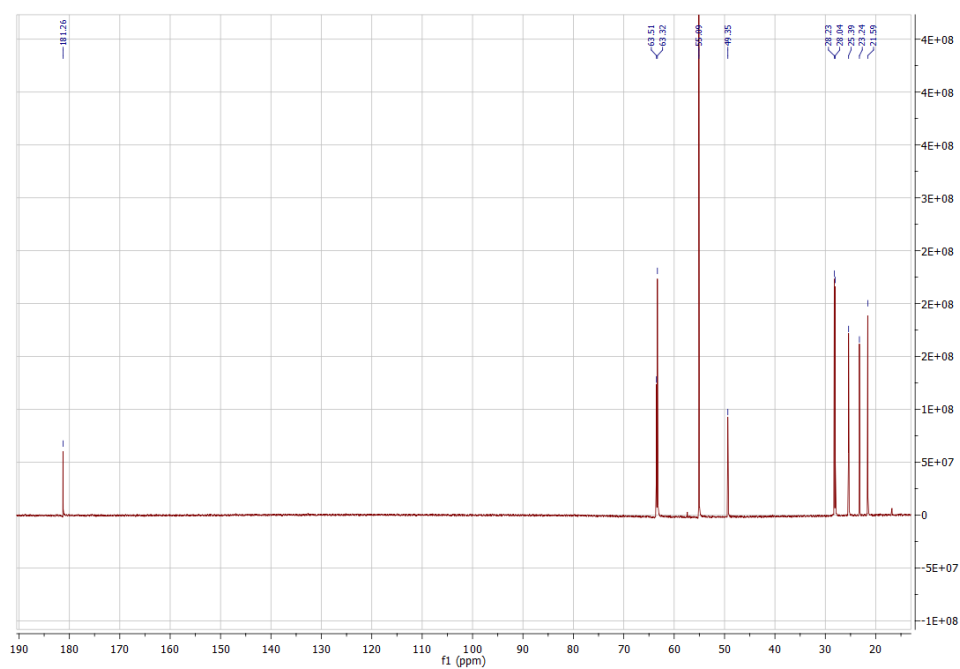


Figura 0.55 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_{10}][\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$  (16) em  $\text{D}_2\text{O}$ .



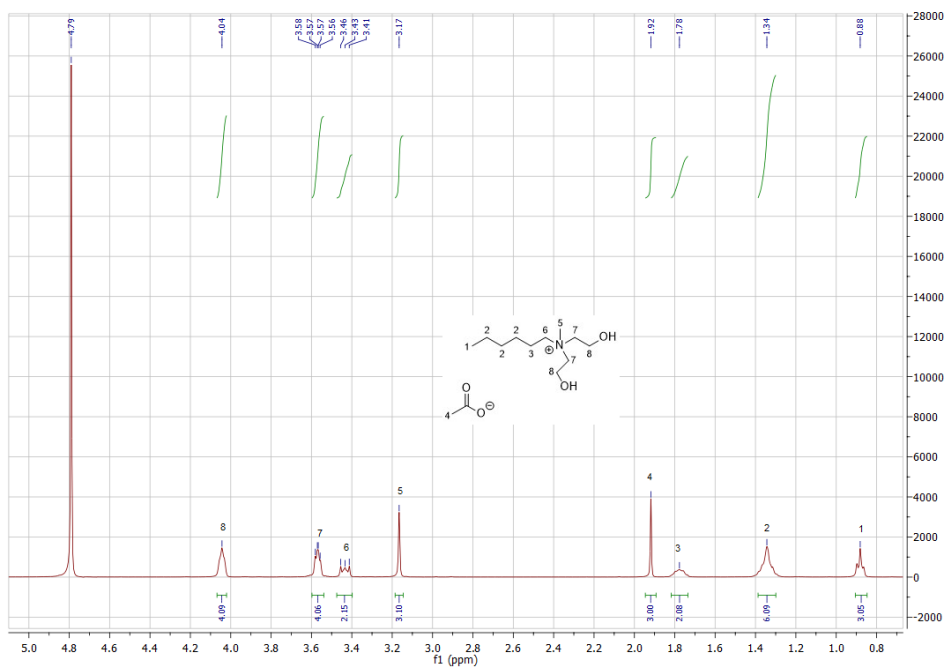


Figura 0.58 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[\text{N}_{162\text{OH}2\text{OH}}][\text{CH}_3\text{CO}_2]$  (18) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

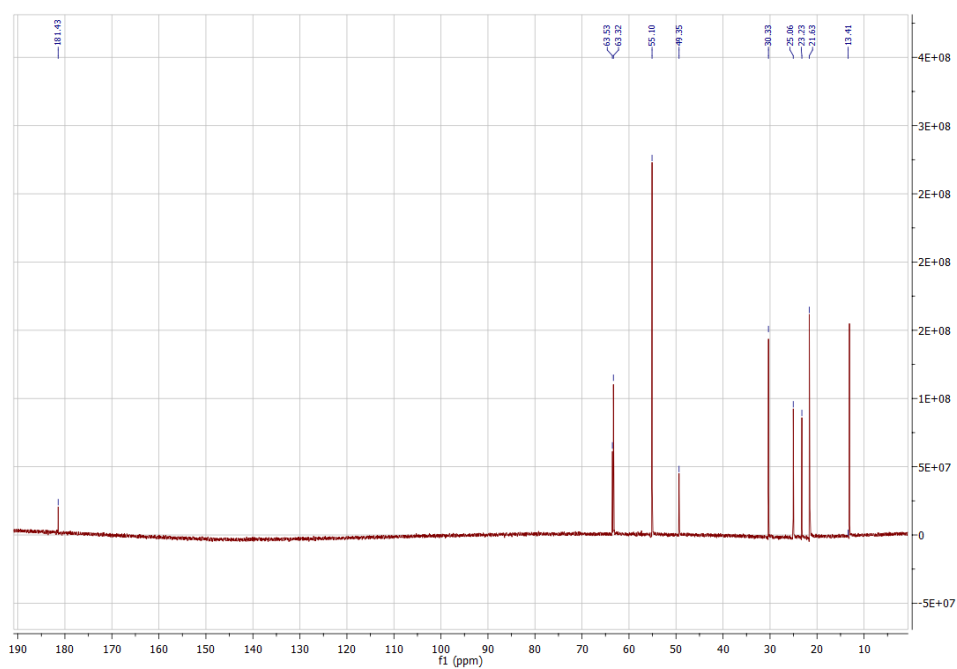


Figura 0.59 - Espetro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[\text{N}_{162\text{OH}2\text{OH}}][\text{CH}_3\text{CO}_2]$  (18) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

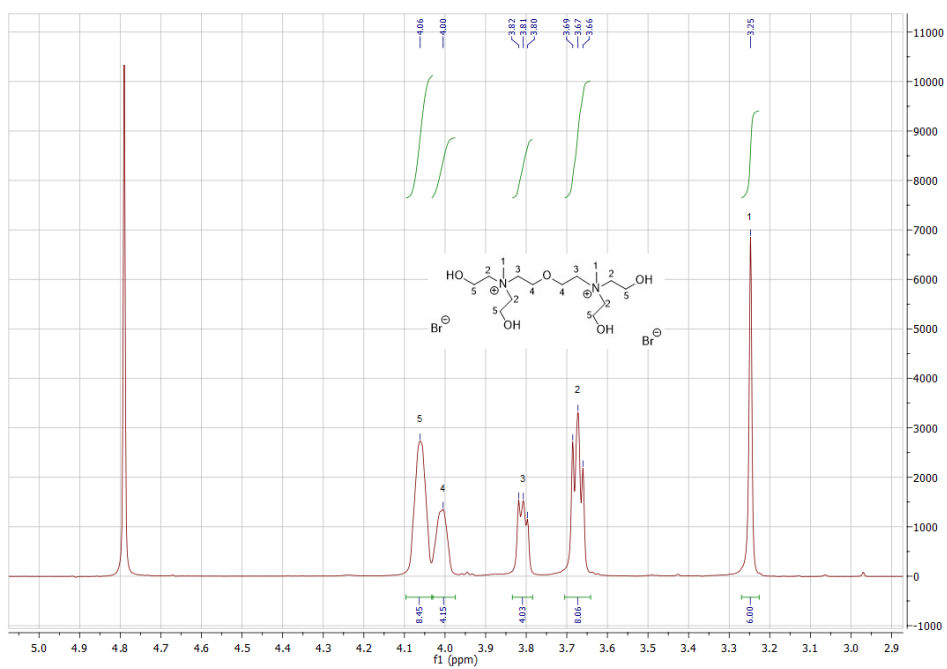


Figura 0.60 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_{20\text{H}})_2\text{C}_2\text{OC}_2] \text{Br}_2$  (19) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

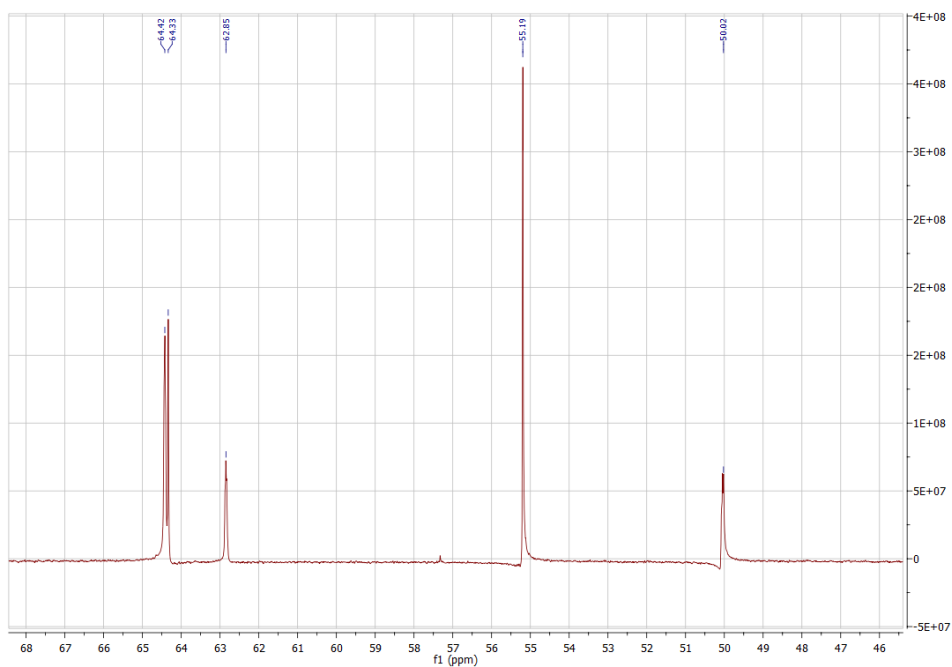


Figura 0.61 - Espetro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_{20\text{H}})_2\text{C}_2\text{OC}_2] \text{Br}_2$  (19) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

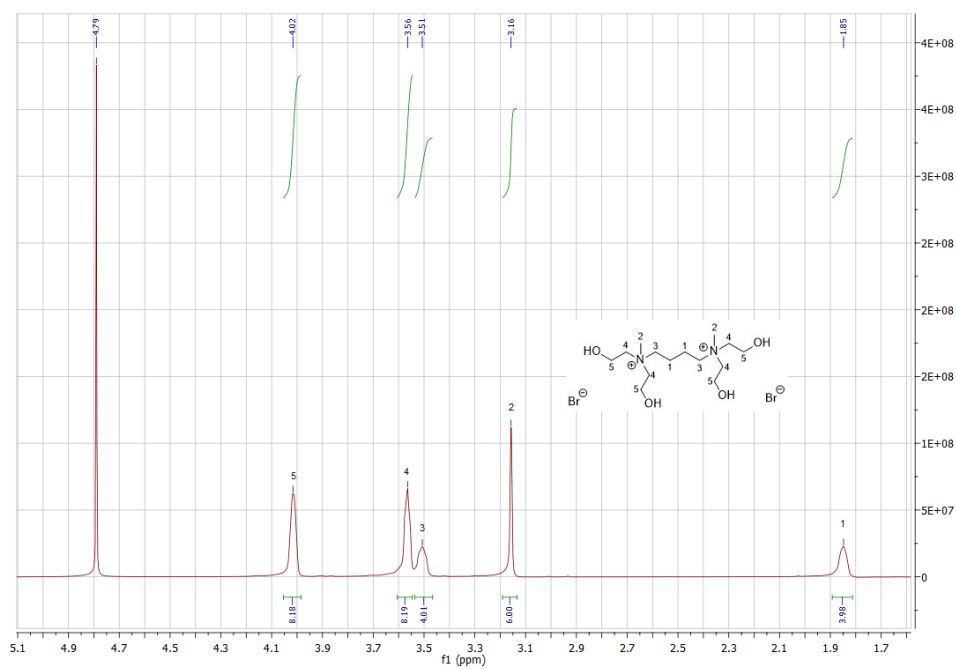


Figura 0.62 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{1,2}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_4]\text{Br}_2$  (20) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

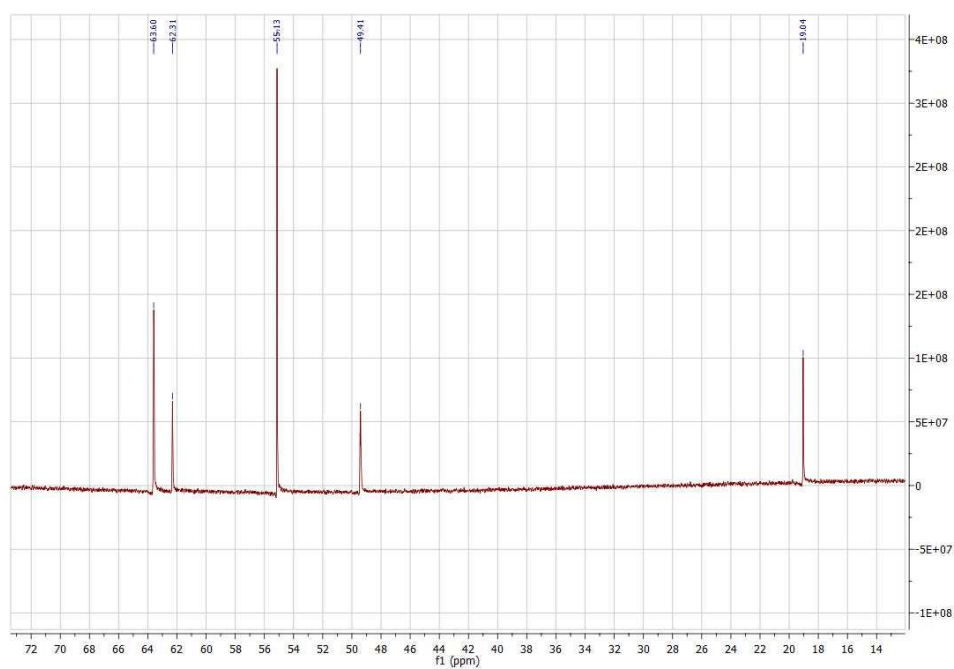


Figura 0.63 - Espetro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{1,2}\text{OH}_2\text{OH})_2\text{C}_4]\text{Br}_2$  (20) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

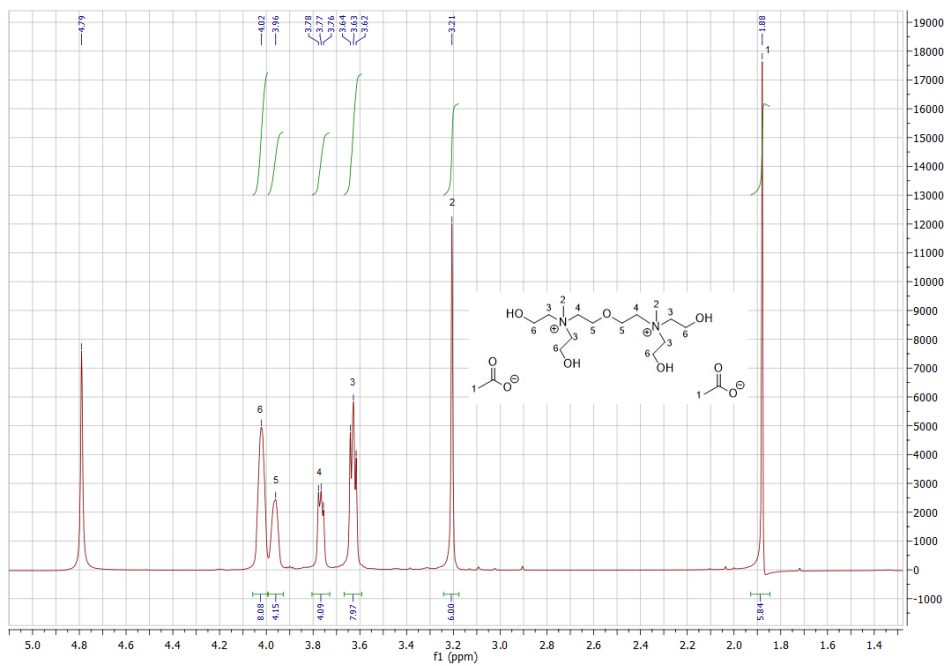


Figura 0.64 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_{2}\text{OH})_2\text{C}_2\text{OC}_2] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$  (21) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

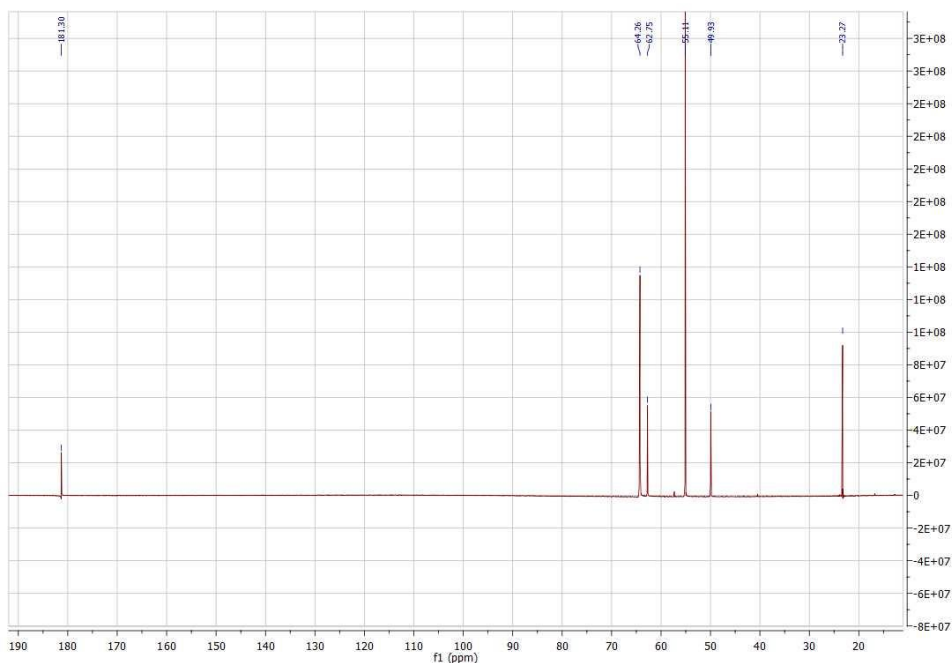


Figura 0.65 - Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_{2}\text{OH})_2\text{C}_2\text{OC}_2] [\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$  (21) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

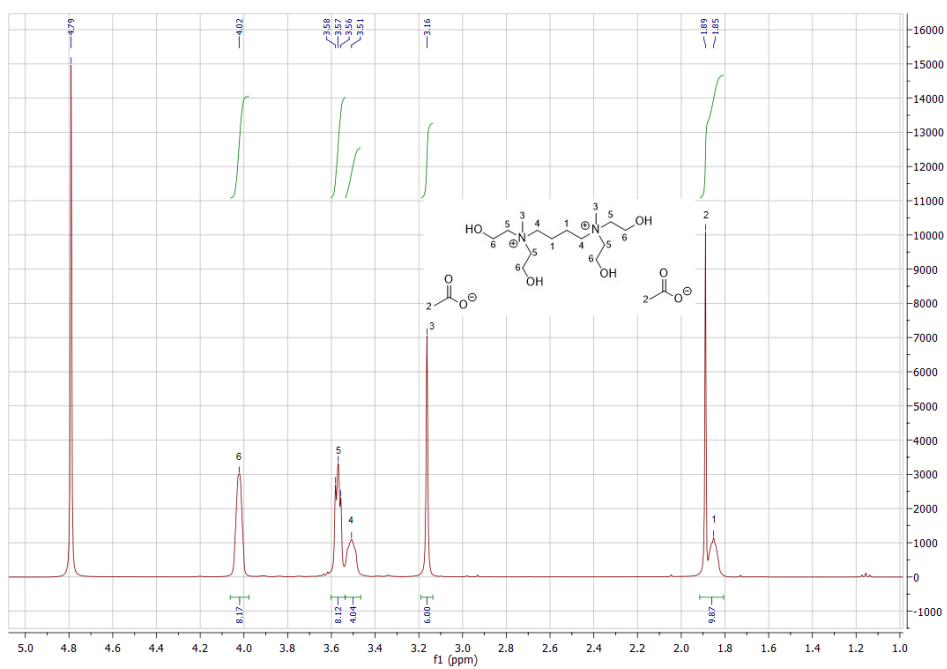


Figura 0.66 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{1,2\text{OH}2\text{OH}})_2\text{C}_4][\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$  (22) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

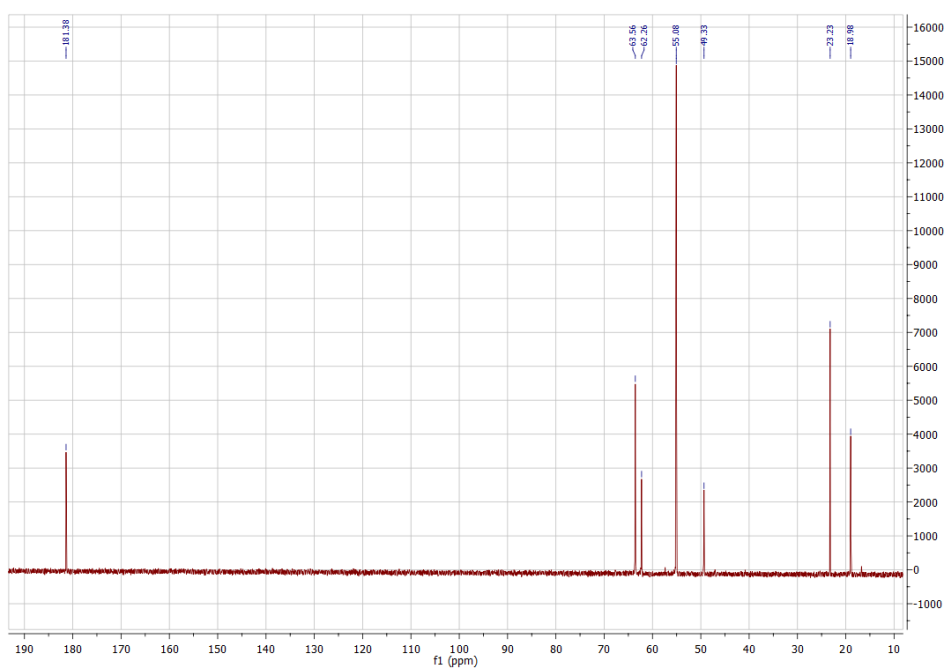


Figura 0.67 - Espetro  $^{13}\text{C}$  RMN do líquido iônico  $[(\text{N}_{1,2\text{OH}2\text{OH}})_2\text{C}_4][\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$  (22) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

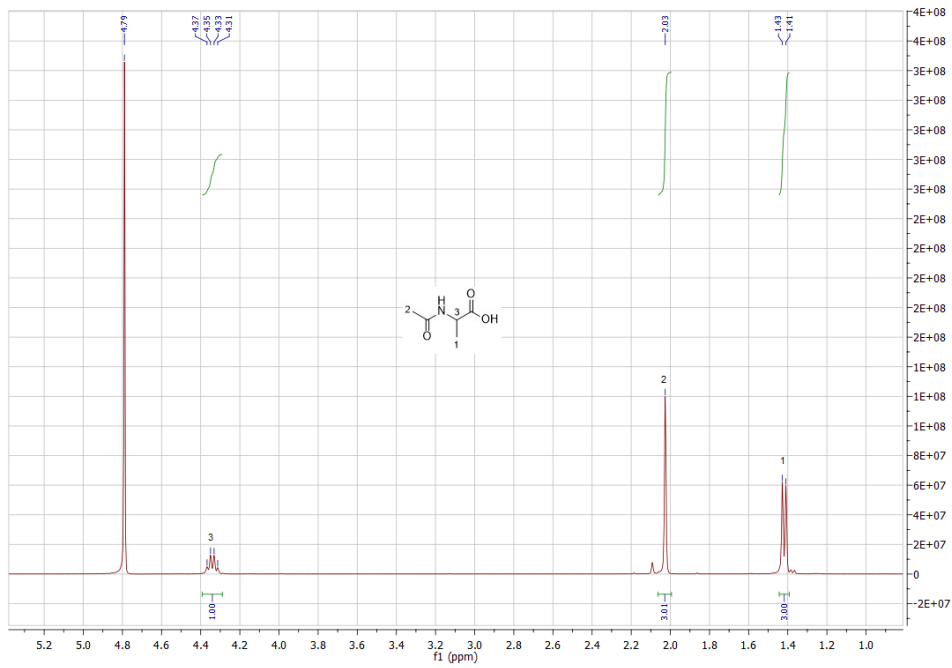


Figura 0.68 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN da N-acetil alanina em  $\text{D}_2\text{O}$ .

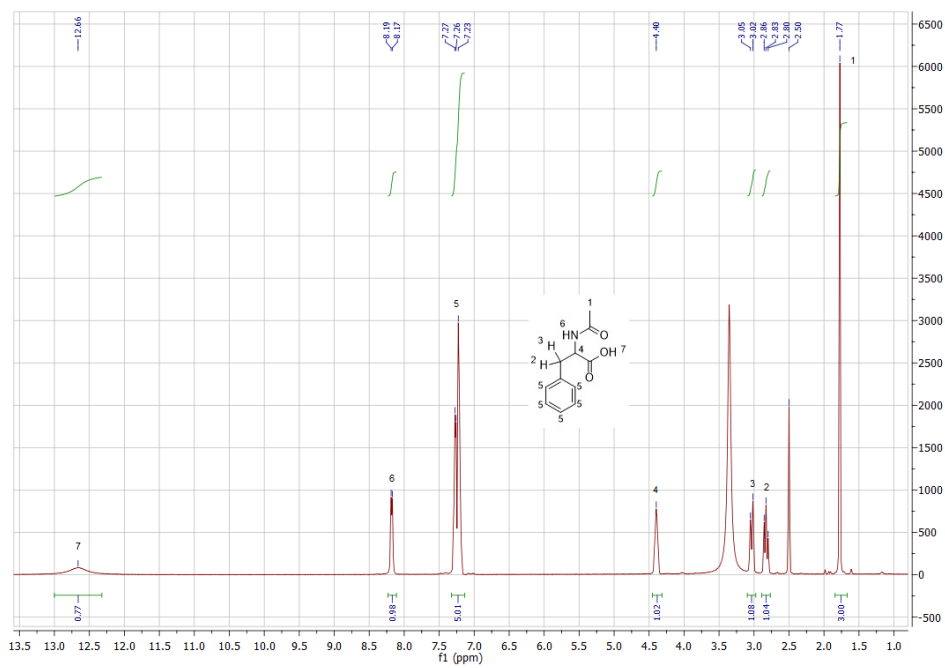


Figura 0.69 - Espetro  $^1\text{H}$  RMN da N-acetil fenilalanina em  $\text{DMSO-d}_6$ .



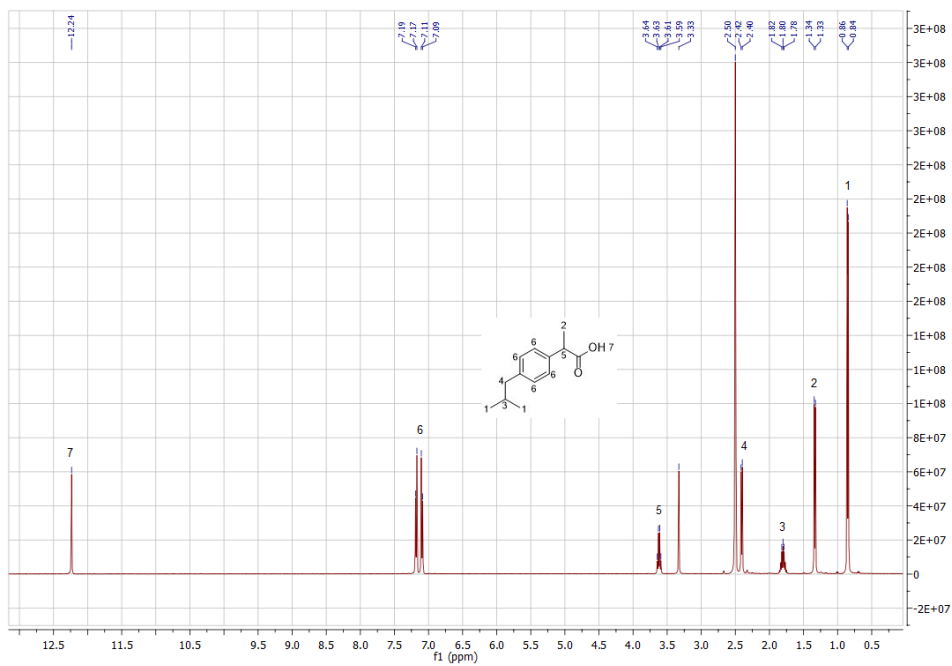


Figura 0.72 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do ibuprofeno em  $\text{DMSO-d}_6$ .

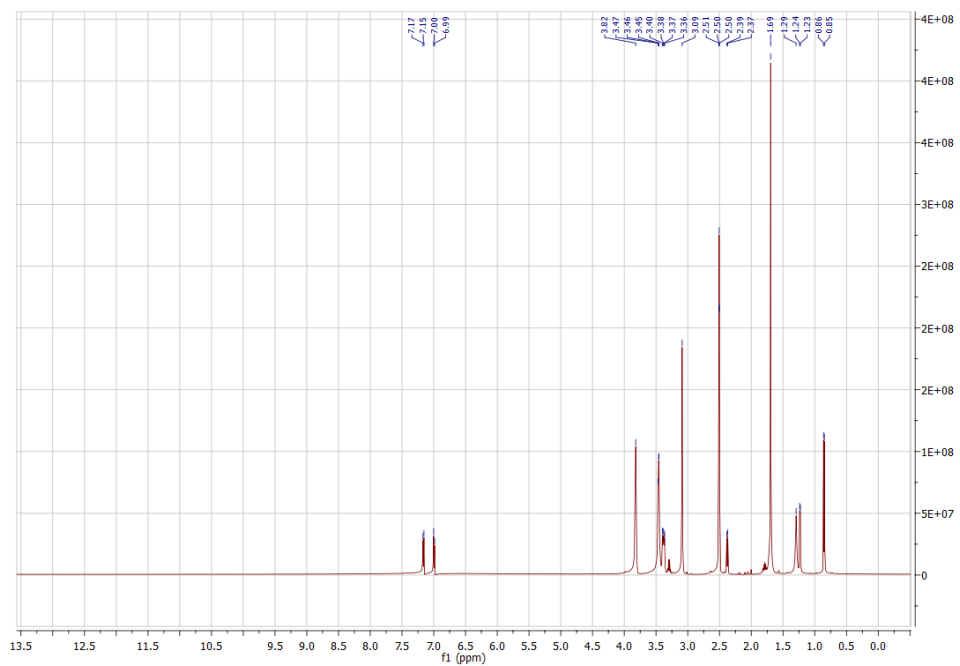


Figura 0.73 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do ibuprofeno com o líquido iônico  $[(\text{N}_{12}\text{OH}_{20\text{H}})_2\text{C}_6][\text{CH}_3\text{CO}_2]_2$  (12) em  $\text{DMSO-d}_6$ .

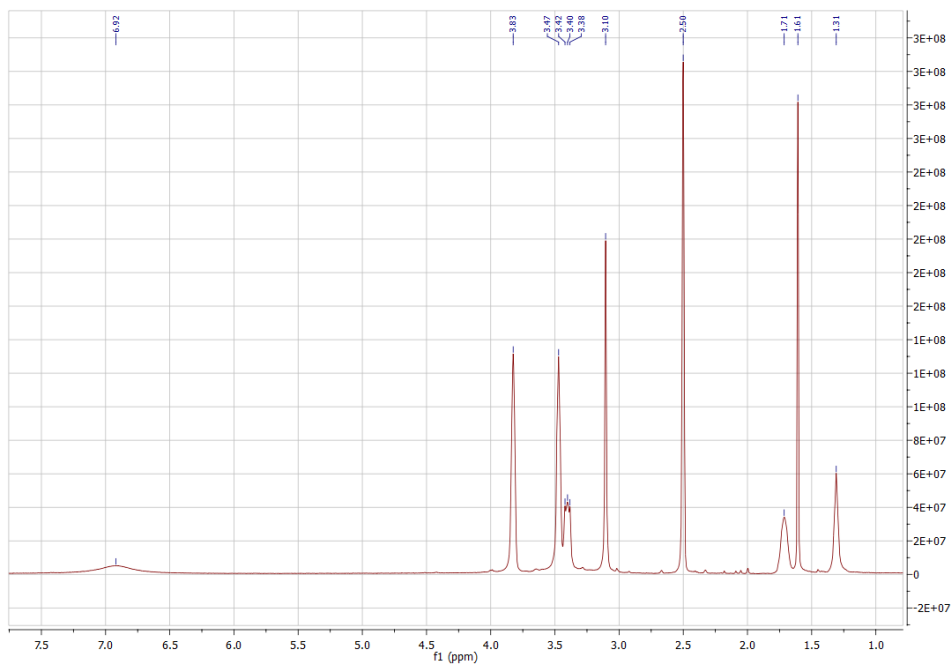


Figura 0.74 - Espectro <sup>1</sup>H RMN do líquido iônico [(N<sub>12</sub>OH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>][CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (12) em DMSO-d<sub>6</sub>.