

Alcidênio Soares Pessoa

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE
RESVERATROL POR TÉCNICAS A BAIXA PRESSÃO E EM
MEIO SUPERCRÍTICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lanza
Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pessoa, Alcidênio Soares

Produção e caracterização de cocristais de resveratrol por técnicas a baixa pressão e em meio supercrítico / Alcidênio Soares Pessoa ; orientador, Marcelo Lanza, coorientador, José Vladimir Oliveira, 2018.

178 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

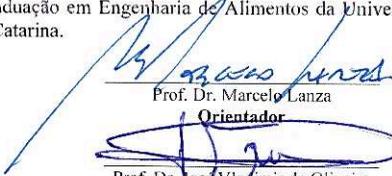
1. Engenharia de Alimentos. 2. Fluido supercrítico. 3. Cocrystal. 4. Resveratrol. I. Lanza, Marcelo. II. Oliveira, José Vladimir. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE
RESVERATROL POR TÉCNICAS A BAIXA PRESSÃO E
EM MEIO SUPERCRÍTICO”**

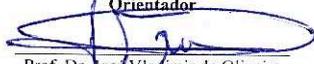
Por

Alcidênio Soares Pessoa

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.


Prof. Dr. Marcelo Lanza

Orientador

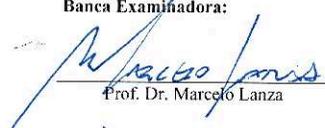

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientador


Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coordenadora

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marcelo Lanza


Prof. Dr. Gean Pablo Sivla Aguiar


Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski


Dr. Luiz Gustavo Gonçalves Rodrigues

Florianópolis, 27 de novembro de 2018.

Aos meus pais, Elizabete e Alcindo (*in memorium*) por me ensinar a importância da educação, a minha esposa Alexandra e meu filho Alessandro que são as pessoas que mais me incentivam em todas as minhas conquistas, dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcelo Lanza, pela orientação, incentivo, confiança e contribuições para este trabalho. Gostaria de realçar a sua boa disposição e “companheirismo” que permitiram a realização deste trabalho de forma bastante agradável.

Ao Professor J. Vladimir de Oliveira, pelas suas pertinentes observações, que proporcionaram oportunidades de melhoria para o trabalho.

Ao Dr. Gean Pablo Silva Aguiar, pelo enorme apoio, incentivo, presença em todas as dificuldades, confiança e orientação concedidos ao longo da realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pela acolhida.

À Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), pela realização da análise MEV (Microscopia eletrônica de varredura).

Ao Leandro, da Central de análises da Engenharia de Química e Engenharia de Alimentos, pela ajuda nas análises de DSC e FTIR.

Ao Prof. Adailton Bortoluzzi, da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, pela disponibilização do seu laboratório para realização das análises de DRXP.

Ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano, pelo apoio financeiro.

As colegas Amarílis, Tatiane e Maria pela grande ajuda prestada nas análises de DRXP.

Aos amigos Paulia, Jeferson e Jonatas, pelos bons momentos de descontração, que muito me ajudaram a suportar os momentos solidão.

Aos meus colegas da Pós-Graduação e colegas do LATESC, pela ajuda e pelos momentos de relaxamento.

Ao meu filho Aleksandro, por ter sido sempre uma luz em tudo que faço.

Ao meu amor Aleksandra, por entender todas as ausências, a falta de tempo e por todo incentivo. Essa conquista não é só minha, é nossa.

Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.

(Paulo Freire)

RESUMO

O resveratrol é uma fitoalexina que ocorre em alguns vegetais em resposta ao ataque de patógenos e exposição à radiação ultravioleta e ao ozônio. A formulação de cocristais têm gerado grande interesse devido ao seu potencial para melhorar as características físico-químicas de um princípio ativo, tais como baixa solubilidade e taxa de dissolução em água. A baixa solubilidade em água pode comprometer o desempenho de um princípio ativo, diminuindo a sua biodisponibilidade. O objetivo principal desse estudo foi a obtenção de cocristais do resveratrol utilizando CO₂ supercrítico por diferentes técnicas e utilizando diferentes coformadores selecionados a partir de *screening* prévio realizado por técnicas a baixa pressão. Foi possível obter cocristais a partir dos coformadores isoniazida e nicotinamida utilizando a técnica de antissolvente líquido (LAS). A partir dos mesmos coformadores foi possível produzir cocristais utilizando a técnica de antissolvente gasoso (GAS) empregando CO₂ supercrítico. O cocristal com nicotinamida foi produzido em conjunto com material não cocristalizado. Os cocristais produzidos foram caracterizados por difração de raio X de pó (DRXP), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A vazão do CO₂ supercrítico foi avaliada com valores de 5, 10 e 20 g·L⁻¹ não apresentando diferença significativa nos resultados. Pela técnica de solvente supercrítico (CSS), que não utiliza solvente orgânico, só foi possível obter cocristais do resveratrol com a isoniazida, no entanto os cocristais foram formados parcialmente, o aumento do tempo de processamento parece aumentar a quantidade de cocristal. Os perfis de solubilidade foram obtidos e assim calculada a eficiência de dissolução (ED) para o RES e cocristais de RES-NIC obtidos por LAS e GAS e os resultados revelaram que os cocristais apresentaram um aumento significativo do perfil e da eficiência de dissolução quando comparados ao RES puro, dos quais o produzido por GAS exibiu os melhores resultados provavelmente em função do seu menor tamanho de partícula.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho foram de suma importância para a síntese e a caracterização de cocristais de RES-NIC e RES-INZ utilizando tecnologia supercrítica e poderão subsidiar estudos visando a síntese de cocristais de outros polifenóis com melhor perfil de solubilidade.

Palavras-chave: fluído supercrítico, cocristal, resveratrol, GAS, CSS.

ABSTRACT

Resveratrol is a phytoalexin that occurs in some plants in response to pathogen attack and exposure to ultraviolet radiation and ozone. The formulation of cocrystals have generated great interest due to their potential to improve the physical-chemical characteristics of an active principle, such as low solubility and rate of dissolution in water. The low solubility in water can compromise the performance of an active principle, decreasing its bioavailability. The main objective of this study was to obtain resveratrol cocrystals using supercritical CO₂ by different techniques and using different coformers selected from previous screening performed by low pressure techniques. It was possible to obtain cocrystals from isoniazid and nicotinamide coformers using the liquid antisolvent (LAS) technique. From the same coformers it was possible to produce cocrystals using the gaseous antisolvent (GAS) technique using supercritical CO₂. The cocrystal with nicotinamide was produced together with non-cocrystallized material. The produced cocrystals were characterized by powder X-ray diffraction (PXRD), infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC). The flow of supercritical CO₂ was evaluated with values of 5, 10 and 20 g·L⁻¹, showing no significant difference in the results. By the supercritical solvent (CSS) technique, which does not use organic solvent, it was only possible to obtain resveratrol cocrystals with isoniazid, however the cocrystals were partially formed, increasing the processing time seems to increase the amount of cocrystal. Solubility profiles were obtained and the dissolution efficiency (DE) was calculated for RES and RES-NIC cocrystals produced by LAS and GAS and the results showed that cocrystals showed a significant increase in profile and dissolution efficiency when compared to RES, of which was produced by GAS exhibited the best results probably due to its smaller particle size.

Therefore, the results obtained in this work were of great importance for the synthesis and characterization of RES-NIC and RES-INZ cocrystals using supercritical technology and may support studies aiming at the synthesis of cocrystals from other polyphenols with better solubility profile.

Keywords: supercritical fluid, cocrystal, resveratrol, GAS, CSS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Exemplos de homosíntons (A) e heterosíntons (B).....	37
Figura 2.2 – Tipos de cristais mais comuns e seus respectivos componentes.....	40
Figura 2.3 – Relações entre sólidos cristalinos multicomponente.....	41
Figura 2.4 – Perfil de dissolução de cocristais de itraconazol.....	42
Figura 2.5 – Diagrama ternário de fase dos compostos A e B, que produzem um cocristal 1:1, no solvente S, a) quando as solubilidades de A e B variam pouco e b) quando a solubilidade de A é muito inferior à de B. As escalas estão em fração molar.	46
Figura 2.6 – O diagrama de fase ternária ureia + ácido glutárico + água a 25 ° C em porcentagem em massa	47
Figura 2.7 – Diagrama de solubilidade de fase.	49
Figura 2.8 – Termograma genérico de DSC.....	53
Figura 2.9 – Fórmula molecular do estilbeno (a), trans-revesratrol (b), cis-revesratrol (c) e trans- piceid (d).	60
Figura 2.10 – Fórmulas moleculares do trans-4-hidroxiestilbeno (a) e trans-3,5-di-hidroxiestilbeno (b).	61
Figura 2.11 – Diagrama de pressão-temperatura para um componente puro.	65
Figura 2.12 – Propriedades dos fluídos supercríticos.....	66
Figura 3.1 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no método GAS.....	78
Figura 3.2 – Fotografias (a) Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade experimental e (b) Tampa com as cinco entradas.....	80
Figura 3.3 – Tampa mostrando o suporte onde o filtro é inserido e (b) filtro de membrana de politetrafluoretileno.....	81
Figura 4.1 – DRXP do RES, SAL, mistura física RES-SAL, LAS 1:1 acetona, LAS 1:2 acetona e LAS 1:1 etanol.....	91
Figura 4.2 – Espectros de FTIR do RES, SAL, mistura física RES-SAL, LAS 1:1 acetona, LAS 1:2 acetona e LAS 1:1 etanol.	92
Figura 4.3 – DRXP do RES, SAL, mistura física (MF) RES-SAL, LAS 1:1 etanol , LAS 1:2 etanol, LAS 1:3 etanol e LAS 1:1 acetona.	93
Figura 4.4 – Espectros de FTIR do RES, SAL, mistura física (MF) RES-SAL, LAS 1:1 etanol , LAS 1:2 etanol, LAS 1:3 etanol e LAS 1:1 acetona.	95
Figura 4.5 – DRXP do resveratrol (RES), da isoniazida (INZ), das mistura física RES-INZ (MF) e do produto obtido por LAS na proporção 1:1 utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.	96

Figura 4.6 – FTIR do resveratrol (RES), da isoniazida (INZ), das mistura física RES-INZ (MF) e do produto obtido por LAS na proporção 1:1 utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.).....	97
Figura 4.7 – DSC do RES, INZ, mistura física (MF) RES-INZ e LAS 1:1 etanol.....	99
Figura 4.8 – Difractogramas comparando as amostras obtidas por LAS com os materiais de partida RES e NIC e com a mistura física do RES e NIC.....	101
Figura 4.9 – Espectros de FTIR do RES, NIC, mistura física RES-NIC e dos produtos obtidos por LAS.	102
Figura 4.10 – Termogramas de DSC do RES, NIC e cocrystal RES-NIC.	104
Figura 4.11 – DSC da mistura física RES-NIC realizado em três etapas.	105
Figura 5.1 – Difractogramas do (A) RES bruto e processado, (B) NIC bruta e processada, e (C) INZ bruta e processada.	110
Figura 5.2 – Imagens FESEM do (a) RES bruto, (b) RES processado, (c) INZ bruta, (d) INZ processada, (e) NIC bruta e (e) NIC processada. .	111
Figura 5.3 – Difractogramas do RES, INZ processada (INZ proc.), mistura física RES-INZ (MF), RES-INZ obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-INZ obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).....	113
Figura 5.4 – FTIR do RES, INZ processada (INZ proc.), mistura física RES-INZ (MF), RES-INZ obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-INZ obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).....	114
Figura 5.5 – Curvas de DSC do RES, INZ processada (INZ proc.), mistura física RES-INZ (MF), RES-INZ obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-INZ obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).....	115
Figura 5.6 – Imagens do FESEM de (a) RES após o processo de GAS, (b) INZ após o processo de GAS, (c) mistura física de RES-INZ, (d) cocrystal de RES-INZ (LAS) e cocrystal de (e) RES-INZ (GAS).	117
Figura 5.7 – Difractogramas do RES, NIC processada (NIC proc.), mistura física RES- NIC (MF), RES- NIC obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES- NIC obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).....	118
Figura 5.8 – FTIR do RES, NIC processada (NIC proc.), mistura física RES-NIC (MF), RES-NIC obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-NIC obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).....	119

Figura 5.9 – Curvas de DSC do RES processado, NIC processada, mistura física RES-NIC (MF), RES-NIC obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-NIC obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).	121
Figura 5.10 – Imagens do FESEM de (a) RES após o processo de GAS, (b) NIC após o processo de GAS, (c) mistura física de RES-NIC, (d) cocristal de RES-NIC (LAS) e cocristal de (e) RES-NIC (GAS).	122
Figura 5.11 – Difratogramas dos experimentos realizados com agitação total, agitação parcial e sem agitação do sistema.	124
Figura 5.12 – Termogramas dos experimentos realizados com agitação total, agitação parcial e sem agitação do sistema.	125
Figura 5.13 – Padrão de DRX para cocristais de RES-NIC obtidos por GAS para diferentes vazões de CO ₂ .	126
Figura 5.14 – DRXP do cocristal obtido por GAS (GAS 1:1 et.), da mistura física RES-INZ (MF), do experimento com CSS com duração de 4 h (CSS 4h) e do experimento com CSS com duração de 2 h (CSS 2h)	127
Figura 5.15 – DSC do cocristal obtido por GAS (GAS 1:1 et.), da mistura física RES-INZ (MF), do experimento com CSS com duração de 4 h (CSS 4h) e do experimento com CSS com duração de 2 h (CSS 2h)	128
Figura 6.1 – Perfis de dissolução de (■) RES, (▲) RES-NIC (LAS) e (●) RES-NIC (GAS) em água destilada, 37 °C. Os valores são médios e a barra de erro representa o desvio padrão, n = 3.	134
Figura 6.2 – Perfis de dissolução de (■) RES, (▲) RES-NIC (LAS) e (●) RES-NIC (GAS) em tampão fosfato (pH = 6,8), 37 °C. Os valores são médios e a barra de erro representa o desvio padrão, n = 3.	135
Figura 6.3 – Perfis de dissolução de (■) RES, (▲) RES-NIC (LAS) e (●) RES-NIC (GAS) em solução de HCl 0,1 mol·L ⁻¹ (pH = 1,2), 37 °C. Os valores são médios e a barra de erro representa o desvio padrão, n = 3.	136
Figura 6.4 – Eficiência de dissolução em 180 min (ED ₁₈₀) para o RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em água destilada, tampão fosfato (pH = 6,8) e solução de HCl 0,1 mol·L ⁻¹ (pH = 1,2).	138
Figura 7.1 – Varredura para avaliar a sobreposição dos espectros UV-Vis do RES, INZ e NIC.	166
Figura 7.2 – Curva de calibração média do RES obtida por espectrofotometria UV.	167

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Classificação de fármacos de acordo com o BCS.	43
Quadro 2.2 – Alguns estudos publicados na literatura sobre cocristais que apresentam componentes nutracêuticos.	55
Quadro 2.3 – Quantidade de resveratrol em algumas fontes naturais ...	59
Quadro 2.4 – Principais técnicas utilizadas na produção de cocristais em meio supercrítico	68
Quadro 3.1 – Propriedades do resveratrol e dos coformadores utilizados nesse trabalho.	76
Quadro 7.1 – Resultado do <i>screening</i> utilizando etanol como solvente	168
Quadro 7.2 – Resultado do <i>screening</i> utilizando acetona como solvente	169
Quadro 7.3 – Resultado do <i>screening</i> utilizando acetato de etila como solvente.	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas de líquidos, gases e fluidos supercríticos.	65
Tabela 2.2 – Propriedades críticas de alguns compostos.	66
Tabela 3.1 – Propriedades dos solventes orgânicos utilizados nesse trabalho.....	77
Tabela 4.1 – Dados relevantes dos espectros de FTIR do resveratrol, isoniazida e do cocristal formado.	98
Tabela 4.2 – Dados dos espectros de FTIR do resveratrol, nicotinamida e do cocristal formado.....	103
Tabela 5.1 – Tamanho das partículas de RES, INZ e NIC antes e após o processamento por GAS.....	112
Tabela 5.2 – Dados de tamanho de partícula para RES, INZ e cocristais RES-INZ (LAS e GAS).....	116
Tabela 5.3 – Dados de tamanho de partícula para RES, NIC e cocristais RES-NIC (LAS e GAS).	123
Tabela 5.4Tabela 5.5 – Comportamento térmico obtido por DSC do produto RES-INZ obtido GAS, mistura física RES-INZ, produto do experimento CSS em 4 h e produto do experimento CSS em 2 h.	129
Tabela 6.1 - Eficiência de dissolução em 180 min (ED_{180}) para o RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em água destilada, tampão fosfato (pH = 6,8) e solução de HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH = 1,2).....	138
Tabela 7.1 – Análise de variância dos resultados obtidos para eficiência de dissolução do RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em tampão de fosfato (PBS) pH 6,8.	171
Tabela 7.2 – Análise de variância dos resultados obtidos para eficiência de dissolução do RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em água destilada.....	171
Tabela 7.3 – Análise de variância dos resultados obtidos para eficiência de dissolução do RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em solução $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 1,2).	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	do inglês <i>Atomization and Anti-Solvent</i> : Atomização e antissolvente
ATR	do inglês <i>Attenuated Total Reflection</i> : Reflexão total atenuada
BCS	do inglês <i>Biopharmaceutical Classification System</i> : Sistema de Classificação Biofarmacêutica.
CAF	Caféina
CIN	Ácido cinâmico
CIT	Ácido cítrico
CSD	do inglês <i>Cambridge Structural Database</i> : Banco de dados estrutural de Cambridge
CSS	do inglês <i>cocrystallization with supercritical solvent</i> : cocrystalização com solvente supercrítico
DRXP	Difração de Raios X pelo método do pó
DSC	do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i> : Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	do inglês <i>Differential Thermal Analysis</i> : Análise Térmica Diferencial
ED	Eficiência de dissolução
ERRO	espécies reativas de oxigênio
FDA	do inglês <i>US Food and Drug Administration</i> : Agência Reguladora de Alimentos e Medicamentos Americana
FESEM	Do inglês <i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i> : microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo
FTIR	do inglês <i>Fourier Transform Infra Red</i> : Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GAS	do inglês <i>Gas Antisolvent</i> : antissolvente gasoso
GRAS	do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i> : Geralmente Reconhecido como Seguro.
ICH	do inglês <i>International Conference on Harmonization</i>
INZ	Isoniazida
K_{PS}	Produto de solubilidade
LAG	do inglês <i>liquid assisted grinding</i> : moagem assistida por líquido
LAS	do inglês <i>liquid Antisolvent</i> : antissolvente líquido
LATESC	
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MF	Mistura física

NIC	Nicotinamida
P_C	Pressão crítica
pH	Potencial hidrogeniônico
pK_a	Logaritmo do inverso da constante de ionização
RES	Resveratrol
RESS	do inglês <i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions</i> : Rápida expansão de soluções supercríticas
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
SAL	Ácido salicílico
SAS	do inglês <i>Supercritical Anti-Solvent</i> : Antissolvente supercrítico
SEA	do inglês <i>Supercritical Fluid Enhanced Atomization</i> : Atomização melhorada por fluidos supercríticos
SEM	do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i> : microscopia eletrônica de varredura
T_C	Temperatura crítica
TG	do inglês <i>Thermogravimetry</i> : Termogravimetria
UV	Ultravioleta
[X]	Concentração do componente X em mol·L ⁻¹

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	27
1 Introdução	29
1.1 OBJETIVOS	31
1.1.1 Objetivo geral	31
1.1.2 Objetivos específicos	31
1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO	32
CAPÍTULO 2	35
2 Revisão bibliográfica	36
2.1 Química supramolecular	36
2.1.1 Síntons supramoleculares	37
2.2 Engenharia de cristais	37
2.3 Polimorfismo.....	38
2.4 Estratégias para alterar as propriedades físico-químicas de um sólido	39
2.5 Cocristais.....	39
2.6 Propriedades físico-químicas dos cocristais.....	41
2.6.1 Ponto de fusão	41
2.6.2 Solubilidade	42
2.6.3 Biodisponibilidade	43
2.7 Escolha do coformador	44
2.8 Métodos de preparação dos cocristais	44
2.8.1 Cocristalização em solução	45
2.8.2 Diagramas de fases de cocristais	46
2.9 Caracterização de cocristais	50
2.9.1 Difração de raio X pelo método do pó (DRXP)	50
2.9.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	51
2.9.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	52

2.9.4	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM)	53
2.10	Cocristais contendo nutracêuticos.....	54
2.11	Resveratrol.....	58
2.12	Propriedades biológicas do resveratrol	61
2.12.1	Capacidade antioxidante	61
2.12.2	Propriedades antimicrobianas	62
2.12.3	Potencial anticancerígeno	62
2.12.4	Efeito cardioprotetor	63
2.12.5	Atividade anti-inflamatória	63
2.13	Toxicidade do resveratrol	63
2.14	Cocristais do resveratrol	64
2.15	Fluidos supercríticos	64
2.15.1	Propriedades de fluidos supercríticos	65
2.15.2	Fluidos supercríticos como antissolventes	67
CAPÍTULO 3		73
3	Materiais e métodos	75
3.1	Materiais	75
3.1.1	Princípio ativo e coformadores	75
3.1.2	Solvente	76
3.2	Metodologias utilizadas para produção de cocristais.....	77
3.2.1	Antissolvente líquido (LAS)	77
3.2.2	Unidade experimental utilizada na formação de cocristais pelas técnicas GAS e CSS	78
3.2.3	Metodologia experimental para obtenção dos cocristais pela técnica GAS	81
3.2.4	Metodologia experimental para obtenção dos cocristais pela técnica CSS	83
3.3	Caracterização de cocristais.....	84
3.3.1	Difração de raio X de pó (DRXP)	84

3.3.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	84
3.3.3	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	84
3.3.4	Microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (FESEM)	85
3.4	Perfil de dissolução	85
3.4.1	Eficiência de dissolução	86
CAPÍTULO 4		87
4	Screening de cocristais do resveratrol	89
4.1	Líquido antissolvente (LAS)	89
4.1.1	RES-SAL	89
4.1.2	RES-CIN	93
4.1.3	RES-INZ	96
4.1.4	RES-NIC	100
4.2	Conclusão	106
CAPÍTULO 5		107
5	Obtenção de cocristais do resveratrol em meio supercrítico 109	
5.1	Antissolvente gasoso (GAS)	109
5.1.1	Processamento dos compostos puros	109
5.1.2	RES-INZ	112
5.1.3	RES-NIC	118
5.1.4	Efeito da agitação do sistema durante o processamento GAS 123	
5.1.5	Efeito da vazão de CO₂	125
5.2	Solvente supercrítico (CSS)	126
5.2.1	RES-INZ	127
5.3	Conclusão	129
CAPÍTULO 6		131
6	Estudos de dissolução	133
6.1	Água destilada	133
6.2	Conclusão	139

CAPÍTULO 7	141
7 Conclusões e sugestões.....	143
7.1 Conclusões.....	143
7.2 Sugestões	144
7.3 produção técnico-científica decorrente da execução deste trabalho	145
7.3.1 Trabalhos publicados/submetidos em periódicos.....	145
7.3.2 Trabalhos publicados em anais de congressos	145
REFERÊNCIAS.....	147
APÊNDICE A.....	166
APÊNDICE B.....	167
APÊNDICE C.....	168
APÊNDICE D.....	171
ANEXO A	173
ANEXO B	174

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE RESVERATROL POR TÉCNICAS A BAIXA PRESSÃO E EM MEIO SUPERCRÍTICO

Por quê?

- Compostos bioativos como o resveratrol apresentam baixa solubilidade e biodisponibilidade;
- Aumentar a solubilidade de um composto possibilita aumento da sua biodisponibilidade;
- A cocristalização por fluido supercrítico é uma alternativa para técnicas tradicionais de cocristalização que reduz o uso de solvente orgânico e estresse térmico e mecânico.

Quem já fez?

- Há escassez de trabalhos que estudem a cocristalização do resveratrol;
- Não constam na literatura trabalhos de cocristalização por fluido supercrítico do composto resveratrol.

Hipótese?

- É possível produzir cocristais do resveratrol a partir de uma técnica de *screening* rápida e prática?
- É possível reproduzir cocristais do resveratrol produzidos na etapa de *screening* em meio supercrítico?
- Os cocristais produzidos apresentam maior taxa de dissolução para o resveratrol?

Como fazer?

- Realizar o *screening* para tentar produzir cocristais do resveratrol a fim de determinar os melhores coformadores a serem usados em meio supercrítico;
- Avaliar o processo de cocristalização em meio supercrítico utilizando os coformadores selecionados na etapa de *screening*;
- Caracterizar os cocristais obtidos por DRXP, FRIR, DSC e FESEM;
- Estudar o perfil de dissolução do resveratrol *in vitro* dos cocristais produzidos em diferentes meios.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O resveratrol (3,4,5-tri-hidroxiestilbeno) é uma fitoalexina presente numa grande variedade de espécies vegetais. Vários estudos demonstraram que o resveratrol pode prevenir ou retardar a progressão de diversas doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares e lesões isquêmicas (BAUR; SINCLAIR, 2006). O resveratrol é um polifenol derivado do estilbeno produzido em plantas em resposta ao ataque de patógenos, a radiação ultravioleta e a exposição ao ozônio (CAMONT et al., 2009). O resveratrol pertence a classe II (alta permeabilidade, baixa solubilidade) do sistema de classificação biofarmacêutica (PUJARA et al., 2017). As fontes naturais mais ricas nesse composto são extratos de uvas escuras (*Vitis vinifera*) e raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta usada na medicina tradicional chinesa e japonesa (SATO et al., 2000; SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997).

Devido a sua atividade biológica, há um crescente interesse no resveratrol como potencial alimento funcional e nutracêutico na indústria alimentar. Contudo, as aplicações do resveratrol são limitadas devido à baixa biodisponibilidade, como consequência da sua baixa solubilidade aquosa, e estabilidade limitada (BAUR; SINCLAIR, 2006; NEVES et al., 2012; SMOLIGA; BLANCHARD, 2014). Por esse motivo diversas formas de aumentar sua dissolução em água têm sido propostas (CAMONT et al., 2009). Entre essas alternativas podemos citar: a formação de um sal resultante da reação do fármaco com um ácido ou base (REDDY et al., 2011; REDDY et al., 2013), a obtenção de um solvato pelo processo de cristalização quando o solvente é retido e incorporado como parte da estrutura cristalina (DOUILLET et al., 2012), dispersões sólidas (SAREEN; MATHEW; JOSEPH, 2012), microemulsificação (HE; HE; GAO, 2010), solubilização usando cossolventes (AMIN et al.), formação de complexos com ciclodextrinas (KURKOV; LOFTSSON, 2013) e a obtenção de um cocrystal (BETHUNE; SCHULTHEISS; HENCK, 2011).

Os cocrystal surgiram como uma estratégia na tentativa de melhorar as propriedades físico-químicas de alguns compostos sem alterar a sua estrutura molecular (AAKERÖY et al., 2013). Cocrystal são materiais que apresentam uma única fase cristalina formada por dois ou mais compostos moleculares ou iônicos (princípio ativo e coformador) em proporções estequiométricas e que se apresentam como sólidos em condições ambientes (AITIPAMULA et al., 2012).

Os coformadores são compostos que apresentam em suas moléculas grupos funcionais capazes de formar hetero ou homossintons supramoleculares com o princípio ativo, nessa abordagem, as etapas envolvidas no desenvolvimento de cocristais são as seguintes: (1) escolher a molécula alvo (princípio ativo), (2) encontrar os grupos funcionais complementares que sejam capazes de formar ligação de hidrogênio (seleção de coformer) e (3) definir os métodos de preparação (FUKTE; WAGH; RAWAT, 2014). Os coformadores são normalmente selecionados a partir da lista de substâncias disponibilizada pelo FDA de materiais reconhecidos como seguros (*Generally Recognized as Safe – GRAS*) (F.D.A., 2013; SCHULTHEISS; BETHUNE; HENCK, 2010). Diversos métodos de cocrystalização apresentam-se descritos na literatura. Dentre eles destacam-se as reações de cristalização em solução e a moagem, podendo-se citar também a fusão, utilização de antissolvente líquido e utilização de fluido supercrítico (LU; RODRIGUEZ-HORNEDO; SURYANARAYANAN, 2008; PADRELA et al., 2009; SHAN; ZAWOROTKO, 2008).

O emprego de fluido supercrítico (FSC) apresenta uma interessante via para a formação de partículas, que evita a maior parte dos inconvenientes dos métodos tradicionais (FAGES et al., 2004). Um fluido supercrítico é um estado onde uma substância se encontra a uma temperatura acima da sua temperatura crítica e uma pressão acima da sua pressão crítica. Os fluidos supercríticos têm sido utilizados para uma grande variedade de aplicações, tais como processamento de alimentos, limpeza a seco, cromatografia, geração de energia e oxidação de resíduos perigosos (KING, 2014).

Um dos principais fluidos utilizados em estado supercrítico é o dióxido de carbono (CO_2) por possuir uma série de vantagens, entre as quais cabe destacar: é não-inflamável, relativamente inerte, abundante e barato. Na região supercrítica, a densidade do dióxido de carbono e o seu poder solvente pode ser modificada com a variação da temperatura e da pressão. Na proximidade de seu ponto crítico, o CO_2 supercrítico apresenta propriedades intermediárias entre gás e líquido. Difusividade e transferência de massa são melhores do que no estado de líquido, enquanto que as solubilidades de muitos compostos orgânicos são mais elevadas do que em gases. A baixa temperatura crítica permite que os materiais sensíveis ao calor possam ser processados sem danos (JOHNSTON; PENNINGER, 1989). Até o momento, são poucos os estudos publicados que utilizam fluidos supercríticos na produção de cocristais, embora esses apresentem algumas vantagens sobre técnicas tradicionais como: a alta pureza dos produtos, o controle do polimorfismo

crystalino, a possibilidade de processamento de moléculas termolábeis e a possibilidade de processamento em etapa única (FAGES et al., 2004).

Nesse trabalho, o CO₂ supercrítico será usado como solvente e antissolvente para produção de cocristais do resveratrol com coformadores que foram selecionados a partir de *screening* realizado pela técnica de antissolvente líquido e por apresentarem grupos funcionais com maior probabilidade de formar ligações de hidrogênio com compostos fenólicos, além de terem a possibilidade de melhorar as suas propriedades físico-químicas, em especial a sua solubilidade que pode, eventualmente, conduzir a uma melhor biodisponibilidade. Diferentes técnicas na produção dos cocristais foram avaliadas utilizando o CO₂ supercrítico como solvente e como antissolvente, além de alguns fatores que podem influenciar o processamento em meio supercrítico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Obtenção e caracterização de cocristais do resveratrol utilizando CO₂ supercrítico por meio de diferentes técnicas de processamento em conjunto coformadores que apresentam diferentes grupos funcionais complementares selecionados a partir de triagem realizada em método a baixa pressão.

1.1.2 Objetivos específicos

Em conformidade com o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Avaliar a precipitação de cocristais do resveratrol a partir de vários coformadores utilizando a técnica de antissolvente líquido;
- Caracterizar estruturalmente o estado sólido dos cocristais sintetizados por difração de raios X de pó (DRXP), por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- A partir dos resultados obtidos na etapa de triagem, reproduzir os cocristais obtidos por LAS utilizando CO₂ supercrítico pelas

técnicas de antissolvente gasoso (GAS) e solvente supercrítico (CSS);

- Avaliar o efeito da vazão de CO₂ e da agitação do sistema na cristalinidade dos cocristais formados pela técnica GAS;
- Analisar o tamanho e a morfologia das partículas produzidas por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar as propriedades de dissolução dos cocristais obtidos comparando-os com os resveratrol puro, usando como método de quantificação a espectrometria no ultravioleta.

1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Esse documento é organizado em 7 capítulos:

Capítulo 1 – Introdução.

Descreve brevemente os assuntos abordados no presente estudo, os objetivos e a estrutura da pesquisa de doutorado desenvolvida.

Capítulo 2 – Revisão .

Apresenta uma breve e sistemática revisão da literatura sobre o resveratrol, cocristais e tecnologia supercrítica. Definições e teorias básicas e recentes progressos foram introduzidos neste capítulo.

Capítulo 3 - Materiais e métodos.

Introduz os materiais empregados, metodologias e abordagens analíticas utilizadas neste estudo. Uma descrição do equipamento, diagramas esquemáticos dos processos, procedimentos de operação e condições de processo para cada uma das técnicas de cocristalização utilizadas neste trabalho são apresentadas. Complementarmente, foram fornecidas também descrições dos equipamentos e técnicas utilizadas para caracterizar os cocristais produzidos foram também fornecidas.

Capítulo 4 - *Screening* de cocristais do resveratrol.

Nesse capítulo é feita a avaliação da formação de cocristais do resveratrol com diferentes coformadores, escolhidos a partir de análise na

literatura sobre compostos utilizados na produção de cocristais de polifenóis, utilizando a técnica de antissolvente líquido.

Capítulo 5 - Obtenção de cocristais do resveratrol em meio supercrítico.

Resveratrol e os coformadores selecionados a partir dos resultados do capítulo 4 foram recristalizados por antissolvente gasoso. Os componentes recristalizados foram comparados com o original quanto a alterações no tamanho de partícula, morfologia e cristalinidade. Subsequentemente, resveratrol e os coformadores selecionados foram simultaneamente recristalizados por antissolvente gasoso para avaliar o potencial para formação de cocrystal por esse procedimento. O cocrystal preparado foi comparado com o produzido usando a técnica de antissolvente líquido para cristalinidade, comportamento térmico, tamanho de partícula e morfologia. Uma discussão adicional sobre os efeitos que a vazão do CO₂ e agitação do sistema durante o processamento podem ter sobre a cristalinidade foi fornecida por meio da comparação do perfil de DRXP e DSC. Finalizando, foi realizada a tentativa de obtenção de cocristas pela técnica de solvente supercrítico, avaliando o efeito do tempo de processamento.

Capítulo 6 - Estudos de dissolução.

Nesse capítulo é realizada análise do perfil e da eficiência de dissolução, em diferentes meios, dos cocristais produzidos em comparação com o resveratrol puro.

Capítulo 7 - Conclusões e sugestões.

Nesse capítulo são apresentadas as conclusões gerais deste trabalho e suas perspectivas.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

A química supramolecular foi definida pelo Prêmio Nobel Jean-Marie Lehn como "a associação de duas ou mais espécies químicas mantidas juntas por forças intermoleculares" ou, simplesmente, "Química além da molécula" (LEHN, 1988). Considerando que a química sintética envolve a construção de uma molécula por meio da formação de ligação covalente, a química supramolecular não engloba uma molécula, mas sim, como moléculas interagem com outras moléculas do mesmo tipo ou diferente.

A interação mais importante que ocorre em associações de moléculas orgânicas é a ligação de hidrogênio. A relevância da ligação de hidrogênio na formação de estruturas supra moleculares reside no fato destas serem direcionais e fortes (ETTER, 1990). Uma ligação de hidrogênio pode se formar quando um átomo A, que tem eletronegatividade suficiente para causar desblindagem em um hidrogênio em uma ligação covalente A-H, se aproxima de um átomo B aceptor que apresenta pares de elétrons não ligados ou elétrons π polarizáveis resultando em um arranjo A-H...B (STEINER, 2002). Ligações de hidrogênio tem a flexibilidade para existir entre uma variedade de grupos funcionais e diferentes comprimentos e geometrias (DESIRAJU, 2002). Essas associações formam blocos de construção supramoleculares conhecidas como sinton (BERNSTEIN et al., 1995; DESIRAJU, 1995). Ao estudar os motivos de empacotamento e padrões de ligações de hidrogênio nas estruturas cristalinas de grande número de compostos orgânicos, Etter (1991) e Donohue (1952) propuseram as três seguintes regras de ligações de hidrogênio:

- Todos os hidrogênios ácidos numa molécula serão utilizados para a formação de ligações de hidrogênio;
- Todos os bons aceitadores de ligações de hidrogênio serão utilizados quando houver doadores de ligação de hidrogênio disponíveis;
- O melhor doador e o melhor aceitador de ligação de hidrogênio formarão, preferencialmente, ligações de hidrogênio entre si.

Usando estas regras, a ligação de hidrogênio e a formação de sinton entre os grupos funcionais de diferentes moléculas podem ser previstos e

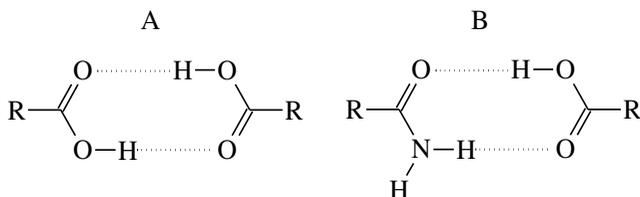
classificados. Exceções a estas diretrizes ocorrem frequentemente devido à competição de múltiplas ligações de hidrogênio, dipolo ou sítios iônicos, bem como limitações estéricas ou conformacionais.

2.1.1 Síntons supramoleculares

Síntons supramoleculares são unidades estruturais dentro de supermoléculas que podem ser formados e/ou montados por meio de operações de síntese conhecidos ou concebíveis envolvendo interações intermoleculares (DESIRAJU, 1995).

Os síntons podem ser classificados como homosínton, que ocorrem entre dois síntons iguais, ou seja, uma interação baseada no mesmo grupo funcional e heterosínton, que ocorrem em síntons diferentes, isto é, interações intermoleculares entre diferentes grupos funcionais (NANGIA; DESIRAJU, 1998). Exemplos dos dois tipos são mostrados na Figura 2.1, onde duas funcionalidades são complementares um do outro e podem ser montados por meio de dois pontos de reconhecimento para formar homosíntons ou heterosíntons.

Figura 2.1 – Exemplos de homosíntons (A) e heterosíntons (B).



Fonte: Adaptado de BLAGDEN et al. (2007).

2.2 ENGENHARIA DE CRISTAIS

O desenho racional de novos materiais cristalinos levou ao desenvolvimento de um novo campo: a engenharia de cristais. O termo “engenharia de cristal” foi criado em 1955 por R. Pepinsky (1955). Voltou a ser usado em 1971 por G.M.J. Schmidt (1971) em seu trabalho sobre fotodimerização no estado sólido. Porém, o conceito moderno de engenharia de cristal foi desenvolvido por Desiraju em seu livro publicado em 1989, intitulado "*Crystal engineering: the design of organic solids*", que é definida como: "a compreensão das interações intermoleculares no contexto de empacotamento cristalino e na utilização

de tal compreensão na concepção de novos sólidos com propriedades físicas e químicas desejadas" (DESIRAJU, 1989).

A engenharia de cristais tem uma ampla gama de aplicações em muitos campos, mais recentemente por meio do desenvolvimento de cocristais (AAKERÖY; BEATTY; HELFRICH, 2002).

Cheney et al. (2010) usaram a abordagem de sinton supramolecular para efetivamente priorizar todos os coformers disponíveis e sistematicamente preparar e caracterizar uma variedade de cocristais de meloxicam com ácidos carboxílicos. O trabalho resultou na produção de 19 cocristais incluindo o cocrystal de um sal. Millar et al. (2012) utilizaram a engenharia de cristais para estudar a cocrystalização da nitramina policíclica (CL-20), que é atualmente o explosivo mais poderoso disponível comercialmente, tentando obter uma forma que exibisse sensibilidade suficientemente reduzida, sem comprometer o seu desempenho explosivo. Como resultado obtiveram quatro cocristais do CL-20.

2.3 POLIMORFISMO

O termo polimorfismo deriva do grego onde “poli” (muitas) e “morphes” (formas) é definido como a capacidade de uma substância existir como duas ou mais fases cristalinas que têm arranjos ou conformações diferentes das moléculas na rede cristalina (HILFIKER; BLATTER; RAUMER, 2006). Diferenças na estrutura cristalina podem levar a consideráveis alterações nas propriedades físicas e químicas, tal como tamanho de partícula, forma, dureza, ponto de fusão, densidade, solubilidade, taxa de dissolução, higroscopicidade, reatividade, capacidade calorífica e estabilidade (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969; REMENAR et al., 2003) que afetam o processo de produção do composto (CHEN, A. M. et al., 2007; OGIENKO et al., 2011) e sua biodisponibilidade (BLAGDEN et al., 2007).

As diferenças estruturais entre os polimorfos podem ocorrer devido a um arranjo diferente de uma das moléculas da rede (polimorfismo de embalagem ou orientacional) ou por causa de uma conformação diferente das moléculas na rede (polimorfismo conformacional) (STAHLY, 2007).

Como os polimorfos originam-se de diferentes arranjos das moléculas ou íons no retículo, a habilidade do polimorfo cristalizar é governada por fatores termodinâmicos e cinéticos. Como apenas uma forma é termodinamicamente estável a determinada temperatura, pode ocorrer a transição polimórfica, ou seja, a forma polimórfica de maior

energia tende a se transformar na forma de menor energia e, portanto, mais estável. Se para ocorrer essa transformação for necessária uma alta energia de ativação, pode ocorrer a formação de formas metaestáveis (BARBAS et al., 2006; STAHLY, 2007).

2.4 ESTRATÉGIAS PARA ALTERAR AS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE UM SÓLIDO

Várias estratégias vêm sendo propostas para melhorar as propriedades físico-químicas de um sólido, com destaque para a solubilidade, taxa de dissolução e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. Entre essas alternativas podemos citar: a formação de um sal resultante da reação do fármaco com um ácido ou base (REDDY et al., 2011; REDDY et al., 2013), a obtenção de um solvato pelo processo de cristalização quando o solvente é retido e incorporado como parte da estrutura cristalina (DOUILLET et al., 2012), dispersões sólidas (SAREEN et al., 2012), microemulsificação (HE et al., 2010), formação de complexos com ciclodextrinas (KURKOV; LOFTSSON, 2013), micronização (AGUIAR et al., 2016) e a obtenção de um cocrystal.

2.5 COCRISTAIS

Cocrystalis têm gerado um enorme interesse por causa do potencial para personalizar as propriedades físico-químicas do sólido mantendo a sua integridade química (AAKERÖY et al., 2013). São parte de uma ampla classe de cristais de componentes múltiplos, onde duas ou mais moléculas preenchem uma estrutura cristalina homogênea em uma estequiometria bem definida. O cristal multicomponente resultante possuirá um perfil físico-químico distinto, com potenciais melhorias em propriedades, tais como a solubilidade, ponto de fusão ou estabilidade física (TRASK; MOTHERWELL; JONES, 2006).

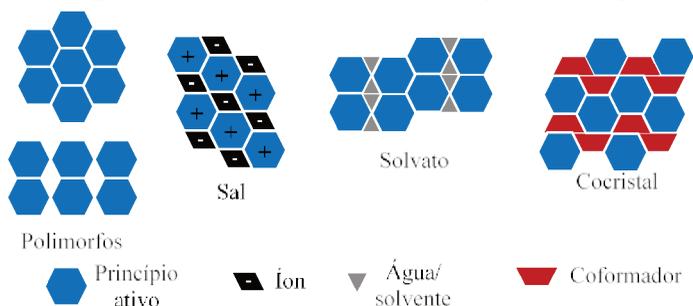
A produção de cocrystalis tem encontrado aplicações em áreas como a farmacêutica (CHENEY et al., 2010), agroquímica (NAUHA; KOLEHMAINEN; NISSINEN, 2011), óptica não-linear (AAKERÖY et al., 1993), explosivos (MILLAR et al., 2012) e semicondutores orgânicos (WANG; HUANG, 2007).

A estrutura de um cocrystalis pode ser formada por meio de vários tipos de interação não covalentes como ligações de hidrogênio, interações π - π (empilhamento π) e forças de Van der Waals (MASHHADI et al., 2014). As ligações de hidrogênio é o modo predominante de interação na formação de um cocrystalis (YADAV et al., 2009).

Em um cocrystal qualquer substância sólida, independentemente de apresentar grupos ácidos, básicos ou ionizáveis, tem potencial para ser recristalizado. Este aspecto ajuda a complementar os métodos existentes, reintroduzindo moléculas que tinham perfis limitados com base em seus grupos funcionais. Além disso, o número de potenciais coformadores de cocrystal não tóxicos que podem ser incorporados é profuso (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009).

A Figura 2.2 mostra a diferença entre as estruturas cristalinas mais comuns que podem ocorrer em um sólido.

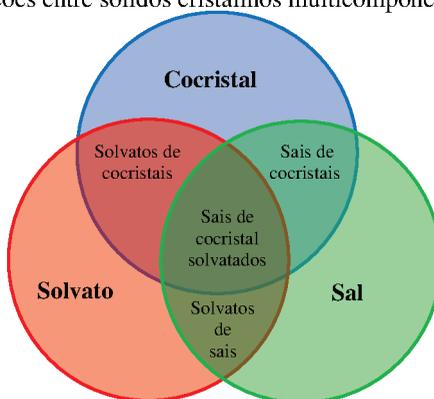
Figura 2.2 – Tipos de cristais mais comuns e seus respectivos componentes.



Fonte: Schultheiss e Newman (2009).

Os cocrystal se diferenciam dos solvatos, pois todos os seus formadores estão no estado sólido a temperatura ambiente (AITIPAMULA et al., 2012) e dos sais, pois não ocorre a transferência de prótons durante a interação das moléculas formadoras do cocrystal (LAKSHMI KUMAR et al., 2009). A Figura 2.3 mostra as relações entre esses sólidos. Essas formas sólidas multicomponentes podem se sobrepor uma à outra e, além disso, podem exibir o polimorfismo.

Figura 2.3 – Relações entre sólidos cristalinos multicomponente.



As propriedades físicas e químicas de cocrystal são uma função do arranjo cristalino único do estado sólido e da interação dos componentes múltiplos. Todas as propriedades que têm uma base na estrutura de cristal podem ser afetadas em algum grau quando um cocrystal é formado (SHAN; ZAWOROTKO, 2008).

2.6 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COCRISTAIS

As propriedades físico-químicas dos cocristais são uma combinação de propriedades individuais dos formadores do cocrystal. Essas propriedades, como a biodisponibilidade, o ponto de fusão e a solubilidade são muito importantes quando se produz uma nova forma cristalina, como um cocrystal.

2.6.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão é indicado pela temperatura na qual a fase sólida atingiu o equilíbrio com a fase líquida. Uma vez que o ponto de fusão é um processo termodinâmico onde a energia livre de transição é igual a zero, o valor é determinado pela razão da mudança na entalpia de fusão pela variação da entropia de fusão (JAIN; YANG; YALKOWSKY, 2004).

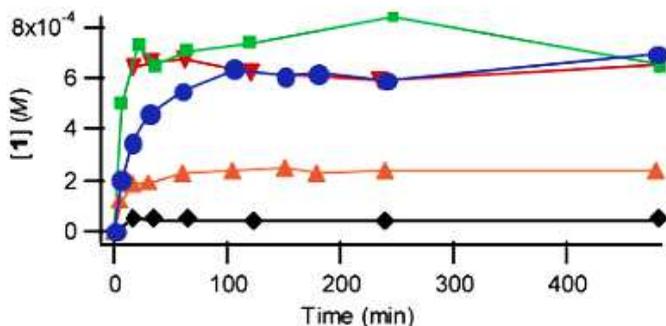
Uma grande quantidade de estudos tem sido realizada para investigar se o ponto de fusão de um cocrystal é alterado com relação aos componentes individuais e se podem ser estimados e modulados dentro de uma série de cocristais (AAKERÖY; FORBES; DESPER, 2009; BAK

et al., 2008). Pode ser destacado o trabalho de revisão realizado por Schultheiss e Newman (2009) que compararam o ponto de fusão de 50 cocristais com os respectivos pontos de fusão do princípio ativo e coformador verificando que 51% dos cocristais analisados tinham pontos de fusão entre os do princípio ativo e coformador, enquanto que 39% foram menores do que o princípio ativo ou coformador, apenas 6% foram mais elevadas, e 4% tiveram o mesmo ponto de fusão como a API ou coformador.

2.6.2 Solubilidade

A solubilidade é definida como sendo o equilíbrio termodinâmico de um soluto entre duas fases, neste caso a fase sólida e a solução. Para este equilíbrio ocorrer, a temperatura, a pressão e a energia livre de cada espécie em cada fase devem ser iguais (HIGUCHI; CONNORS, 1965). As características de solubilidade de uma molécula dependem da sua capacidade de solvatação e da sua energia de rede cristalina (SERAJUDDIN, 2007). Os cocristais tem a habilidade de influenciar ambos os fatores e em variada extensão com predominância sobre a capacidade de solvatação em função da utilização de coformadores muito hidrofílicos. Um dos primeiros trabalhos a usar a abordagem de cocristalização para modificar as propriedades físico-químicas de um princípio ativo foi realizado por Remenar et al. (2003) que relataram os estudos de dissolução do fármaco antifúngico itraconazol com ácidos 1,4-dicarboxílicos (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Perfil de dissolução de cocristais de itraconazol



- ◆ Itraconazol
- Forma comercial
- ▼ Cocristal com ácido málico
- ▲ Cocristal com ácido succínico
- Cocristal com ácido tartárico

Fonte: Remenar et al. (2003).

Todos os cocristais revelaram uma dissolução melhorada de 4 a 20 vezes maior do que itraconazol puro e a taxa de dissolução do itraconazol-ácido málico foi comparativa com a forma amorfa comercializada

Aakeröy, Forbes e Desper (2009) comunicaram a obtenção de cocristais de hexametilenobisacetamida, um composto que é capaz de inibir a proliferação de células de câncer do pulmão e também é utilizado no tratamento da síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda resistente, com uma série de ácidos dicarboxílicos demonstrando que a solubilidade aquosa pode ser aumentada num fator de 2,5 em relação ao do fármaco individual. Outro estudo, com o cocrystal indometacina-sacarina, demonstrou solubilidade de 13 a 65 vezes maior que a indometacina na faixa de pH 1-3 (ALHALAWEH et al., 2012).

2.6.3 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade das substâncias ingeridas por via oral é função da sua solubilidade e dissolução nos fluidos gástricos e intestinais, bem como a capacidade das drogas de permear as membranas celulares. Juntos, solubilidade e permeabilidade são a base para o sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) que classifica as substâncias em quatro grupos, como no Quadro 2.1, baseadas nessas duas propriedades (AMIDON et al., 1995).

Quadro 2.1 – Classificação de fármacos de acordo com o BCS.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Descrição
I	Alta	Alta	Compostos geralmente muito bem absorvidos.
II	Baixa	Alta	Dissolução – absorção limitadas.
III	Alta	Baixa	Permeabilidade – absorção limitadas.
IV	Baixa	Baixa	Biodisponibilidade oral muito reduzida.

Fonte: Adaptado de Custodio, Wu e Benet (2008).

As melhorias de solubilidade são particularmente desejáveis para compostos de classe II do BCS que têm baixa solubilidade e elevada permeabilidade. Os compostos de classe II exibem limitada solubilidade, adsorção oral e biodisponibilidade.

2.7 ESCOLHA DO COFORMADOR

A escolha do coformador é uma etapa importante na produção de um cocrystal, na grande maioria das vezes os coformadores são selecionados pela presença de regiões de complementaridade molecular com o fármaco, especialmente pela presença de grupos funcionais capazes de formar ligações de hidrogênio intermoleculares. Uma desvantagem dessa abordagem é que ela não é quantitativa, na medida em que, embora a formação da supermolécula possa ser favorável, a própria supermolécula pode não ser capaz de embalar em uma estrutura cristalina ordenada. Essa abordagem não considera fatores como a competição entre os diferentes grupos funcionais presentes dentro do princípio ativo ou do coformador nem a densidade estérica em torno do doador e do aceitador. Uma seleção de coformadores com base na forma e na complementaridade da polaridade foi proposta por Fábíán (2009) para aumentar a taxa de sucesso da formação de cocrystal. Além disso, os coformadores adequados devem apresentar-se seguros em relação à sua toxicidade, sendo comum a busca em listas de compostos como, geralmente consideradas como seguros (*Generally Regarded As Safe – GRAS*) (F.D.A., 2013). Nesta lista destacam-se aditivos alimentares e outras substâncias já bastante estudadas.

2.8 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS COCRISTAIS

Os métodos de obtenção de cocrystal podem ser divididos em dois tipos: cinéticos e termodinâmicos (ANDERTON, 2007).

Métodos termodinâmicos são usados para obter uma forma de cristal estável nas condições dadas, são métodos lentos e ocorrem em condições próximas ao equilíbrio (NEWMAN, 2013). Os métodos termodinâmicos incluem cristalização por meio da evaporação lenta do solvente, cristalização por fusão e transformação da fase mediada por solução.

Os métodos cinéticos são mais adequados para pesquisar formas de cristal metaestáveis com valores de energia de Gibbs mais altos em comparação com cristais estáveis. As condições para esses métodos são de não-equilíbrio. Em alguns casos, energia adicional é fornecida para superar barreiras de energia e o processo geralmente leva minutos ou mesmo segundos. Os métodos cinéticos incluem moagem e rápida evaporação do solvente, como secagem por pulverização e cristalização a partir de meio supercrítico (ANDERTON, 2007).

Estes métodos diferem principalmente pela quantidade de líquido usado e dos meios para converter uma determinada quantidade de componentes de partida em cocristais. No entanto, esses métodos tradicionais mostram desvantagens na triagem para cocristais e também no aumento de escala. Uma desvantagem principal dos métodos de evaporação de solvente é que o componente menos solúvel pode cristalizar instantaneamente, conduzindo à formação parcial de cocrystal. Além disso, o solvente utilizado pode interferir com as interações intermoleculares do cocrystal desejado, e assim pode se incorporar na estrutura do cristal com a possibilidade de formação de solvato. Desvantagens adicionais para métodos baseados em solução é a necessidade de volumes relativamente grandes de solventes orgânicos e a grande quantidade de tempo necessária para obter os produtos. Portanto, o desenvolvimento de novos e melhores métodos para o rastreamento e produção de cocristais é de grande interesse (PADRELA et al., 2010).

2.8.1 Cocrystalização em solução

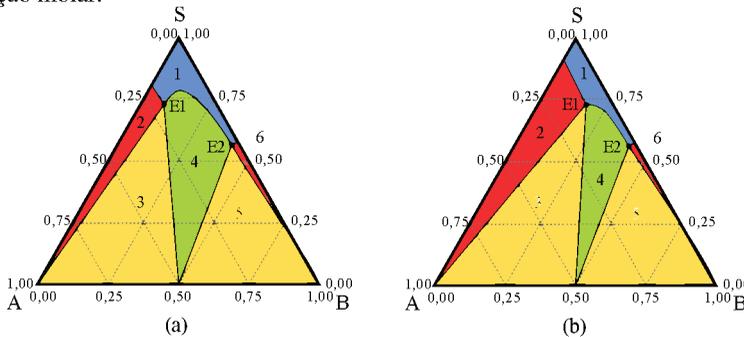
Cocrystalização por evaporação consiste na adição de dois ou mais componentes em um solvente volátil que possa solubilizar todos os cristais presentes. Com a evaporação do solvente, alcança-se um ambiente de supersaturação onde qualquer alteração no sistema resulta na nucleação do cocrystal. É o método mais simples, e por isso o mais utilizado, principalmente para a triagem de novos tipos de cocristais.

Nesse método, os dois componentes devem possuir uma solubilidade semelhante; caso contrário, o componente menos solúvel precipitará. No entanto, solubilidade semelhante apenas não garante o sucesso. Tem sido sugerido que pode ser útil considerar compostos polimórficos, que existem em mais do que uma forma cristalina como componentes para cocrystalização. Se um composto molecular existe em várias formas polimórficas demonstra que tem uma flexibilidade estrutural e que não está bloqueado em um único tipo de estrutura cristalina ou modo de empacotamento. Assim, aumenta-se a possibilidade de levar tal molécula a um arranjo de empacotamento diferente em presença de outra molécula. Claramente, polimorfismo sozinho não garante a funcionalidade de um composto para atuar como um agente de cocrystalização, ao passo que a capacidade de uma molécula para participar em interações intermoleculares, obviamente, desempenha um papel fundamental (BLAGDEN et al., 2007).

2.8.2 Diagramas de fases de cocristais

A termodinâmica resultante da cristalização dos componentes do cocristal (A e B) em um solvente S a uma dada temperatura pode ser mostrada em um diagrama ternário de fases (RAGER; HILFIKER, 2009). Quando o diagrama ternário de fases é conhecido, os experimentos de cristalização para produção de cocristais podem ser melhor projetados e os resultados previstos (CHIARELLA; DAVEY; PETERSON, 2007; CHILDS et al., 2008). A Figura 2.5a mostra um diagrama de fase ternário esquemático para dois componentes (A e B) de solubilidade semelhante em um dado solvente (S). O diagrama mostrado na Figura 2.5b é mais complicado e representa o caso em que os componentes têm solubilidades muito diferentes. As solubilidades dos componentes são uma característica importante nestes diagramas, uma vez que as diferenças alteram a localização e o tamanho das regiões da fase onde um cocristal potencial é termodinamicamente estável (CHILDS et al., 2008).

Figura 2.5 – Diagrama ternário de fase dos compostos A e B, que produzem um cocristal 1:1, no solvente S, a) quando as solubilidades de A e B variam pouco e b) quando a solubilidade de A é muito inferior à de B. As escalas estão em fração molar.



Fonte: adaptado de Rager e Hilfiker (2009)

Segundo Rager e Hilfiker (2009), os diagramas acima podem ser divididos em 6 regiões:

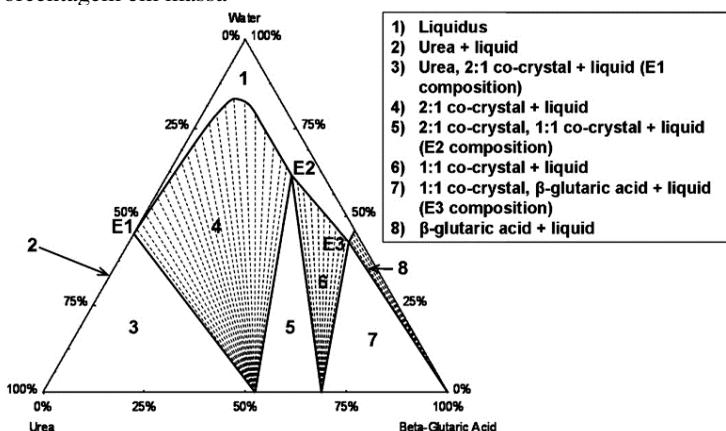
- Região 1: A e B se encontram totalmente dissolvidos e apenas uma fase líquida homogênea está presente.
- Região 2: apresenta o composto A no estado sólido e uma fase líquida.
- Região 3: apresenta o composto A sólido, o cocristal AB sólido e uma fase líquida.
- Região 4: apresenta o cocristal AB sólido e uma fase líquida.

- Região 5: apresenta o composto B sólido, o cocristal AB sólido e uma fase líquida.
- Região 6: Zona 2: apresenta o composto B no estado sólido e uma fase líquida.

E1 e E2 são os pontos eutéticos onde o líquido está em equilíbrio com as duas fases sólidas adjacentes (A e o cocristal no ponto E1 e B e cocristal no ponto E2). No caso de um sistema com comportamento semelhante ao da Figura 2.5a, uma solução com quantidade equimolares dos componentes levará a formação de um cocristal pela evaporação do solvente (passagem da região 1 para 4). Para sistemas com o comportamento semelhante ao da Figura 2.5b, a cocristalização em solução por meio da evaporação lenta de uma solução equimolar resultará no crescimento de um dos componentes sólidos ou em uma mistura sólida de cocristal e um dos componentes iniciais. Isso ocorre quando o caminho da cristalização passa pela região 2 ou 3.

Esse exemplo mostra um cocristal simples, no caso da existência de polimorfos, solvatos ou cocristais de diferentes estequiometrias teremos diagramas bem mais complexos (RAGER; HILFIKER, 2009) como, por exemplo, o da Figura 2.6 que foi reportado por Chadwick et al. (2009) para o sistema ureia, ácido glutárico e água que apresenta 3 pontos eutéticos e 8 regiões com características diferentes devido a formação de polimorfos do cocristal ureia-ácido glutárico.

Figura 2.6 – O diagrama de fase ternária ureia + ácido glutárico + água a 25 ° C em porcentagem em massa



Fonte: Chadwick et al. (2009)

Além dos diagramas ternários de fase, podemos descrever o comportamento de fase dos sistemas de cocristalização por meio de um diagrama de solubilidade de fase (NEHM; RODRÍGUEZ-SPONG; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2006), que mostra as concentrações da solução em equilíbrio com fases sólidas ou, por outras palavras, as curvas de solubilidade das fases sólidas A, B e cocristal AB em função da concentração da solução de A e B.

A dissociação do cocristal em solução é descrito, de forma análoga a um sal, pelo seu produto de solubilidade (K_{PS}) que é definido como o produto das concentrações dos componentes do cocristal na solução (NEHM et al., 2006). Essa constante reflete a força das interações no estado sólido do cocristal em comparação com as interações com o solvente.

Para um cocristal A_aB_b onde A é o princípio ativo e B o coformador, a solubilidade é descrita pelo equilíbrio químico entre o cocristal sólido e seus componentes em solução, sendo a constante desse equilíbrio dada por:



$$K = \frac{\alpha_A^a \alpha_B^b}{\alpha_{A_aB_b}} \quad (1)$$

Definindo a atividade do cocristal sólido como sendo igual a 1 e assumindo que os coeficientes de atividade de A e B são iguais a 1, temos:

$$K_{PS} = [A]^a [B]^b \quad (2)$$

Onde K_{PS} é o produto de solubilidade do cocristal. Considerando o equilíbrio acima, o balanço de massa para $[A] = a \cdot S_{A_aB_b}$ e $[B] = b \cdot S_{A_aB_b}$ pode ser substituído na equação 2 para obter-se a solubilidade do cocristal.

$$S_{A_aB_b} = \sqrt[a+b]{\frac{K_{PS}}{A_aB_b}} \quad (3)$$

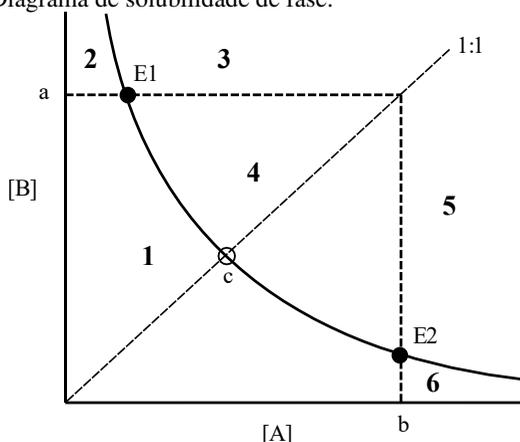
Essa solubilidade não é referida a solubilidade intrínseca, e sim baseada no equilíbrio químico para todos os solventes onde os componentes são substâncias não ionizadas.

No caso de um cocrystal onde os componentes se encontram na proporção 1:1, a equação 2 pode ser resumida a:

$$K_{PS} = [A][B] \quad (4)$$

Na Figura 2.7 temos um diagrama de solubilidade de fases genérico. As curvas representam o comportamento dos produtos de solubilidade dos cocrystal com a concentração do princípio ativo, $[A]$, em função do coformador, $[B]$, dada pela equação $[A] = K_{PS}/[B]$ baseado na equação 4.

Figura 2.7 – Diagrama de solubilidade de fase.



Fonte: adaptado de Childs et al. (2008).

Onde em 1 temos a região em que A e B se encontram totalmente dissolvidos e apenas uma fase líquida homogênea está presente, a região 2 apresenta o composto A no estado sólido e uma fase líquida, a região 3 apresenta o composto A sólido, o cocrystal AB sólido e uma fase líquida, a região 4 apresenta o cocrystal AB sólido e uma fase líquida, a região 5 apresenta o composto B sólido, o cocrystal AB sólido e uma fase líquida e a região 6 apresenta o composto B no estado sólido e uma fase líquida.

A linha horizontal começando no ponto (a) é a solubilidade do composto A e a linha vertical começando no ponto (b) é a solubilidade do composto B. A linha pontilhada representa a solução com a concentração estequiométrica do cocrystal em solvente puro e sua interseção com as curvas de solubilidade dos cocrystal indicam a máxima concentração de droga associada com a solubilidade do cocrystal. O comportamento do

produto de solubilidade do cocristal indica que concentrações elevadas de coformador estão associadas com níveis baixos de princípio ativo em solução. De um modo semelhante a um sal, cocristais exibem um efeito de íon comum onde a solubilidade diminui à medida que a concentração do contraíon aumenta (STAHL; WERMUTH, 2011).

2.9 CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS

O estudo de cocristais é realizado em três etapas: a primeira etapa abrange a escolha do API e dos possíveis coformadores, a segunda é sintetizar o cocristal utilizando técnica adequada e, finalmente a terceira etapa, realizar a caracterização do cocristal sintetizado mediante a avaliação das suas propriedades físico-químicas e estruturais.

Essa caracterização pode ser realizada pela aplicação de diferentes técnicas entre as quais se destacam: Difração de Raio X pelo método do pó (DRXP), Difração de Raio X de monocristal (DRXM), Espectroscopia no Infravermelho (IR, do inglês *Infrared Spectroscopy*), Espectroscopia Raman, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG, do inglês *Thermogravimetry*) e Análise Térmica Diferencial (DTA, do inglês *Differential Thermal Analysis*), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) (PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017).

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de difração de raio X pelo método do pó (DRXP), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (SEM). A seguir são apresentados alguns fundamentos relacionados a cada uma destas técnicas.

2.9.1 Difração de raio X pelo método do pó (DRXP)

A difração de raio X é uma técnica versátil e não destrutiva que revela informação detalhada acerca da composição química e da estrutura cristalográfica de matérias e compostos naturais ou sintetizados. Essa técnica é baseada na propriedade inerente de cada cristal em desviar, em um ângulo específico, a direção do raio X. Os ângulos de desvio ou espalhamento da radiação provocam um padrão de difração único para cada estrutura cristalina permitindo, assim, uma impressão digital para a sua identificação (TREMAYNE, 2004).

O comprimento de onda da radiação de raios-X é entre 0,01 e 10 nm, o que corresponde bem às distâncias de ligações atômicas e parâmetros de rede e é por isso que é normalmente escolhido para caracterização estrutural (BRITAIN et al., 1991).

Os raios-X incidentes em um cristal serão difratados se a lei de Bragg (equação 5) for cumprida:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (5)$$

onde n é a ordem de reflexão, λ é o comprimento de onda dos raios-X, d é o espaço interplanar num cristal e θ é o ângulo de incidência dos raios-X. Esta descreve a difração de feixe de raios-X monocromático que colidem num plano de átomos (BRITAIN et al., 1991).

A difração de raio-X de monocristal é utilizada para esclarecer a estrutura de materiais cristalinos, que podem variar de compostos inorgânicos a macromoléculas complexas, como proteínas ou polímeros. É possível saber tudo acerca da estrutura cristalina, desde que se obtenha o monocristal. A obtenção deste, é o passo mais difícil em todo este processo (SHAH; KAKUMANU; BANSAL, 2006).

Já a difração de raio-X de pó, é usada para caracterizar a estrutura cristalográfica, tamanho das partículas, e a orientação preferencial em amostras sólidas policristalinas. Este é um método de análise mais usado para a caracterização de materiais cristalinos desconhecidos. Os compostos são identificados comparando os dados da difração com os valores de uma base de dados de materiais conhecidos (SHAH et al., 2006).

2.9.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho é uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas por químicos orgânicos e inorgânicos. É, simplesmente, a medição da absorção de radiação de diferentes frequências por uma amostra colocada no caminho de um feixe de radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético. A frequência associada a modos de vibração molecular depende dos elementos presentes e do tipo de ligações. A análise por meio de espectroscopia no infravermelho tem como principal objetivo identificar os grupos funcionais de uma determinada amostra. Diferentes grupos

funcionais absorvem em frequências características de radiação no infravermelho do espectro (BARBOSA, 2007).

Vários sinais que indicam um potencial de ocorrência de cocristalização podem ser encontrados quando se compara os espectros no infravermelho dos componentes puros com os da potencial amostra de cocristal causada por novas ligações de hidrogênio com o coformador. Os mais proeminentes são os desvios nas bandas associadas às vibrações dos grupos doador e receptor de ligações de hidrogênio, tais desvios estão normalmente localizados fora da região da impressão digital (isto é, na faixa de $4000-1000\text{ cm}^{-1}$) (TREMAYNE, 2004).

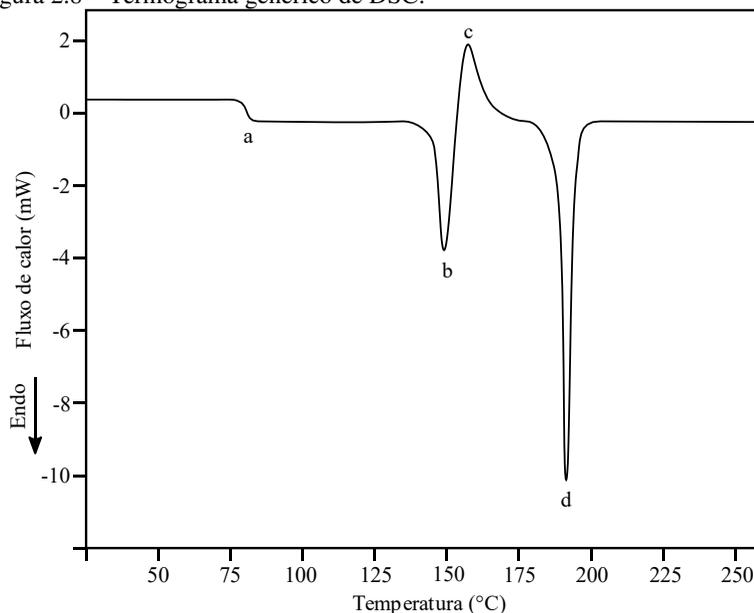
2.9.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica de análise térmica que registra o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura. É um método de variação entálpica, no qual a diferença no fornecimento de energia calorífica entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância em estudo e a referência são submetidas a um mesmo programa de aquecimento, ou arrefecimento, rigorosamente controlado (CHIU; PRENNER, 2011).

Os resultados são visualizados em um gráfico de fluxo de calor em função da temperatura. Uma varredura típica de DSC pode ser vista na Figura 2.8 onde são exemplificados alguns eventos térmicos que geram mudanças na curva que podem ser classificados como sendo transições de primeira ou segunda ordem.

Eventos de primeira ordem geram eventos na curva e podem ser endotérmicos (b e d) que podem corresponder por exemplo à fusão, dessorção e redução ou exotérmicos (c) que podem corresponder à cristalização, polimerização, oxidação e adsorção. As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica do material e geram um deslocamento da linha de base (a) como a transição vítrea. Ao integrar a área sob o pico de interesse, obtém-se a energia para essa transição de fase específica (CHIU; PRENNER, 2011).

Figura 2.8 – Termograma genérico de DSC.



2.9.4 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM)

O Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo (FESEM) é um instrumento que, assim como o SEM, fornece uma ampla variedade de informações da superfície da amostra, mas com maior resolução e uma faixa de energia muito maior. Funciona como um SEM convencional: a superfície da amostra é digitalizada com um feixe de elétrons, enquanto um monitor exibe as informações que nos interessam com base nos detectores disponíveis (ALMQVIST et al., 2001).

A maior diferença entre um FESEM e um SEM está no sistema de geração de elétrons. Como fonte de elétrons, o FESEM usa uma pistola de emissão de campo que fornece feixes de elétrons de alta e baixa energia extremamente focados, o que melhora bastante a resolução espacial e permite que o trabalho seja realizado em potenciais muito baixos (0,02–5 kV). Isso ajuda a minimizar o efeito de carga em amostras não condutivas e a evitar danos a amostras sensíveis a feixe de elétrons.

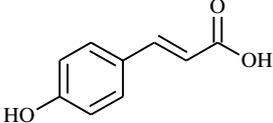
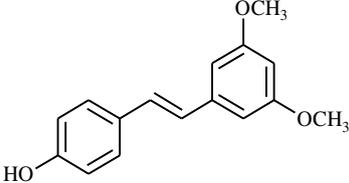
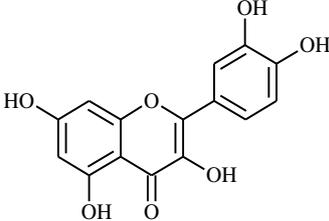
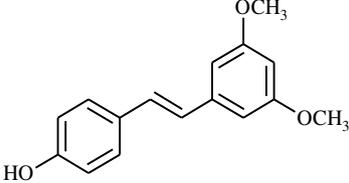
Estudos baseados em microscopia eletrônica (FESEM) sugeriram vantagens significativas como: foco em alta resolução, capacidade de medir propriedades estruturais e micromecânicas e o potencial de geração de imagens com alta precisão (ALMQVIST et al., 2001; MASSÉ et al., 2001).

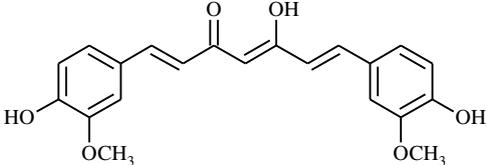
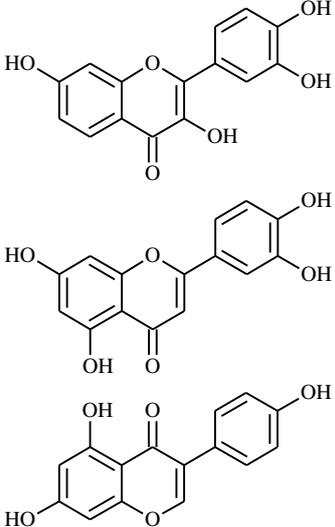
2.10 COCRISTAIS CONTENDO NUTRACÊUTICOS

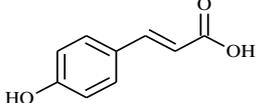
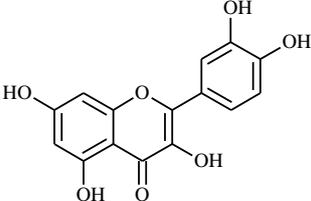
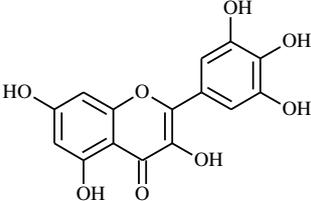
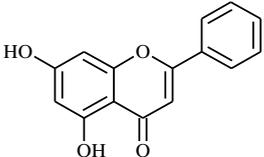
Nutracêuticos são compostos químicos bioativos que estão presentes em alimentos, plantas ou qualquer outro material de ocorrência natural e que atuam com promoção da saúde, prevenção de doenças e/ou propriedades medicinais (SEKHON, 2012). Nutraceuticos se sobrepõem com outros produtos de saúde, tais como produtos farmacêuticos e fitoterápicos (KALRA, 2003).

Os nutraceuticos se estabeleceram como seguros e estão prontamente disponíveis sob boas práticas de produção. Porém, muitos nutraceuticos têm grandes problemas com baixa solubilidade em água e, portanto, baixa biodisponibilidade. Esse fato faz com que eles possam ser usados como candidatos para a formação de cocristais (SEKHON, 2012). No Quadro 2.2 temos alguns estudos envolvendo a cocrystalização de nutraceuticos a fim de melhorar as suas propriedades físico-químicas.

Quadro 2.2 – Alguns estudos publicados na literatura sobre cocristais que apresentam componentes nutraceuticos.

Nutracêuticos	Fórmula molecular	Coformador	Referência
Ácido p-cumárico		Cafeína Teofilina	(SCHULTHEISS; ROE; BOERRIGTER, 2011)
Pterostilbeno		Cafeína Carbamazepina	(SCHULTHEISS et al., 2010)
Quercetina		Cafeína Isonicotinamida Teobromina	(SCHULTHEISS et al., 2010)
Pterostilbeno		Piperazina Ácido glutárico	(BETHUNE et al., 2011)

Curcumina		Rersorcinol Pirogalol	(SANPHUI et al., 2011)
Fisetina Luteolina Genisteína		Nicotinamida Isonicotinamida	(SOWA; SLEPOKURA; MATCZAK-JON, 2013)

Ácido p-cumárico		Nicotinamida	(BEVILL; VLAHOVA; SMIT, 2014)
Quercetina		Nicotinamida Ácido picolínico	(VASISHT et al., 2016)
Miricetina		Acetamida	(MUREȘAN-POP et al., 2016)
Crisina		Citosina Cloridrato de tiamina	(CHADHA et al., 2017)

Os nutracêuticos que apresentam alta solubilidade em água podem ser usados como coformadores na produção de cocristais de ingredientes ativos farmacêuticos de baixa solubilidade. Elbagerma et al. (2011) produziram e caracterizaram um cocristal formado por paracetamol e ácido cítrico como coformador. Ravikumar, Gaddamanugu e Anand Solomon (2013) produziram um cocristal contendo isoniazida, fármaco antituberculose muito potente, com ácido p-cumárico como coformador. Veverka (2013) reportaram a produção de cocristais formados por edaravona (um agente neuroprotector) e vários ácidos fenólicos como coformadores.

2.11 RESVERATROL

O resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno) (Figura 2.9b) é uma fitoalexina presente numa grande variedade de espécies vegetais. Estes produtos químicos são caracterizados por sua baixa massa molar e sua capacidade de inibir o progresso de infecções. É um polifenol derivado do estilbeno (Figura 2.9a) produzido em plantas em resposta ao ataque de patógenos, a radiação ultravioleta e a exposição ao ozônio (CAMONT et al., 2009). Foi isolado pela primeira vez a partir das raízes de heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) em 1940 (TAKAOKA, 1939), sendo que as fontes naturais mais ricas nesse composto são extratos de uvas escuras (*Vitis vinifera*) e raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta usada na medicina tradicional chinesa e japonesa. Ele também está presente em outras plantas como amoras, amendoim, mirtilo, morango e em seus produtos (SATO et al., 2000; SOLEAS et al., 1997). A quantidade de resveratrol presente em algumas fontes naturais pode ser vista no Quadro 2.3. O resveratrol é um composto solúvel em lipídeos, etanol, dimetil sulfóxido e praticamente insolúvel em água. É altamente permeável sendo considerado de classe II segundo a BCS (LI et al., 2016; ZHOU; LI; et al., 2016)

Quadro 2.3 – Quantidade de resveratrol em algumas fontes naturais

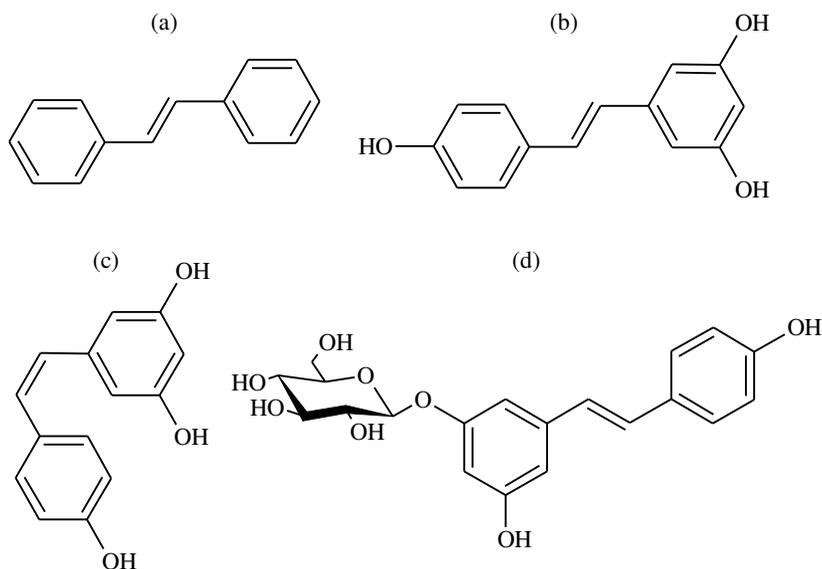
Fonte	Concentração de trans-resveratrol	Comentários
Vinhos tintos	0,1 – 14,3 mg·L ⁻¹	Cis- resveratrol, trans-glicuronídeo ¹ e cis-glicuronídeo também estão presentes em concentrações menores
Vinhos brancos	0,1 – 2,1 mg·L ⁻¹	Em geral, o resveratrol é encontrado em concentrações abaixo de 0,1 mg·L ⁻¹ , exceções incluem vinhos Riesling suíço, português e alemão, cis-resveratrol, trans-glicuronídeo e cis-glicuronídeo também estão presentes.
Sucos de uva vermelha	0,50 mg·L ⁻¹ (média)	Trans-glicuronídeo, cis-glicuronídeo e cis-resveratrol encontrados na concentração de 3,38 mg·L ⁻¹ , 0,79 mg·L ⁻¹ e 0,06 mg·L ⁻¹ , respectivamente
Sucos de uva branca	0,05 mg·L ⁻¹ (média)	Trans-glicuronídeo e cis-glicuronídeo encontrados na concentração de 0,18 mg·L ⁻¹ e 0,26 mg·L ⁻¹ , respectivamente
Uvas	0,16 – 3,54 mg·kg ⁻¹	Os conteúdos são semelhantes para uvas de vinho ou de mesa, uvas pretas ou brancas. Trans-glicuronídeo é predominante em concentrações de 1.5-7.3 µg·g ⁻¹
Casca de uva seca	24,06 mg·kg ⁻¹ (média)	Trans-glicuronídeo e cis-glicuronídeo encontrados em concentrações de 42,19 µg·g ⁻¹ e 92,33 µg·g ⁻¹ , respectivamente
Mirtilos	Maior que 0,032 mg·kg ⁻¹	
Amendoins	0,02 – 1,92 mg·kg ⁻¹	
Amendoins assados	0,055 mg·kg ⁻¹	
Amendoins cozidos	5,1 mg·kg ⁻¹	

Fonte: adaptado de Baur e Sinclair (2006).

¹Glicuronídeo é um glicosídeo estilbenoide e é um dos principais derivados do resveratrol (ROMERO-PÉREZ et al., 1999).

O resveratrol existe como dois isômeros estruturais: cis (Z) e trans (E), que diferem na distribuição espacial dos grupos em torno da ligação dupla da cadeia alifática (Figura 2.9b e Figura 2.9c). Embora as duas formas ocorram na natureza, o trans-resveratrol é biologicamente mais ativo do que o isômero cis (MUKHERJEE; DUDLEY; DAS, 2010). O “piceid” (Figura 2.9d) é a forma de resveratrol predominante nas fontes alimentares, sendo posteriormente convertido em trans-resveratrol por meio de hidrólise (UDENIGWE et al., 2008).

Figura 2.9 – Fórmula molecular do estilbeno (a), trans-revesratrol (b), cis-revesratrol (c) e trans- piceid (d).



Embora isômero cis seja menos estável que isômero trans, devido a tensão causada pela aglomeração de dois fenóis volumosos do mesmo lado na forma cis (CHADHA; DUREJA; KARAN, 2016), a isomerização para cis pode ocorrer quando a forma trans é exposta a luz solar, a luz artificial ou a radiação ultravioleta a um comprimento de onda de 254 ou 366 nm (BASLY et al., 2000; CAMONT et al., 2009; CHEN, X. et al., 2007).

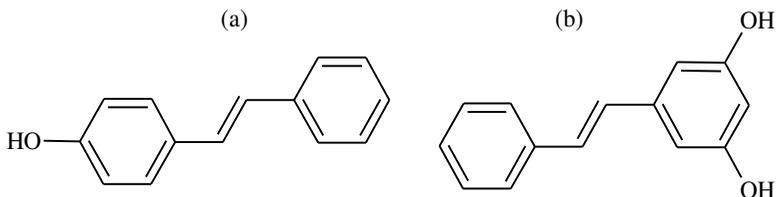
2.12 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO RESVERATROL

Embora o resveratrol tenha sido isolado décadas atrás, apenas nos últimos anos esse polifenol tem recebido maior atenção por causa de suas extensas propriedades biológicas (CAMONT et al., 2009). Algumas dessas propriedades são descritas a seguir.

2.12.1 Capacidade antioxidante

O resveratrol pode atuar como antioxidante e como sequestrador de radicais livres, impedindo que se gere um estado de stress oxidativo. A sua capacidade antioxidante depende das propriedades redox dos grupos fenólicos e do potencial de deslocalização de elétrons ao longo da estrutura química. Trans-resveratrol e trans-4-hidroxiestilbeno (Figura 2.10a) apresentaram capacidade semelhante em capturar radicais livres e superioridade quando comparados ao trans-3,5-di-hidroxiestilbeno (Figura 2.10b), sugerindo que o grupo hidroxila presente na posição 4 apresenta dominância quando comparado ao mesmo grupo presente na posição 3 e 5 (STOJANOVIĆ; SPRINZ; BREDE, 2001).

Figura 2.10 – Fórmulas moleculares do trans-4-hidroxiestilbeno (a) e trans-3,5-di-hidroxiestilbeno (b).



Os mecanismos envolvidos, que lhe conferem propriedades antioxidantes, são a sua capacidade de competir com a coenzima Q10, diminuindo a atividade da cadeia oxidativa e, conseqüentemente, a produção de ERO (espécies reativas de oxigênio, sequestrar, efetivamente, os radicais $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, produzidos pelas mitocôndrias e sequestrar efetivamente a formação de radicais induzidos pelos metais (BO et al., 2013; BUONOCORE et al., 2012; DE GROOTE et al., 2012; DE LA LASTRA; VILLEGAS, 2007; GHANIM et al., 2011; HEGER et al., 2012).

2.12.2 Propriedades antimicrobianas

Dado que o resveratrol é uma fitoalexina, intervindo na defesa das plantas contra microrganismos, tem sentido estudar o seu potencial como agente antibacteriano. Deste modo, verificou-se que o resveratrol possui propriedades bacteriostáticas, principalmente, contra bactérias gram positivas possivelmente devido as características da parede celular destes microrganismos (PAULO et al., 2010). O resveratrol é ativo contra: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Propionibacterium acnes*. De acordo com o estudo publicado por Chan (2002), foi testada a hipótese do resveratrol possuir atividade antifúngica sobre os fungos: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Mycrosporium gypseum* e agentes etiológicos das micoses cutâneas: *tinea pedis* (“pé de atleta”), *tinea corporis* (afeta a zona do tronco) e *tinea cruris* (afeta a zona das virilhas). Deste estudo concluiu-se que o resveratrol inibiu o crescimento de todas estas espécies de dermatófitos.

2.12.3 Potencial anticancerígeno

O resveratrol tem a capacidade de atuar nas etapas de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese, inibindo-as a nível molecular. A etapa de iniciação ocorre quando há uma alteração no material genético (mutação) de uma célula normal, por ação de um agente carcinogênico ou por um defeito genético inerente à própria célula. Nesta etapa, o resveratrol tem a capacidade de atuar por meio da supressão da ativação metabólica de agentes carcinogênicos e/ou do aumento da destoxificação por meio da modulação da atividade de enzimas envolvidas em reações de fase I (compostos lipofílicos são transformados em carcinogênicos eletrofílicos) e de fase II (convertem os metabolitos primários em compostos mais hidrossolúveis). Na etapa da promoção um agente promotor provoca a expansão clonal da célula iniciada, seletivamente. Nesta situação, o resveratrol atua na prevenção do câncer por meio da inibição da ativação de proteínas quinases. Além disso, o resveratrol induz a agregação de receptores de morte celular no microdomínio lipídico, induzindo a formação de um complexo de sinalização indutor de morte que por sua vez conduz à ativação da cascata das caspases, resultando também em morte celular. Na etapa de progressão ocorre a

expansão de uma população de células iniciadas que, posteriormente, são convertidas em células malignas, conduzindo à formação do câncer. Nessa etapa o resveratrol atua como um agente terapêutico bloqueando a progressão do ciclo celular e induzindo a apoptose. (HOWELLS et al., 2011; PATEL et al., 2010; POPAT et al., 2013; WESTON; HARRIS, 2003; ZHU et al., 2012).

2.12.4 Efeito cardioprotetor

A molécula de resveratrol demonstra possuir propriedades bastante promissoras que contribuem para diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudos recentes revelam que, em ratos, é capaz de produzir efeitos cardioprotetores por meio da atenuação da produção de ERO, melhorando a função endotelial, da inibição de processos inflamatórios e da diminuição da taxa de apoptose endotelial além de atuar sob os mecanismos de agregação plaquetária, propriedades vasodilatadoras e efeitos benéficos sob os níveis de colesterol e triglicérides (BHULLAR; UDENIGWE, 2016; DAS; DAS, 2007; TANG et al., 2014).

2.12.5 Atividade anti-inflamatória

As propriedades anti-inflamatórias do resveratrol têm sido largamente estudadas, observando-se que ocorre uma redução dos níveis de marcadores inflamatórios (quimiocinas e citocinas). Inúmeros estudos têm demonstrado que o resveratrol tem capacidade de atuar nos processos inflamatórios por meio das suas propriedades antioxidantes, pois ao combater o stress oxidativo irá atenuar a inflamação subjacente, causada pela ativação de proteínas quinases (DIAZ-GEREVINI et al., 2016; GHANIM et al., 2010; MAIA et al., 2012; TOMÉ-CARNEIRO et al., 2012).

2.13 TOXIDADE DO RESVERATROL

Existem poucas informações com relação a toxicidade do resveratrol. Em ratos, uma dose de 300 mg não tem efeito tóxico, porém, uma dose de 1 g·kg⁻¹ começa a produzir efeitos adversos como desidratação e perda de peso. Uma dose de 3 g·kg⁻¹ começa ter uma alta toxicidade, provocando danos hepáticos, renais e anemia (CROWELL et al., 2004). Uma dose de 18 g·kg⁻¹ é mortal para maioria dos animais

estudados. Em humanos doses únicas de 10 g de resveratrol são bem toleradas (KNUTSON; LEEUWENBURGH, 2008).

2.14 COCRISTAIS DO RESVERATROL

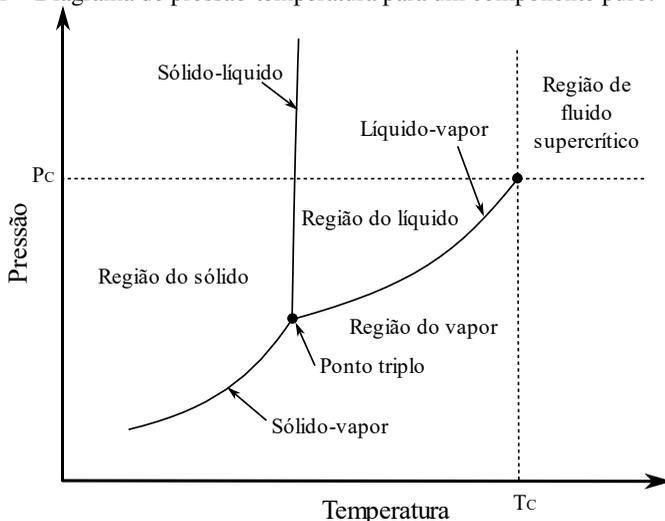
Existem apenas três estudos publicados envolvendo a cocristalização do resveratrol. Kavuru et al. (2010) utilizaram o resveratrol como coformador na obtenção de cocristais de betaína e Zhou et al. (2016) cocristalizaram o resveratrol com dois coformadores (4-aminobenzamida e isoniazida) utilizando moagem assistida por solvente e remoção rápida de solvente. He et al. (2017) produziram cocristais do RES com três coformadores (nicotinamida, isonicotinamida e l-Proline) usando evaporação lenta de uma solução preparada com uma mistura de solventes orgânicos (acetona, hexano e tolueno no caso da nicotinamida). Até o momento não foi publicado nenhum estudo sobre a produção de cocristas do resveratrol utilizando a tecnologia supercrítica.

2.15 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Um fluido supercrítico é aquele que se encontra simultaneamente acima temperatura (T_c) e pressão crítica (P_c). Suas propriedades termofísicas podem ser ajustadas por pequenas mudanças na temperatura e/ou pressão. Ainda suas características de densidade os tornam adequados como solventes para uma grande variedade de solutos, onde qualquer mudança na pressão ou temperatura, perto do ponto crítico, pode alterar seu poder de dissolução, assim como a sua seletividade. Os fluidos supercríticos são altamente compressíveis com densidades que são próximas ao líquido e propriedades de transporte semelhantes a de um gás (BRUNNER, 1994).

No diagrama da Figura 2.11, é possível distinguir três fases de uma substância pura, neste esquema simplificado, as regiões de fases simples são separadas pelas curvas de equilíbrio sólido-líquido, curva de equilíbrio sólido-vapor e curva de equilíbrio líquido-vapor. Na intercessão das três curvas se encontra o ponto triplo, onde a substância está no estado sólido, líquido e gasoso. Sobre a curva de equilíbrio líquido-vapor, curva de pressão de vapor, está no estado líquido e gasoso. No final dessa curva temos o ponto crítico, acima do qual temos a região de fluido supercrítico. No ponto crítico as propriedades de líquido saturado e vapor saturado são iguais.

Figura 2.11 – Diagrama de pressão-temperatura para um componente puro.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

2.15.1 Propriedades de fluidos supercríticos

Na Tabela 2.1 são apresentadas algumas propriedades referentes a fase líquida e gasosa em comparação ao fluido supercrítico. O fluido supercrítico tem uma baixa viscosidade e alta difusividade como gás, mas uma massa específica semelhante à de um líquido (RANDOLPH, 1990).

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas de líquidos, gases e fluidos supercríticos.

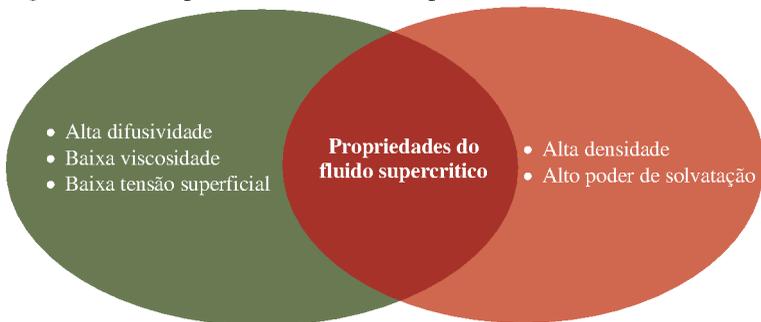
Propriedade	Líquido	Fluído Supercrítico	Gás
Massa específica ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	1	0,3	10^{-3}
Viscosidade ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	10^{-2}	10^{-4}	10^{-4}
Difusividade ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	$5\cdot 10^{-6}$	10^{-3}	0,1

Fonte: Adaptado de Starmans e Nijhuis (1996)

O poder de solvatação de um fluido supercrítico é depende da sua massa específica que pode ser ajustada pela variação de pressão ou temperatura. Próximo ao ponto crítico uma pequena elevação de pressão aumenta consideravelmente a massa específica do fluido. Este efeito

diminui quando nos afastamos dos valores de pressão e temperatura críticos, por isso o poder de solvatação de um fluido supercrítico pode ser controlado mais facilmente do que o de um solvente líquido (RANDOLPH, 1990).

Figura 2.12 – Propriedades dos fluidos supercríticos.



Na Tabela 2.2, temos exemplos da temperatura, pressão e massas específicas críticas de algumas substâncias.

Tabela 2.2 – Propriedades críticas de alguns compostos.

Solvente	T _C (°C) ^a	P _C (MPa) ^b	ρ _C (g·cm ⁻³) ^c	V _C (cm ³ · mol ⁻¹) ^d
Metano	-82,6	4,60	0,16	99
Xenon	16,6	5,84	1,15	118
Dioxido de carbono	31,0	7,38	0,47	94
Etano	32,2	4,87	0,20	146
Oxido de dinitrogênio	36,4	7,26	0,45	97
Hexafluoreto de enxofre	45,5	3,77	0,74	199
Propano	96,7	4,25	0,22	200
Amônia	132,4	11,4	0,24	72
Metanol	239,4	8,08	0,27	117
Etanol	240,9	6,14	0,28	168
Água	374,0	22,1	0,32	56

Legenda: (a) temperatura crítica, (b) pressão crítica, (c) massa específica crítica e (d) volume molar crítico

Fonte: adaptado de Reichardt (2006).

O composto com propriedades críticas mais interessantes (baixa temperatura crítica e pressão crítica) entre esses compostos é o dióxido de carbono (CO₂). Além de ser ambientalmente limpo e poder ser removido

do produto mediante um sistema de despressurização simples, o CO₂ supercrítico também fornece um meio inerte apropriado para processar facilmente substâncias oxidáveis. Além disso, a alta solubilidade da maioria dos solventes orgânicos em fluidos supercríticos permite a obtenção de produtos isentos de solventes (COCERO et al., 2009; MIGUEL et al., 2006; NALAWADE; PICCHIONI; JANSSEN, 2006).

2.15.2 Fluidos supercríticos como antissolventes

A precipitação de compostos dissolvidos a partir de uma solução utilizando fluidos supercríticos como antissolventes pode ser realizada por várias técnicas sendo a diferença entre elas a forma como ocorre o contato entre a solução e o fluido supercrítico (FRANCESCHI et al., 2009).

Gallagher et al. (1989) descreveram o primeiro método empregando antissolvente pressurizado (Gas Antisolvent - GAS). Este processo foi desenvolvido para recristalizar compostos sólidos que são insolúveis em fluidos supercríticos. Devido à dissolução do gás comprimido, o solvente expande tendo uma força menor do que o solvente puro. A mistura fica supersaturada, levando a precipitação do soluto em micropartículas (JUNG; PERRUT, 2001).

Outra técnica utilizada é o SAS (Antissolvente Supercrítico). Essa técnica se diferencia pela forma de contato do fluido supercrítico. A solução é pulverizada para uma câmara onde já está presente o fluido supercrítico, provocando o rápido contato entre eles, o que resulta na geração de partículas (YEO; KIRAN, 2005). Na técnica de SEDS (dispersão de solução melhorada por fluidos supercríticos – “*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*”) a solução líquida, contendo o soluto e o solvente orgânico, é pulverizada em conjunto com o fluido supercrítico. O fluido supercrítico é utilizado tanto como antissolvente como meio de dispersão para solução. A alta velocidade do contato entre os fluxos da solução e do fluido gera a precipitação das partículas (YEO; KIRAN, 2005). Boschetto et al. (2013) utilizaram a técnica SEDS para encapsular extrato de sementes de uva poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) biocompatível (PHBV) obtendo partículas esféricas com tamanho de 0,70 µm e eficiência de encapsulação de 66%.

A utilização de fluidos supercríticos na produção de cocristais é recente, o Quadro 2.4 resume os trabalhos disponíveis na literatura que relatam a utilização de meio supercrítico para produção de cocristais.

Quadro 2.4 – Principais técnicas utilizadas na produção de cocrystalis em meio supercrítico

Referência	Técnica(s)	Princípio ativo	Coformador(es)	Objetivo
(PADRELA et al., 2009)	CSS ¹ SAS ² AAS ³	Indometacina	Sacarina	Produzir cocrystalis de indometacina e sacarina pelas 3 técnicas e comparar a morfologia e tamanho de partícula, da solubilidade e taxa de dissolução.
(PADRELA et al., 2010)	SEA ⁴	Indometacina Teofilina Cafeína Sulfametazina Aspirina Carbamazepina	Sacarina	Produzir cocrystalis de diferentes princípios ativos com sacarina e comparar a morfologia e o tamanho das partículas obtidas.
(SHIKHAR et al., 2011)	GAS ⁵	Carbamazepina	Nicotinamida	Formular e caracterizar cocrystalis de carbamazepina e nicotinamida e complexos de inclusão destes cocrystalis com α -ciclodextrina comparar suas solubilidades e taxas de dissolução.
(OBER; GUPTA, 2012)	GAS	Itraconazole	Ácido succínico	Produzir cocrystal de itraconazole e ácido succínico utilizando a técnica GAS e comparar com o mesmo cocrystal produzido por antissolvente líquido.
(OBER; MONTGOMERY; GUPTA, 2013)	GAS	Itraconazole	Ácido L-málico	Produzido um cocrystal de itraconazole e ácido L-málico utilizando a técnica GAS e comparar com o mesmo cocrystal produzido por antissolvente líquido.

Referência	Técnica(s)	Princípio ativo	Coformador(es)	Objetivo
(NEUROHR et al., 2013)	GAS	Naproxen	Nicotinamida	Produzir cocristal de naproxen e nicotinamida pela técnica GAS e comparar sua estrutura com a de cocristais dos mesmos componentes já relatados na literatura.
(TIAGO et al., 2013)	SEA	Teofilina	Sacarina	Gerar microcompositos distintos de teofilina pura, cocristais de teofilina-sacarina e dispersões de cada forma cristalina em óleo de palma hidrogenado comparando a estabilidade e a solubilidade e taxa de dissolução de cada forma.
(PADRELA et al., 2014)	SEA	Teofilina	Ureia Sacarina Ácido gentsílico Ácido salicílico Ácido glutárico Ácido sorbico Ácido 1-hidroxi-2-naftoico Ácido oxálico Ácido maléico Nicotinamida	Obter cocristais de teofilina com vários coformadores comparando a morfologia, tamanho das partícula, solubilidade e taxa de dissolução de cada.
(MÜLLERS; PAISANA; WAHL, 2015)	RESS ⁶	Ibuprofeno	Nicotinamida	Investigar a cocristalização e micronização simultânea do cocristal de ibuprofeno com nicotinamida na proporção 1:1 e avaliar sua solubilidade e taxa de dissolução.

Referência	Técnica(s)	Princípio ativo	Coformador(es)	Objetivo
(ERRIGUIBLE et al., 2015)	GAS	Naproxen	Nicotinamida	Aplicar um modelo matemático que descreve o processo de GAS à formação de um cocristal para estimar os parâmetros de nucleação e crescimento.
(IMCHALEE; CHAROENCHAITRA KOOL, 2015)	GAS	sulfametoxazol a	Ácido L-málico	Aumentar a taxa de dissolução do sulfametoxazol formando um cocristal com ácido L-málico usando a técnica GAS.
(HARSCOAT-SCHIAVO et al., 2015)	GAS	Ácido aminosalicílico	Nicotinamida	Investigar a recristalização induzida por CO ₂ comprimido como um antissolvente foi como uma nova maneira de produzir polimorfos e cocristais de isômeros posicionais do ácido aminosalicílico com nicotinamida.
(PADRELA et al., 2015)	CSS	Indometacina Teofilina Cafeína Sulfametazina Aspirina carbamazepine	Sacarina	Avaliar os mecanismos subjacentes à técnica CSS por meio da produção de cocristais vários princípios ativos com sacarina como coformador.
(NEUROHR et al., 2015)	GAS	Naproxen	Nicotinamida	Investigar a cocristalização da mistura racêmica de naproxeno com a nicotinamida.
(NEUROHR et al., 2016)	SAS	Naproxen	Nicotinamida	Avaliar a cocristalização de naproxeno com nicotinamida pela técnica GAS focando nos efeitos taxa de alimentação do CO ₂ e da solução.
(CUADRA et al., 2016)	SAS	Diflunisal	Nicotinamida	Investigar a cocristalização de diflunisal com nicotinamida avaliado o efeito da temperatura,

Referência	Técnica(s)	Princípio ativo	Coformador(es)	Objetivo
				pressão, concentração de diflunisal e nicotinamida na solução inicial.
(HIENDRAWAN et al., 2016)	SAS	Paracetamol	Ácido dipicolínico	Produzir cocristal de paracetamol e ácido dipicolínico usando a técnica SAS para melhorar o seu perfil de tabletabilidade.
(KOTBANTAO; CHAROENCHAITRA KOOL, 2017)	GAS	Cetoconazol	Ácido 4-aminobenzóico	Melhorar a taxa de dissolução do cetoconazol em água, formando um cocristal com ácido 4-aminobenzóico.
(CUADRA et al., 2018)	SAS	Carbamazepine	Sacarina	Investigar a produção do cocristal de carbamazepina e sacarina.
(WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRA KOOL, 2018)	GAS	Ácido mefenâmico	nicotinamida	Produzir cocristal ácido mefenâmico-nicotinamida a fim de melhorar a taxa de dissolução deste e avaliar os efeitos da temperatura de operação, razão molar e porcentagem de saturação na solução inicial.

¹ Cocristalização com solvente supercrítico (Cocrystallization With Supercritical Solvent).

² Antissolvente supercrítico (Supercritical Anti-Solvent).

³ Atomização e antissolvente (Atomization and Anti-Solvent)

⁴ Atomização melhorada por fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Enhanced Atomization).

⁵ Antissolvente gasoso (Gas Anti-Solvent).

⁶ Rápida expansão de soluções supercríticas (Rapid Expansion of Supercritical Solutions).

Das técnicas apresentadas no Quadro 2.4, apenas a técnica CSS utiliza o CO₂ supercrítico como solvente, todas as outras o utilizam com antissolvente. O dióxido de carbono (CO₂) é o fluido supercrítico mais comumente utilizado em cocristalizações porque não é tóxico nem inflamável, é barato, naturalmente abundante e possui parâmetros críticos suaves (Temperatura crítica 31,1 °C e pressão crítica 73,8 bar) (ERRIGUIBLE et al., 2015; OBER; GUPTA, 2012; WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRAKOOL, 2018).

CAPÍTULO 3

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, serão apresentados os materiais e os métodos de produção e caracterização de cocristais utilizados neste estudo. Primeiramente, todos os materiais serão apresentados em detalhes, incluindo o nome, fórmula, pureza e fabricante.

Serão apresentadas as metodologias empregadas nas técnicas de processamento utilizadas nesse trabalho para produção de cocristais, como a cristalização com solvente supercrítico (CSS), antissolvente gasoso (GAS) e antissolvente líquido (LAS).

Em seguida, os métodos de caracterização serão apresentados, incluindo espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raio X de pó (DRXP) e microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (FESEM). Essas abordagens analíticas foram aplicadas para identificar a formação do cocristal e caracterizar suas propriedades físico-químicas.

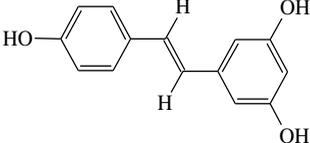
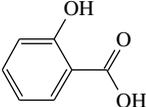
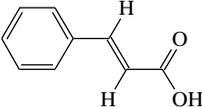
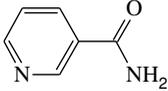
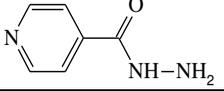
Para finalizar, estudos da taxa de dissolução foram realizados para investigar e comparar o perfil de dissolução dos cocristais com o resveratrol.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Princípio ativo e coformadores

Trans-resveratrol, com uma pureza de 99,5%, foi adquirido da SM Empreendimentos – São Paulo/SP, Brasil. Ácido salicílico (99,0%), ácido cinâmico (99,0%), ácido cítrico (99,5%), isoniazida (99,0%) e nicotinamida (99,0%) foram adquiridos da VETEC (Sigma-Aldrich). No Quadro 3.1 podemos ver resumidas algumas propriedades desses compostos.

Quadro 3.1 – Propriedades do resveratrol e dos coformadores utilizados nesse trabalho.

Substância	M ^a (g/mol)	Fórmula molecular	S ^b (mg/L)	T.F. ^c (°C)
Trans-resveratrol	228,25		0,3	268
Ácido salicílico	138,12		2240	159
Ácido cinâmico	148,16		400	134
Nicotinamida	122,12		500000	130
Isoniazida	137,14		140000	171

Legenda: (a) Massa molar; (b) solubilidade em água; (c) temperatura de fusão.

Fonte: Projeto PubChem, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.1.2 Solvente

Acetona (99,5%) e etanol (99,8%) foram adquiridos da Neon comercial LTDA/SP, acetato de etila foi adquirido da Labssynth/SP, dióxido de carbono (99,9% em fase líquida) foi fornecida pela White Martins S.A. Todos os produtos químicos foram utilizados como recebidos, sem purificação adicional. Algumas propriedades dos solventes orgânicos utilizados nesse trabalho são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Propriedades dos solventes orgânicos utilizados nesse trabalho.

Solvente	π^a	$\Sigma\alpha^b$	$\Sigma\beta^c$	μ^d	ϵ^e	τ^f	Classe ICH – Solventes residuais ^g
Acetato de etila	0,55	0,00	0,45	1,78	5,99	0,42	3
Acetona	0,71	0,04	0,49	2,88	20,49	0,31	3
Etanol	0,54	0,37	0,48	1,69	24,85	1,07	3

Legenda:

^a polaridade/dipolaridade;

^b propensão como doador de ligação de hidrogênio;

^c propensão como acceptor de ligação de hidrogênio;

^d momento dipolar;

^e constante dielétrica em Debye;

^f viscosidade em (mPa·s, 25°C);

^g classificação ICH na qual 1 corresponde a “solventes a serem evitados”, 2 corresponde a “solventes de uso limitado” e 3 corresponde a “solventes de baixo potencial tóxico”.

Fonte: Adaptado de Gu et al. (2004).

3.2 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE COCRISTAIS

Nessa seção serão apresentados e detalhados os métodos utilizados nesse trabalho para produção de cocristais.

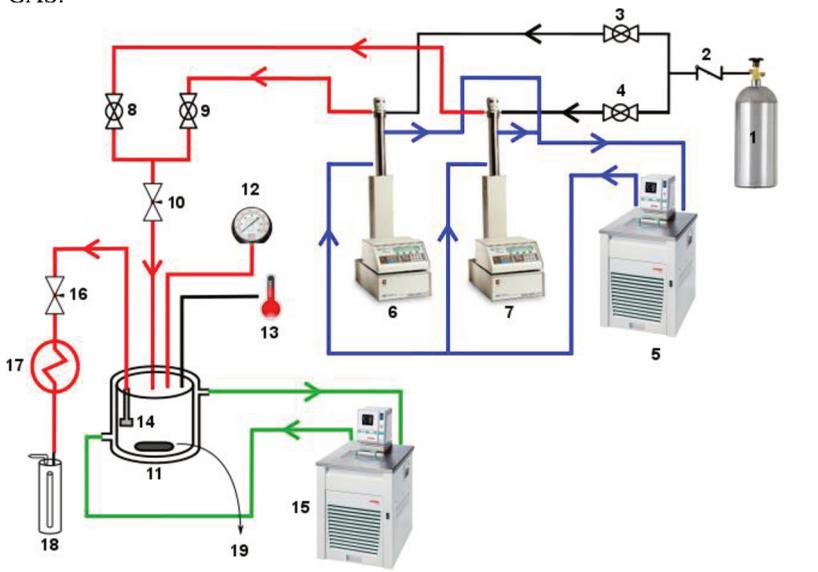
3.2.1 Antissolvente líquido (LAS)

A metodologia utilizada para produção de cocristais por meio de LAS foi adaptada de Ober e Gupta (2012). Resveratrol (0,3 g equivalente a 0,0013 mol) e coformador foram inicialmente dissolvidos em solvente orgânico (etanol, acetona e acetato de etila) suficiente para formar uma solução homogênea utilizando agitação magnética. A solução foi então filtrada através de um filtro de 0,44 μm (VertiClean™ PTFE) para remover qualquer material não dissolvido. O antissolvente (N-hexano) foi então gotejado na solução sob agitação contínua até a formação de precipitado. Após a precipitação, a suspensão foi centrifugada, o sobrenadante removido e o sólido colocado em estufa a vácuo a 40°C durante 24 h.

3.2.2 Unidade experimental utilizada na formação de cocrisais pelas técnicas GAS e CSS

O aparato experimental foi fundamentado na técnica que emprega fluidos pressurizados como antissolventes baseada no método *Gas Antisolvent* (GAS). A Figura 3.1 apresenta o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

Figura 3.1 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no método GAS.



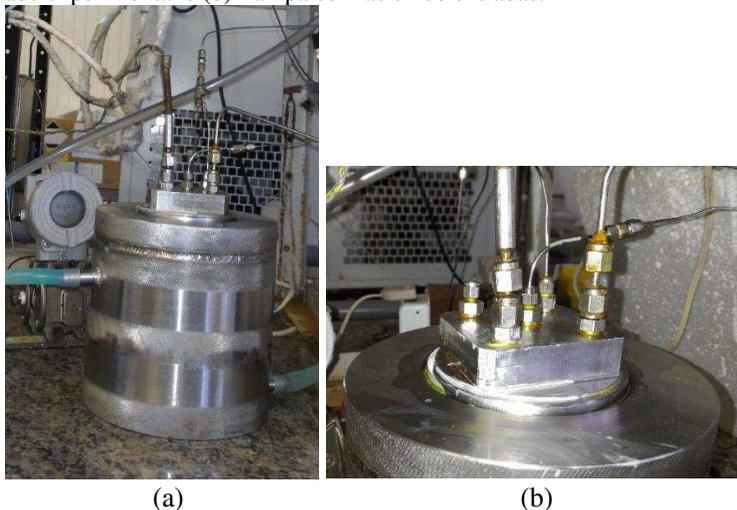
Fonte: adaptado de Franceschi et al. (2009).

Conforme a Figura 3.1, o aparato experimental para cocrystalização é constituído dos seguintes elementos:

- (1) Reservatório para armazenamento do dióxido de carbono (CO_2);
- (2) Válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (*Check-Valve* marca HIP, modelo 15-41AF1-T, pressão de operação até 1034 bar);
- (3) e (4) Válvulas de esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente para as bombas de alta pressão (marca Swagelok,

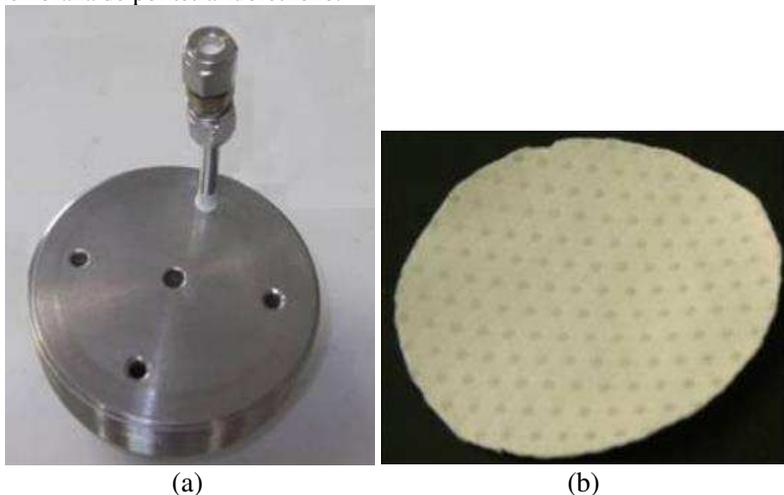
- modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (5) Banho ultratermostático de recirculação que mantém constante a temperatura nos cilindros das bombas de alta pressão (marca Nova Ética, modelo 521/2D);
 - (6) e (7) Bombas do tipo seringa de capacidade de 506 mL (marca ISCO, modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de $170 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). São utilizadas duas bombas para manter o fluxo de CO_2 sempre constante, e ainda por meio delas é pressurizado o CO_2 e visualizada a vazão;
 - (8) e (9) Válvulas de esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente pressurizado das bombas para a câmara de precipitação (marca Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente). Sempre são utilizadas alternadamente, dependendo da bomba que está deslocando o CO_2 para a câmara;
 - (10) Válvula métrica tipo agulha para controlar o fluxo e vazão de antissolvente das bombas de alta pressão para câmara de precipitação (marca HIP, modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);
 - (11) Câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316, encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm). Ela é constituída de cinco entradas na tampa: uma central, e quatro periféricas, onde uma está fechada. A Figura 3.2 apresenta a vista da câmara de precipitação e a tampa com as cinco entradas.
 - (12) Entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão que monitora a pressão dentro da câmara de precipitação. Ele está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação (Transdutor absoluto – 0 a 250 bar, marca SMAR, modelo LD 301);
 - (13) Entrada periférica onde fica um sensor de temperatura (termopar) ligado à um indicador de temperatura (Universal, marca NOVUS, modelo N 1500);

Figura 3.2 – Fotografias (a) Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade experimental e (b) Tampa com as cinco entradas.



- (14) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno, disposto na saída da câmara, para retenção das partículas precipitadas no seu interior, permitindo apenas o fluxo do antissolvente e solvente orgânico. Um filtro apresenta porosidade de $1\mu\text{m}$, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm que serve de base para o outro filtro membrana de porosidade $0,22\mu\text{m}$, espessura de $150\mu\text{m}$ e mesmo diâmetro que o primeiro. A Figura 3.3 mostra a tampa da câmara de precipitação com o suporte de filtros e os filtros utilizados.
- (15) Banho ultratermostático de recirculação (marca Nova Ética, modelo 512/2D), que serve para controlar a temperatura da câmara de precipitação, por meio da sua ligação com a camisa da câmara;
- (16) Válvula métrica tipo agulha (marca HOKE, modelo 1315G2Y) que fica na saída da câmara de precipitação. Por meio desta válvula é possível controlar o fluxo de saída da câmara de precipitação, juntamente com a válvula (10);
- (17) Fita de aquecimento (marca FISATON, modelo 5, 200 W de potência) que envolve a válvula (16). Ela é utilizada devido ao efeito Joule-Tomphson ser pronunciado pela expansão do antissolvente após esta válvula congelando-a. A temperatura utilizada na fita de aquecimento é 200°C , impedindo o congelamento da válvula e permitindo o controle do fluxo;

Figura 3.3 – Tampa mostrando o suporte onde o filtro é inserido e (b) filtro de membrana de politetrafluoretileno.



- (18) *Trap* de segurança, recheado com algodão, onde é possível observar a ocorrência de arraste dos princípios ativos quando o algodão apresentava coloração.
- (19) Agitador magnético.

3.2.3 Metodologia experimental para obtenção dos cocrystal pela técnica GAS

As bombas de alta pressão (6 e 7) foram carregadas com CO_2 proveniente do reservatório de estocagem (1). Duas bombas de alta pressão para manter um fluxo contínuo de CO_2 foram utilizadas, de forma que, quando uma bomba está deslocando CO_2 para a câmara de precipitação, a outra está sendo preenchida novamente pelo fluido e vice-versa.

O deslocamento do fluido do reservatório de estocagem para a câmara interna de cada bomba se dá mantendo as válvulas 2 a 4 abertas. Apesar da pressão de vapor do CO_2 ser alta na temperatura ambiente (64 bar em 25 °C) a simples abertura da válvula do cilindro não é suficiente para deslocar a quantidade necessária de CO_2 para a câmara das bombas. Assim, para liquefazer a maior quantidade de CO_2 possível, a temperatura da camisa da câmara das bombas foi ajustada em 5 °C com o auxílio do banho de recirculação 5 e o reservatório de CO_2 foi deixado aberto por um tempo variando de 30 min a 1 h. Nestas condições, geralmente era

possível armazenar cerca de 500 mL de CO₂ no estado líquido dentro da câmara das bombas.

A montagem da câmara de precipitação foi realizada inserindo cuidadosamente os filtros de retenção, de forma a evitar que durante o experimento houvesse um deslocamento destes e posterior arraste do material precipitado pelo fluxo de saída. Primeiramente, foi colocado o filtro de politetrafluoretileno com maior porosidade servindo de suporte para o filtro membrana que vinha logo a seguir. A tampa da câmara era fechada para posteriormente as outras conexões serem colocadas.

Antes de finalizar, a montagem da câmara, a solução inicial contendo o RES, o coformador e o solvente orgânico foi injetada na câmara de precipitação por meio de uma seringa com um filtro de 0,44 µ conectado, é então efetuada a conexão da linha de entrada de CO₂, do sensor de temperatura, da linha de saída e em seguida a câmara é conectada ao banho termostático previamente aquecido na temperatura do experimento. Após a montagem da câmara o agitador magnético (19) foi ligado e a válvula 10 foi gradualmente aberta para permitir o enchimento da câmara com CO₂ na sua pressão de vapor em temperatura ambiente, mantendo-se ainda toda a linha aberta desde o cilindro de armazenagem até a câmara.

Quando a câmara de precipitação estava preenchida com CO₂ as válvulas 1 a 4 são fechadas e a pressão elevada nas bombas seringa pelo deslocamento do cilindro interno destas, pressurizando toda a linha desde as válvulas 2 e 3 até a válvula 10 na pressão de 200 bar, ou seja, entre as bombas e a câmara de precipitação. Este valor de pressão nas bombas seringa foi estipulado para manter um alto diferencial de pressão entre as bombas e a câmara de precipitação. Este diferencial de pressão tem como objetivo evitar possível refluxo da câmara de precipitação para as linhas podendo causar precipitação do composto utilizado nestas e também para fazer com que o CO₂ entre com alta velocidade na câmara de precipitação intensificando a dispersão do jato de solução durante os experimentos de precipitação (FRANCESCHI et al., 2009).

O fluxo de CO₂ para dentro da câmara foi mantido até a obtenção da pressão experimental desejada. Uma vez que a pressão na câmara atingisse o valor desejado, essa foi mantida durante 10 min a pressão constante sob agitação. Após esse tempo, a válvula 16 é gradualmente aberta em conjunto com a válvula 10, no sentido de ajustar o fluxo de CO₂ na câmara de precipitação, mantendo-se a pressão constante. Neste momento foi possível regular a vazão de CO₂ que foi mantida constante durante todo experimento.

Para controlar a pressão dentro da câmara é realizado o ajuste por meio da válvula 16 e o monitoramento pelo visor do controlador de pressão. Como dependendo da condição experimental o congelamento da válvula 16 é pronunciado, a mesma foi envolta por uma fita de aquecimento ligada ao controlador de temperatura. A temperatura foi mantida em 200 °C para evitar o bloqueio do fluxo neste ponto pelo congelamento da tubulação.

Para efetuar a “secagem” das partículas precipitadas e retirar o solvente residual, o fluxo de CO₂ é mantido constante por aproximadamente 60 min. Depois de proceder a secagem das partículas, o fluxo de CO₂ é interrompido pela válvula 10 que é mantida fechada. Desligava-se a agitação e iniciava-se a despressurização da câmara de precipitação até a pressão atmosférica, por meio da abertura lenta da válvula 16, evitando assim o arraste de partículas. Este procedimento leva em torno de 40 min, mantendo-se a temperatura constante no valor estipulado.

Terminada a despressurização, são desconectadas as linhas da câmara de precipitação e inicia-se o procedimento de abertura da mesma para a retirada do material precipitado. As amostras são então coletadas na parede, no fundo e na tampa da câmara de precipitação, e posteriormente, armazenadas em frasco âmbar e guardados em geladeira a 4 °C.

3.2.4 Metodologia experimental para obtenção dos cocristais pela técnica CSS

No procedimento experimental para o processamento pela técnica CSS, adiciona-se a mesma quantidade RES e NIC usadas anteriormente na técnica GAS, porém, sem solvente orgânico na câmara de precipitação. Após a montagem da câmara, o agitador magnético (19) foi acionado e a válvula 10 foi gradualmente aberta para permitir o enchimento da câmara com CO₂ até atingir a pressão do experimento (90 bar) quando então a válvula 10 foi fechada e o sistema mantido a 45 °C sem vazão de CO₂ durante o tempo determinado para o experimento. Após esse período, desligava-se a agitação e iniciava-se a despressurização da câmara de precipitação até a pressão atmosférica, por meio da abertura lenta da válvula 16.

Terminada a despressurização, iniciava-se o procedimento de abertura da câmara para a retirada do material precipitado. As amostras foram coletadas e armazenadas em frasco âmbar e guardados em geladeira a 4 °C.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS

Os métodos de análise utilizados para avaliar se ocorreu a formação de um cocrystal foram DRXP, FTIR, DSC e FESEM.

3.3.1 Difração de raio X de pó (DRXP)

DRXP é um método confiável para a caracterização da interação entre os dois componentes sólidos mostrando se uma nova fase cristalina é formada ou não (TRASK; JONES, 2005).

Os padrões de difração foram obtidos na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, utilizando um equipamento θ - θ D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), operando em corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV, equipado com detector de cintilação unidimensional LINXEYE. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em porta amostra com cavidade, por meio de varredura angular a 2θ na faixa de 5° a 35° e com passo angular de $0,091^\circ \cdot s^{-1}$.

3.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A comparação de espectros dos compostos puros com os espectros de possíveis cocrystal pode dar indicações se estamos perante um cocrystal ou se o espectro obtido é apenas um espectro soma dos constituintes (VASISHT et al., 2016).

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em temperatura ambiente e usando um equipamento Agilent Technologies (Cary 600 Series FTIR Spectrometer) equipado com ATR (attenuated total reflectance – refletância total atenuada) com cristal de ZnSe, em uma faixa espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

3.3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Neste caso, o uso da calorimetria diferencial de varredura tem como objetivo verificar a obtenção (ou não) de um pico, correspondente

a um ponto de fusão diferente dos pontos de fusão dos compostos iniciais na forma pura. Tal situação poderá indicar a formação de um cocristal, havendo também a possibilidade de formação de uma mistura eutética (VASISHT et al., 2016).

As curvas de DSC foram obtidas em equipamento da Perkin Elmer (Jade-DSC) utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. Ciclos únicos de aquecimento foram realizados na faixa de temperatura de 30 °C a 300 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL·min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C·min⁻¹.

As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

3.3.4 Microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (FESEM)

O tamanho e a morfologia das partículas foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um instrumento JEOL JSM-6701F equipado com uma pistola de emissão de campo (FEG). A distribuição de tamanho das partículas foi determinada a partir de imagens de microscopia eletrônica usando o software MeterSize (versão 1.1). Um número de partículas (até 50) foi observado e o comprimento médio da linha diagonal foi relatado (MIN-SOOK et al., 2010).

3.4 PERFIL DE DISSOLUÇÃO

As análises de determinação do perfil de dissolução foram realizados com base nos trabalhos de Dal Magro et al. (2017) e Zhang et al. (2017). As medidas de concentração foram realizadas utilizando espectroscopia ultravioleta (UV) (800XI FEMTO, BR). Para o resveratrol, uma curva padrão foi produzida por diluições seriadas (ver apêndice B); leituras de absorvância a 325 nm para o resveratrol foram utilizadas para estabelecer uma regressão linear. Os espectros de UV para a nicotinamida não se sobrepõem a 325 nm (ver apêndice A).

A dissolução em pó do cocristal foi realizada de tal forma que um excesso de material sólido foi suspenso em água destilada, em uma solução tampão de fosfato (PBS) pH 6,8, escolhido pela proximidade do pH fisiológico, e em uma solução de HCl 0,1 M, em referência às condições do sistema gástrico (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010).

As corridas foram realizadas individualmente para cada meio e com agitação da solução em um vaso encamisado e ligado a um banho termostático (37 °C), utilizando agitação magnética. Alíquotas foram retiradas em pontos de tempo específicos para derivar um perfil de concentração versus tempo e imediatamente reabastecidos com meio puro para manter o volume original. A solução recolhida foi filtrada através de um filtro com porosidade de 0,45 µm (VertiClean TM PTFE) e diluições apropriadas foram feitas para manter as leituras de absorbância dentro da curva padrão. Todos os experimentos foram repetidos três vezes para avaliar o desvio padrão.

3.4.1 Eficiência de dissolução

Para cada amostra foi calculada a eficiência de dissolução (ED) a partir das curvas de porcentagem dissolvida versus tempo (perfil de dissolução). Esse parâmetro, expresso em %, foi obtido por meio da razão entre a área sob a curva de dissolução entre os tempos 0 e 180 min e a área total do retângulo definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (tempo igual a 180 min), seguindo a equação abaixo (KHAN, 1975):

$$ED = \frac{\int_0^t y dt}{y_{100} \cdot t} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde y é a dissolução cumulativa. Os resultados de eficiência de dissolução foram submetidos à análise estatística para verificar a existência ou não de diferenças significativas, utilizando-se a análise de variância (ANOVA). Para indicar quais perfis seriam significativamente diferentes entre si, empregou-se o teste de TUKEY de comparação. Utilizou-se o software PAST, versão 3.1.

CAPÍTULO 4

4 SCREENING DE COCRISTAIS DO RESVERATROL

A cocristalização representa uma estratégia de modificação de sólidos, visando ao aperfeiçoamento das propriedades físico-químicas de compostos pouco solúveis. Quando comparados com outras formas sólidas, os cocristais proporcionam uma maior diversidade de entidades possíveis de serem produzidas, além de possibilitarem o desenho da estrutura de interesse (LU et al., 2008). Dentre as diversas técnicas de cocristalização, podemos destacar a antissolvente líquido (LAS, do inglês “*liquid antisolvent*”) e a moagem assistida por líquido (LAG, do inglês “*Liquid Assisted Grinding*”), por se tratarem de técnicas com ampla tendência à cocristalização entre moléculas e por proporcionarem rapidez de *screening* (CHILDS et al., 2008).

Um dos pontos mais importantes para o sucesso do desenvolvimento de um cocristal é a identificação de coformadores adequados. Embora várias vias sintéticas tenham sido desenvolvidas, os candidatos coformadores são geralmente identificados usando uma abordagem de tentativa e erro em um grande conjunto de triagem de possíveis candidatos (SHAN; ZAWOROTKO, 2008).

Neste sentido, o presente capítulo apresenta o *screening* e a caracterização no estado sólido com o objetivo de identificar novas fases cristalinas de sistemas multicomponentes de RES. Foram realizados vários experimentos na tentativa de obtenção de cocristais do resveratrol por meio da técnica de líquido antissolvente (LAS) utilizando com vários coformadores selecionados previamente a partir de sua capacidade de formar síntons moleculares com o RES e com os solventes etanol, acetato de etila e acetona, sendo que a maioria não resultou na formação de cocristais. Uma lista completa dos experimentos realizados nessa fase do trabalho pode ser vista no apêndice C. Para facilitar a compreensão e análise, apenas os principais resultados para alguns coformadores serão apresentados e discutidos.

4.1 LÍQUIDO ANTISSOLVENTE (LAS)

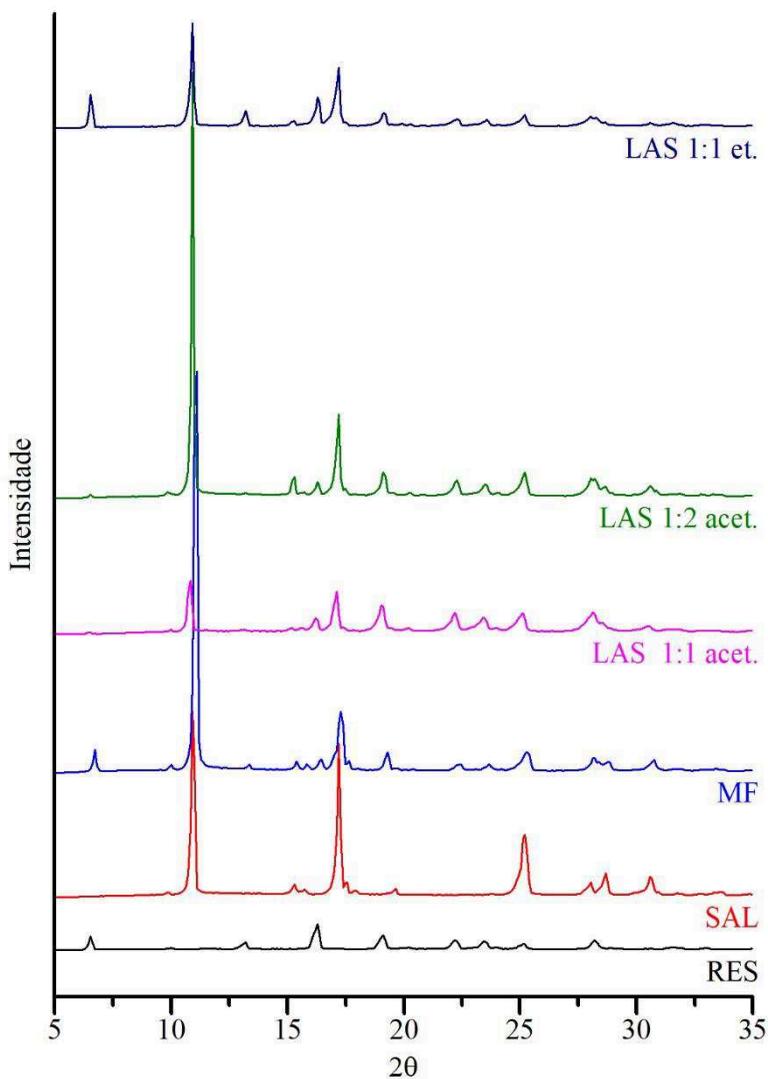
4.1.1 RES-SAL

O ácido salicílico, um composto fenólico amplamente utilizado como medicamento anti-inflamatório e dermatológico e como excipiente em preparações farmacêuticas devido as suas propriedades antioxidantes (ZHOU; CHAN; et al., 2016). Nos experimentos utilizando a técnica LAS com SAL foram utilizados 0,3 g de RES (correspondente a 0,0013 mol) e

diversas quantidades de SAL correspondendo a diferentes razões molares. As amostras preparadas com SAL como coformador resultaram em uma mistura sem formação de cocristal. Na Figura 4.1 é apresentado o difratograma do RES, SAL, mistura física RES-SAL e dos produtos dos experimentos com RES-SAL nas proporções 1:1 e 1:2.

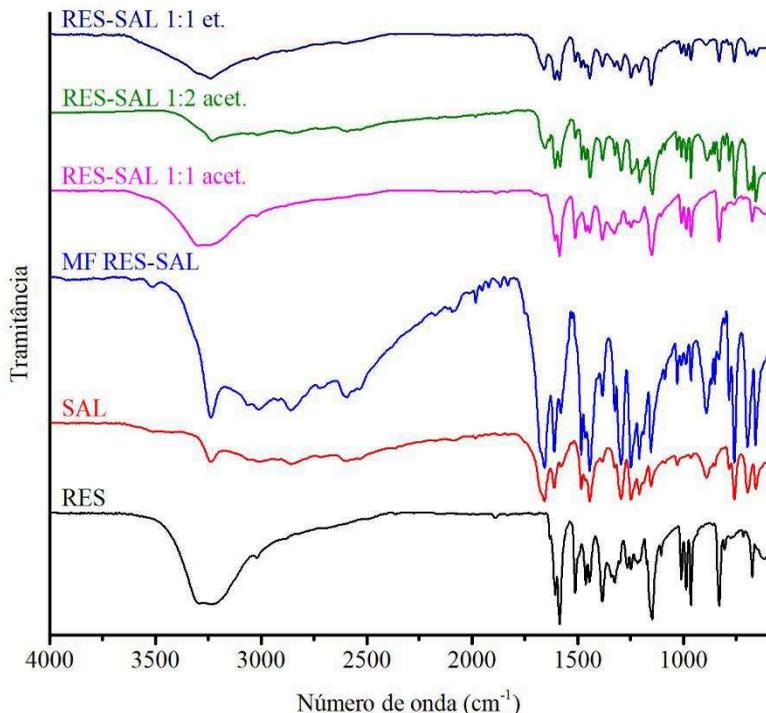
O padrão de difração da mistura física apresenta todas as principais reflexões do RES (6,7; 13,3; 16,3; 19,2; 22,3; 28,2 °2θ) e do SAL (11,1; 15,3; 17,3; 25,3; 28,1; 28,7; 30,7 °2θ), o que corresponde à soma dos difratogramas do RES e do SAL isolados. Os padrões de refração dos produtos obtidos por LAS praticamente se sobrepõem ao da mistura física. No caso do produto obtido no experimento 1:2 com acetona as refrações do SAL, com destaque para 11,1 e 17,3 °2θ, apresentam intensidade maior que nos outros experimentos, evidenciando a maior quantidade de SAL. Visto que as posições dos picos dos produtos dos experimentos coincidem com as posições dos picos do RES puro ou do SAL puro, pode-se, então, afirmar que nenhuma nova figura de difração é formada e, dessa forma, descarta-se a formação de cocristais.

Figura 4.1 – DRXP do RES, SAL, mistura física RES-SAL, LAS 1:1 acetona, LAS 1:2 acetona e LAS 1:1 etanol.



Para confirmar a ilação acima, foram produzidos os espectros de FTIR do RES, SAL, mistura física RES-SAL e dos produtos dos experimentos com RES-SAL e são apresentados na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Espectros de FTIR do RES, SAL, mistura física RES-SAL, LAS 1:1 acetona, LAS 1:2 acetona e LAS 1:1 etanol.

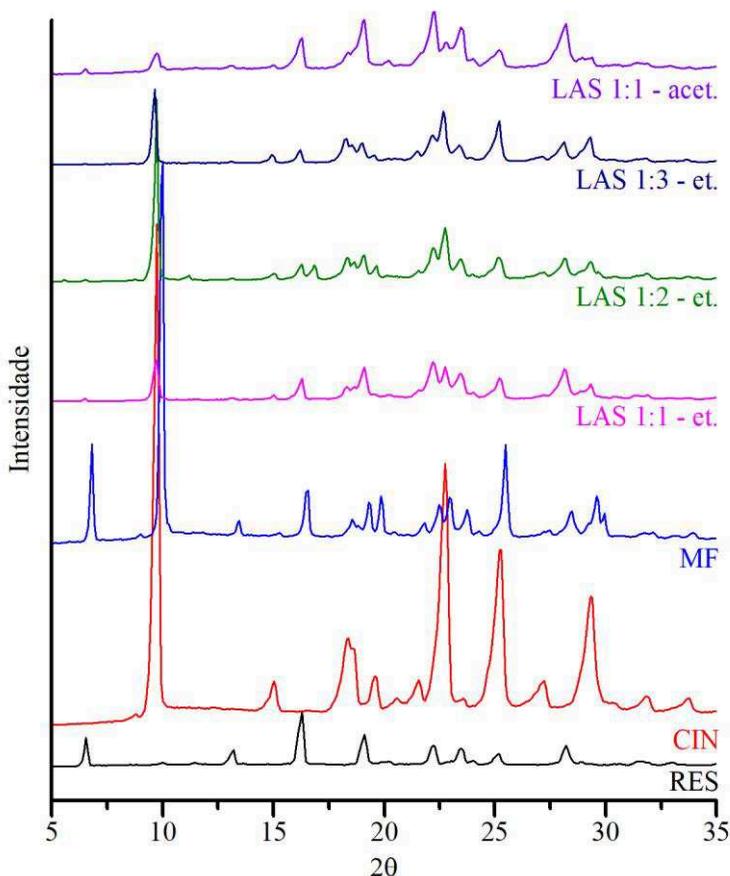


Pela análise da Figura 4.2 é possível verificar que as principais bandas presentes no SAL ocorrem em 1658 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da carbonila (C=O), e em 3292 e 3238 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da hidroxila (O–H) (ZHOU; CHAN; et al., 2016). Nos espectros correspondentes aos produtos dos experimentos a banda correspondente ao estiramento da carbonila não está deslocada em relação ao composto puro, visto que ambas se encontram a 1658 cm^{-1} . Também não foi observada variação nas bandas da hidroxila do RES (3292 e 3238 cm^{-1}). Todas as demais bandas do produto processado também não apresentaram deslocamentos com relação às bandas dos compostos puros. Esses dados confirmam a informação obtida por meio das análises de difração de raios X e deixa claro que nesse caso não ocorreu a formação de cocrystal.

4.1.2 RES-CIN

O ácido cinâmico (CIN) é um coformador comum em estudos de cocristais e geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) e utilizado como ingredientes de sabor pelos fabricantes de aromas e extratos (NUTLEY; FARMER; CALDWELL, 1994). Na Figura 4.3 é apresentado o difratograma do RES, CIN, da mistura física (MF) RES-CIN e dos produtos de experimentos selecionados (RES-CIN 1:1 com etanol, RES-CIN 1:2 com etanol, RES-CIN 1:3 com etanol e RES-CIN 1:1 com acetona..

Figura 4.3 – DRXP do RES, SAL, mistura física (MF) RES-SAL, LAS 1:1 etanol, LAS 1:2 etanol, LAS 1:3 etanol e LAS 1:1 acetona.

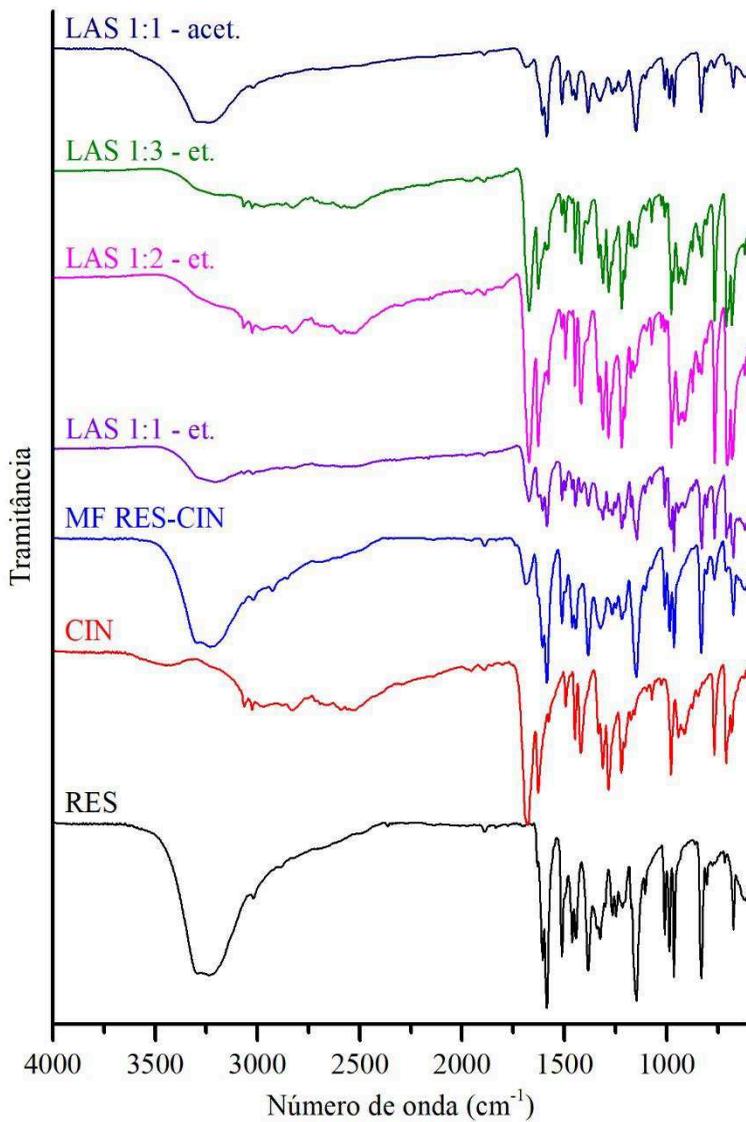


O padrão de difração da mistura física apresenta todas as principais reflexões do RES (6,7; 13,3; 16,3; 19,2; 22,3; 28,2 °2 θ) e do CIN (10,0; 18,3; 19,8; 21,7; 22,9; 25,4; 27,3; 29,5 °2 θ), o que corresponde à soma dos difratogramas do RES e do CIN isolados. Como no caso anterior, os difratogramas correspondentes aos produtos LAS RES-CIN se apresentam como a soma dos difratogramas do RES e CIN puros, não aparecendo nenhuma nova reflexão, o que sugere se tratar de misturas físicas. Nota-se que mesmo nos experimentos com maior proporção de CIN não ocorre aumento pronunciado das reflexões correspondentes a esse componente, o que mostra que a precipitação do CIN não ocorreu completamente.

Na Figura 4.4 são apresentados os espectros de FTIR do RES, CIN, da mistura física (MF) RES-CIN e dos produtos de experimentos selecionados com RES-CIN.

A comparação dos espectros de FTIR dos compostos puros, RES e CIN, com os dos produtos obtidos por meio de LAS permite concluir que não há qualquer deslocamento nas bandas observadas, a principal banda a ser observada 1681 cm⁻¹, correspondente ao estiramento da carbonila (SHAYANFAR; ASADPOUR-ZEYNALI; JOUYBAN, 2013), não foi deslocada em nenhum dos produtos obtidos, sendo que, no produto LAS 1:1 obtido com acetona ela aparece muito reduzida, além disso, o espectro produzido nesse caso sobrepõe praticamente com o do RES, confirmado as informações obtidas por DRXP de que ocorreu pouca precipitação do CIN.

Figura 4.4 – Espectros de FTIR do RES, SAL, mistura física (MF) RES-SAL, LAS 1:1 etanol, LAS 1:2 etanol, LAS 1:3 etanol e LAS 1:1 acetona.

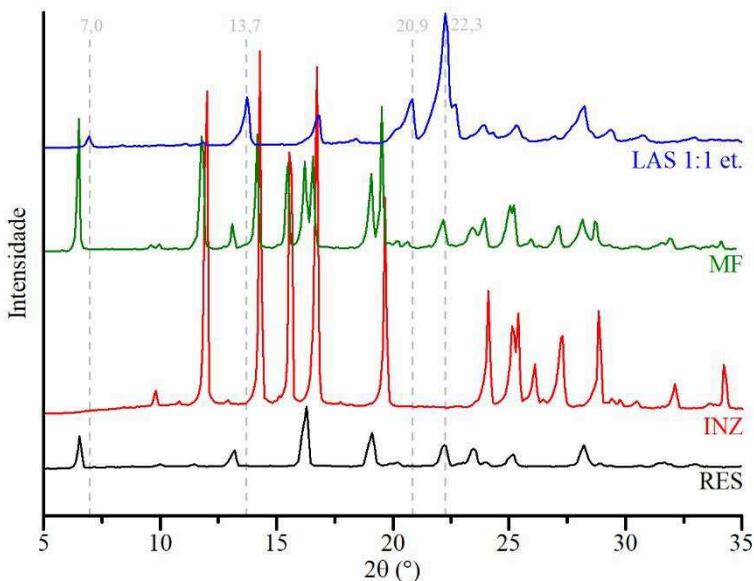


4.1.3 RES-INZ

A INZ é um antibiótico utilizada tanto no tratamento profilático quanto na doença ativa da tuberculose (LALANDE et al., 2016). A INZ foi utilizada nesse estudo por já ter relatado um cocrystal com RES (ZHOU; LI; et al., 2016). Nesse caso, foi realizado apenas experimento utilizando 0,3 g de RES e 0,178 g de INZ (proporção 1:1 em mol) com os solventes acetona e etanol obtendo sucesso apenas com etanol. Uma tentativa com o solvente acetado de etila foi realizada, porém, não foi possível dissolver a isoniazida.

Os padrões de DXRP para o RES, INZ, da mistura física de RES-INZ e do produto obtido por LAS de RES-INZ são mostrados na Figura 4.5. O resveratrol apresenta reflexões bem definidas em: 6,5; 13,2; 16,3; 19,1; 22,2; 23,5; 25,2 e 28,2 $^{\circ}2\theta$, em concordância com outros trabalhos reportados na literatura (CHADHA et al., 2016; DAL MAGRO et al., 2017).

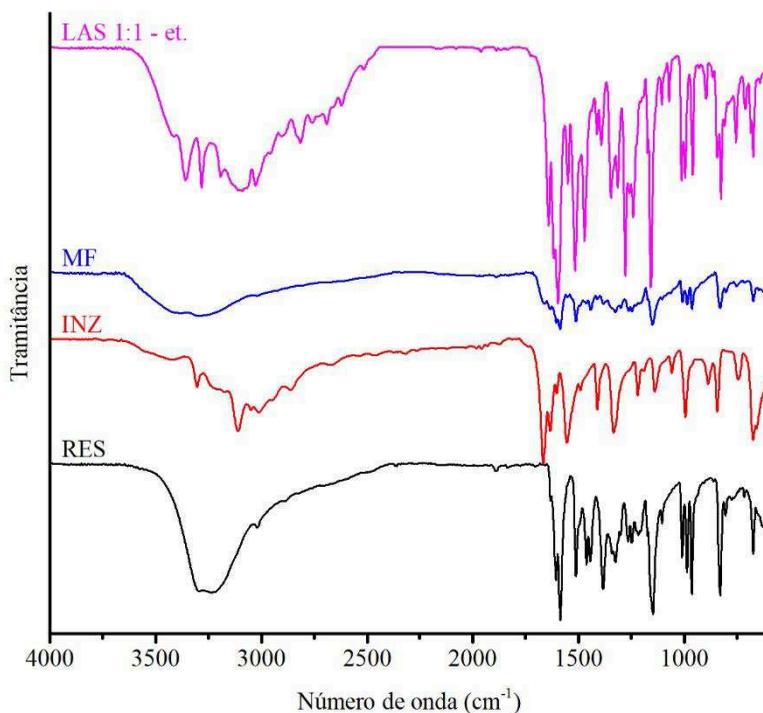
Figura 4.5 – DRXP do resveratrol (RES), da isoniazida (INZ), das mistura física RES-INZ (MF) e do produto obtido por LAS na proporção 1:1 utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.).



A isoniazida apresenta reflexões em 12,0; 14,2; 15,6; 16,7; 19,6; 23,9 e 27,3 °2θ, também de acordo com a literatura (SWAPNA; MADDILETI; NANGIA, 2014). A mistura física apresenta reflexões de cada um dos componentes puros. Entretanto, o produto do processamento RES-INZ-LAS apresentou reflexões em 7,0; 13,7; 20,9 e 22,3 °2θ não coincidentes com as reflexões dos compostos puros, além do desaparecimento de várias reflexões, indicando a formação de uma nova fase cristalina. Esses valores estão bem próximos dos valores reportados para o cocrystal de RES-NIC produzido por Zhou et al. (2016) utilizando a técnica de moagem assistida por líquido.

A Figura 4.6 apresenta o espectro de FTIR para o RES, INZ e para o cocrystal RES-INZ produzido por LAS.

Figura 4.6 – FTIR do resveratrol (RES), da isoniazida (INZ), das mistura física RES-INZ (MF) e do produto obtido por LAS na proporção 1:1 utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.).



O espectro do RES está de acordo com os dados publicados sobre o mesmo composto. As principais absorções correspondem ao estiramento da ligação O—H como uma absorção larga em 3292 e 3234 cm^{-1} , estiramento da ligação C=C aromático em 1606 cm^{-1} , estiramento da ligação C=C olefínica em 1585 cm^{-1} e estiramento da ligação C—C em 1382 cm^{-1} . A absorção em 964 cm^{-1} é característica da forma trans (AGUIAR et al., 2016; BERTACCHE et al., 2006; BILLES et al., 2007). A isoniazida apresenta absorções em 3304, 3172 e 3110 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação N—H, 1666 cm^{-1} correspondente ao estiramento da carbonila (C=O). Esses dados são concordantes com a literatura (MASHHADI et al., 2014).

A Tabela 4.1 resume as absorções vibracionais mais relevantes que envolvem grupos funcionais com potencial para formar ligações de hidrogênio entre RES e INZ. O produto RES-INZ resultante do processamento por GAS apresenta várias alterações no espectro de FTIR em comparação com o registrado para os compostos de partida RES e NIC. Entre elas podemos destacar o deslocamento da absorção do estiramento da ligação O—H para 3417 e 3359 no cocrystal, o deslocamento da absorção do estiramento da ligação N—H para 3282 e 3192, do estiramento da carbonila para 1641 e do estiramento do C=N do anel aromático para 1550. Deslocamentos semelhantes para o mesmo cocrystal foram observados por Zhou et al. (2016). Os resultados do FTIR confirmam a formação de novas interações entre as moléculas do RES e da INZ.

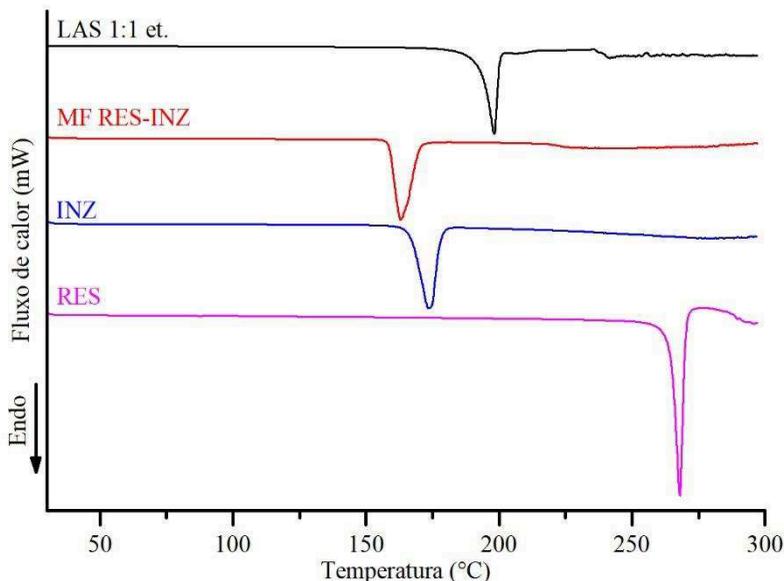
Tabela 4.1 – Dados relevantes dos espectros de FTIR do resveratrol, isoniazida e do cocrystal formado.

Vibração	Resveratrol (cm^{-1})	Isoniazida (cm^{-1})	Cocrystal (cm^{-1})
Estiramento do O—H	3294 e 3234	-	3417 e 3359
Estiramento do N—H	-	3304, 3172 e 3110	3282 e 3192
Estiramento C=O	-	1666	1641
Estiramento C=N aromático	-	1554	1550

A fim de confirmar a formação do cocrystal, foi realizada a análise de DSC do RES, INZ, mistura física RES-INZ e do produto RES-INZ-LAS. Na Figura 4.7 são apresentados os termogramas. O RES apresenta um único e característico evento endotérmico em 268,0 °C ($\Delta H = 276,2$

$\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$), correspondente ao seu ponto de fusão, enquanto a INZ exibe seu ponto de fusão em $173,5\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 207,6\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$).

Figura 4.7 – DSC do RES, INZ, mistura física (MF) RES-INZ e LAS 1:1 etanol.



A mistura física RES-INZ apresenta um único evento endotérmico a $163,2\text{ }^\circ\text{C}$, que pode ser atribuído a fusão de um eutético. As fusões de eutéticos ocorrem em temperaturas mais baixas que os pontos de fusão dos componentes puros (MOHAMMAD; ALHALAWEH; VELAGA, 2011). No que se refere ao comportamento termoanalítico do produto do processamento do RES-INZ, foi possível observar, por meio das curvas DSC, que a amostra apresentou um evento endotérmico correspondente ao seu ponto de fusão em $196,6\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 197,0\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) localizado entre os eventos de fusão do RES e da INZ e bem diferente do evento apresentado pela mistura física, confirmando que uma nova fase foi formada entre RES e INZ. Estes dados são correspondentes aos encontrados na literatura para o cocrystal de RES-INZ (ZHOU; LI; et al., 2016) e, em conjunto com os resultados obtidos por DRXP e FTIR, confirmam a identidade da amostra como cocrystal RES-INZ.

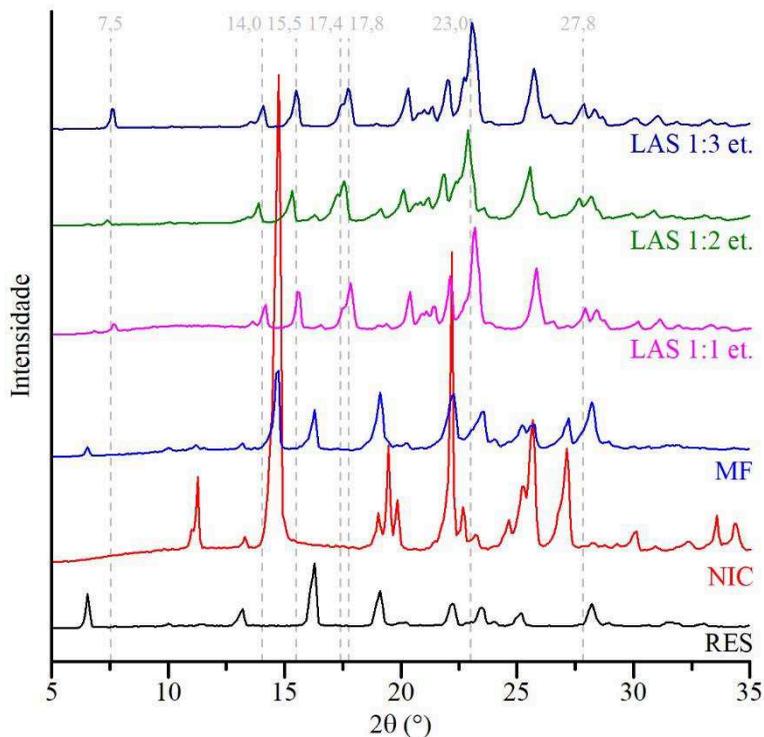
4.1.4 RES-NIC

A nicotinamida é um membro da família da vitamina B que pode ser encontrada, tanto em forma livre como ligada, em plantas e tecidos animais (WOHLRAB; KREFT, 2014). É um coformador largamente utilizado na produção de cocristais pois é classificada como substância segura pelo FDA e possui grupos funcionais eficazes para formar ligações de hidrogênio (BERRY et al., 2008; BEVILL et al., 2014; CUADRA et al., 2016; ERRIGUIBLE et al., 2015; ERVASTI; AALTONEN; KETOLAINEN, 2015; FÁBIÁN et al., 2011; NEUROHR et al., 2016; NEUROHR et al., 2013; SHIKHAR et al., 2011; VASISHT et al., 2016).

Experimentos foram realizados utilizando 0,3 g (equivalente a 0,0013 mol) de RES dissolvidos junto com NIC em diversas proporções molares nos solventes acetato de etila, acetona e etanol. Com acetato de etila ocorreu a precipitação de um dos componentes majoritariamente, com acetona foi possível produzir unicamente quando os componentes eram dissolvidos na proporção 1:1 na solução inicial e com o etanol foi possível produzir quando os componentes eram dissolvidos proporção 1:1, 1:2 e 1:3 na solução inicial, porém, quando quantificado o produto, os cocristais formados apresentavam sempre proporção 1:1. Um experimento foi realizado dissolvendo os componentes na proporção 1:4 em etanol, no entanto, produziu apenas a mistura física.

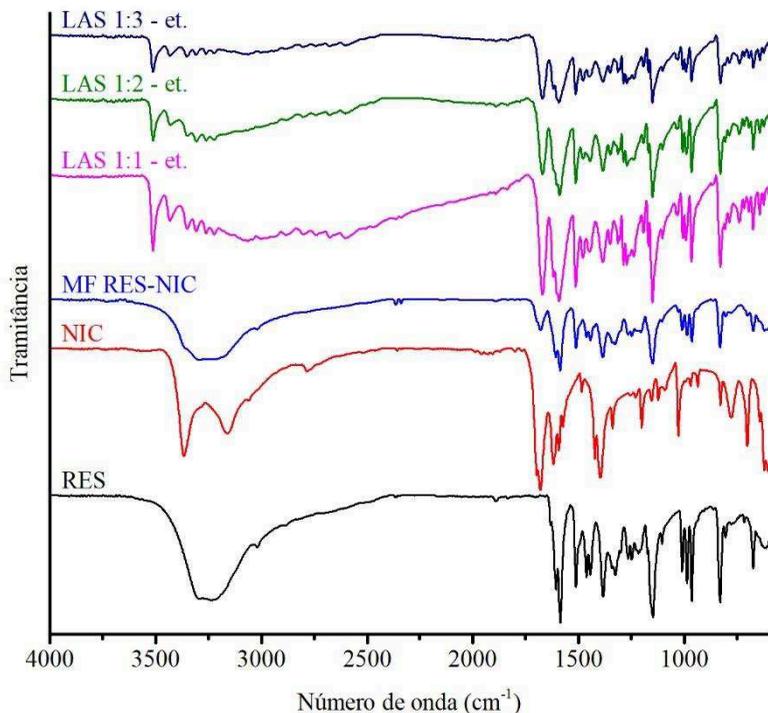
Na Figura 4.8 são apresentados os padrões de DXRP para o RES, NIC, da mistura física de RES-NIC e dos produtos obtidos do processamento por LAS de RES-NIC que produziram cocristais. Para a nicotinamida as principais reflexões ocorrem em: 11,3; 13,3; 14,7; 19,0; 19,5; 19,9; 22,2; 22,7; 24,6; 25,3; 25,7 e 27,1 °2θ. O padrão de difração apresentado é concordante com os dados encontrados na literatura (PATIL; UJALAMBKAR; MAHADIK, 2017). O difratograma da mistura física corresponde a soma dos difratogramas do RES e da NIC, por outro lado, a comparação dos difratogramas dos produtos RES-NIC-LAS mostra a presença de novas reflexões no padrão do cocristal em 7,5; 14,0; 15,5; 17,4; 17,8; 23,0 e 27,8 °2θ. Isto é um forte indício de formação de uma nova fase sólida. Além disso, esses valores estão de acordo com os relatados por He et al. (2017) para o cocristal RES-NIC produzido por evaporação de uma mistura de solventes orgânicos.

Figura 4.8 – Difratomogramas comparando as amostras obtidas por LAS com os materiais de partida RES e NIC e com a mistura física do RES e NIC.



Para confirmar se ocorreu interação entre os componentes foram obtidos os espectros de FTIR dos RES, NIC, mistura física e dos produtos obtidos por LAS que são mostrados na Figura 4.9. O espectro da NIC apresenta as principais absorções em 3363 e 3159 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo NH_2 e 1698 e 1680 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ que estão de acordo com dados publicados sobre esse composto (BAKILER; BOLUKBASI; YILMAZ, 2007; PATIL et al., 2017; RAMALINGAM et al., 2010).

Figura 4.9 – Espectros de FTIR do RES, NIC, mistura física RES-NIC e dos produtos obtidos por LAS.



Na mistura física encontram-se as bandas do RES e da NIC sem nenhum deslocamento no número de onda, entretanto, o processamento do RES com a NIC por meio do LAS resultou em alterações no espectro de FTIR em comparação com o registrado para o RES e NIC puros. Os três produtos apresentam o mesmo perfil de FTIR com as bandas 3159 e 3363 cm^{-1} da nicotinamida sendo deslocadas para 3222 e 3511 cm^{-1} , respectivamente, e com o surgimento de bandas adicionais em 3262, 3307, 3351 e 3432 cm^{-1} . Na região da carbonila é possível perceber o deslocamento da banda correspondente ao estiramento da carbonila de 1680 cm^{-1} na NIC para 1670 cm^{-1} nos produtos obtidos por LAS. As bandas adicionais já mencionadas para o cocrystal na região de 3432 a 3262 cm^{-1} podem ser atribuídas a novas interações das hidroxilas do RES. Um resumo dos principais deslocamentos ocorridos estão apresentados na Tabela 4.2. Alterações semelhantes no espectro de FTIR da nicotinamida foram anteriormente referidas e foram tomadas como uma

indicação para a formação de cocristais (CUADRA et al., 2016; PATIL et al., 2017; WANG et al., 2013).

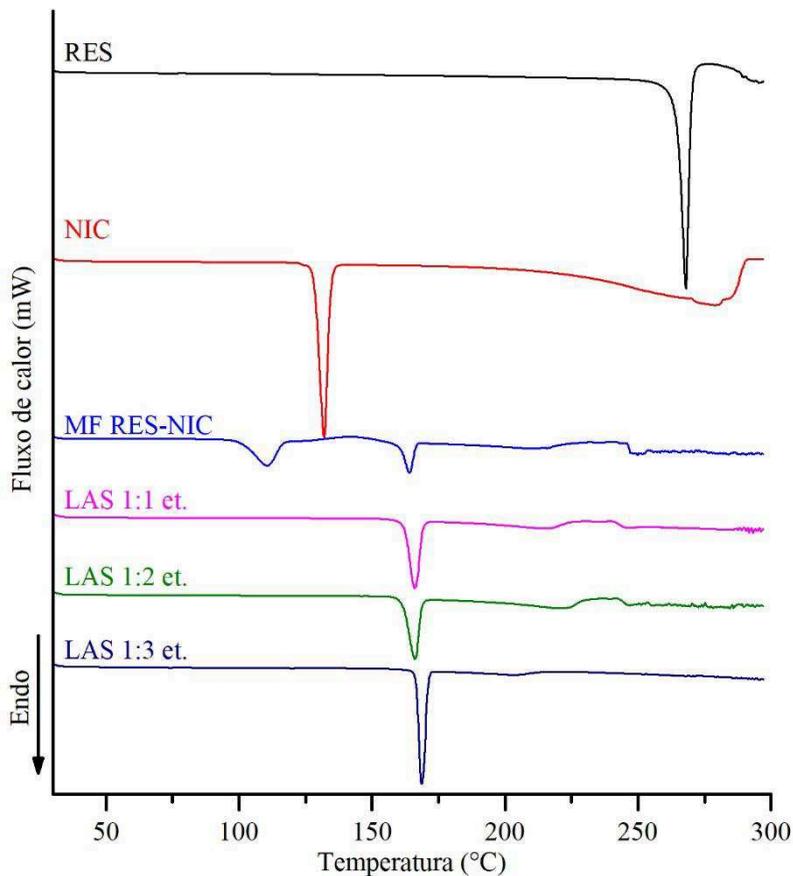
Tabela 4.2 – Dados dos espectros de FTIR do resveratrol, nicotinamida e do cocristal formado.

Vibração	Resveratrol (cm ⁻¹)	Nicotinamida (cm ⁻¹)	Cocristal (cm ⁻¹)
Estiramento do O—H	3234	-	3260
Estiramento simétrico assimétrico do NH ₂	-	3363 e 3159	3511 e 3222
Estiramento C=O	-	1698 e 1680	1670

O comportamento térmico dos componentes puros, da mistura física e dos produtos obtidos por LAS foi realizado por DSC e as curvas resultantes são apresentadas na Figura 4.10. O resveratrol apresenta um único característico evento endotérmico em 268,0 °C ($\Delta H = 276,2 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), correspondente ao seu ponto de fusão, enquanto a nicotinamida exibe seu ponto de fusão em 131,9 °C ($\Delta H = 197,7 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), ambos estão de acordo com a literatura (HINO; FORD; POWELL, 2001; ZHOU; LI; et al., 2016). A análise DSC da mistura física de RES e NIC mostrou 2 eventos endotérmicos e 1 evento exotérmico. O primeiro evento endotérmico (110,5 °C), corresponde provavelmente a fusão de um eutético, que é seguido por um largo evento exotérmico (142,3 °C) que corresponde a formação do cocristal e logo em seguida um segundo evento endotérmico (164,1 °C) correspondente à fusão do cocristal. A formação de cocristais "*in situ*" durante DSC foi relatada em vários estudos (LU et al., 2008; PAL et al., 2014; WU et al., 2011).

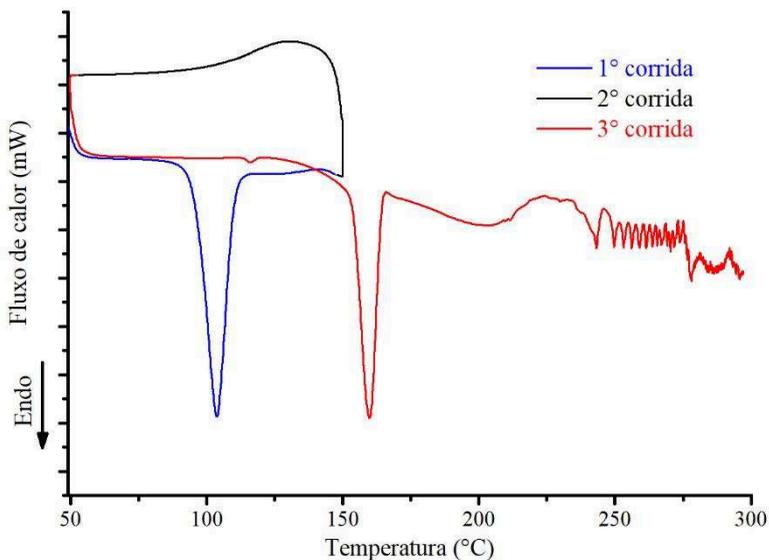
Os produtos obtidos por LAS exibem um único ponto de fusão endotérmico a 166,1 °C ($\Delta H = 87,5 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) para o produtos solubilizado na proporção 1:1, 166,0 °C ($\Delta H = 81,4 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) para o LAS 1:2 e 168,8 °C ($\Delta H = 96,0 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) para o produto LAS 1:3. Nos três casos, um ponto de fusão distinto entre os componentes individuais, indica sua interação para produzir nova fase de cocristal. Além disso, nenhum evento é registrado antes da fusão, indicando que o cocristal já está formado no início da análise térmica. Esses valores estão próximos daqueles relatados por He et al. (2017) para o cocristal RES-INZ.

Figura 4.10 – Termogramas de DSC do RES, NIC e cocristal RES-NIC.



Para confirmar esse comportamento apresentado pela mistura física, um experimento de DSC com três etapas em sequência foi idealizado: (1^o) aquecimento da mistura física de RES e NIC de 50 a 150 °C; (2^o) resfriamento a 50 °C e (3^o) novo aquecimento a 300 °C. O resultado pode ser visto na Figura 4.11.

Figura 4.11 – DSC da mistura física RES-NIC realizado em três etapas.



Durante a primeira etapa é visto um evento endotérmico a 103,7 °C, na segunda etapa aparece um evento exotérmico largo associado a solidificação de material e por último na terceira etapa temos um pequeno evento endotérmico em 116 °C, indicando a presença de um pouco de material não cocrystalizado e um evento em 159,8 °C correspondente a fusão do cocrystal. A formação de cocrystalis “*in situ*” durante o DSC tem sido reportada em vários estudos (LU et al., 2008; PAL et al., 2014; WU et al., 2011).

Juntas, as informações obtidas a partir da análise dos dados do DRXP, FTIR e DSC indicam a formação de um cocrystal na proporção 1:1 nos três experimentos LAS. No capítulo 5 será feita a análise das micrografias obtidas por FESEM em comparação com o produto obtido pela técnica GAS.

4.2 CONCLUSÃO

Nesse capítulo foi comprovada a viabilidade da utilização da técnica LAS para *screening* de cocristais. A precipitação de cocristais do RES com a NIC e com a INZ na proporção molar 1:1 e etanol como solvente para ambos foram realizadas com sucesso. A formação dos cocristais RES-INZ e RES-NIC foram confirmados pela presença de reflexões características de acordo com literatura prévia (HE et al., 2017; ZHOU; LI; et al., 2016). Os coformadores bem-sucedidos na formação do cocrystal foram selecionados para serem utilizados para produção de cocristais do RES em meio supercrítico. Ambos apresentam o grupo funcional amino presente.

CAPÍTULO 5

5 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS DO RESVERATROL EM MEIO SUPERCRÍTICO

O dióxido de carbono supercrítico foi utilizado como meio alternativo para reações de cristalização, atuando como solvente ou como antissolvente. A utilização de CO₂ como antissolvente é baseada em seu poder solvente relativamente baixo para solutos como polímeros ou produtos farmacêuticos e sua boa miscibilidade com muitos solventes orgânicos (CUADRA et al., 2016).

A partir dos resultados obtidos no capítulo anterior, foram selecionados os coformadores INZ e NIC para os experimentos realizados em meio supercrítico. Os experimentos foram realizados na proporção 1:1 e utilizando as técnicas de antissolvente gasoso (GAS) e cristalização com solvente supercrítico (CSS). Os cocristais de RES produzidos por cada método foram caracterizados por difração de raios X de pó (DRXP), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM) e comparados com os resultados obtidos por LAS.

5.1 ANTISSOLVENTE GASOSO (GAS)

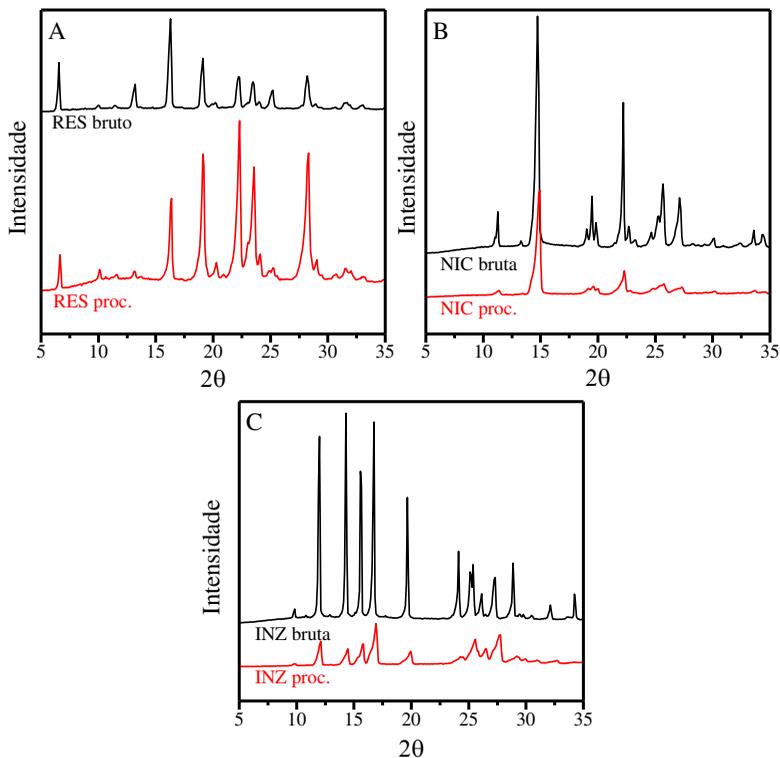
Inicialmente, para determinar como a técnica GAS pode afetar a cristalinidade dos componentes puros, estes foram processados sob as mesmas condições utilizadas para produção dos cocristais (90 bar, 45 °C e vazão de CO₂ de 10 g·min⁻¹). Em seguida, misturas de RES-INZ e RES-NIC foram processadas para avaliar a produção de cocristais.

5.1.1 Processamento dos compostos puros

Para determinar como a recristalização por GAS pode afetar a morfologia e cristalinidade dos componentes puros, cada um dos componentes puros foi recristalizado por dissolução em etanol e sob as mesmas condições usadas para cocristalização. Os padrões de DRX para o RES, INZ e NIC brutos e processados são apresentados na Figura 5.1a-c. Os espectros de DRX dos componentes processados foram superponíveis com seus componentes respectivos brutos, confirmando a preservação da rede cristalina, no entanto, houve uma perda de cristalinidade na nicotinamida e isoniazida processadas, como indicado por uma diminuição nas intensidades nas reflexões em comparação com o material bruto. Perda da cristalinidade durante o processamento de GAS

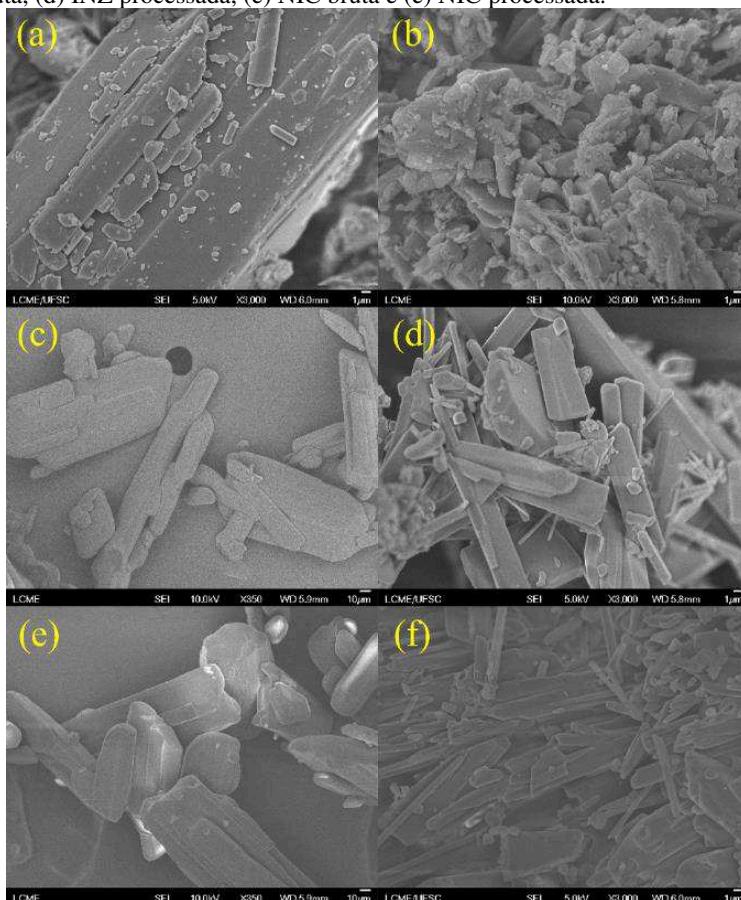
foi documentada anteriormente na literatura e é atribuída a rápida nucleação de partículas impedindo a reorganização das moléculas para a forma cristalina (BARRETT; DEGHANI; FOSTER, 2008; OBER et al., 2013).

Figura 5.1 – Difratomogramas do (A) RES bruto e processado, (B) NIC bruta e processada, e (C) INZ bruta e processada.



Imagens FESEM do RES, INZ e NIC brutos e processados são apresentados na Figura 5.2a-f.

Figura 5.2 – Imagens FESEM do (a) RES bruto, (b) RES processado, (c) INZ bruta, (d) INZ processada, (e) NIC bruta e (f) NIC processada.



O RES bruto (Figura 5.2a) apresentou forma de coluna com tamanho médio de $31,1 \mu\text{m}$ enquanto que no RES processado (Figura 5.2b) é possível ver uma distribuição heterogênea de tamanho de partícula e forma aleatória. A INZ bruta (Figura 5.2c) também apresentou forma colunar com tamanho médio acima de $100 \mu\text{m}$, ao passo que a INZ processada (Figura 5.2d) apresentou mesma forma, porém, com tamanho variando de 2 a $25 \mu\text{m}$. Já a NIC bruta (Figura 5.2e) se apresentou como blocos irregulares com tamanho médio acima dos $100 \mu\text{m}$ enquanto a NIC processada (Figura 5.2f) apresentou partículas com forma de coluna com tamanho médio de $10,9 \mu\text{m}$. Os valores correspondentes ao tamanho das

partículas antes e após processamento por GAS se encontram resumidos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Tamanho das partículas de RES, INZ e NIC antes e após o processamento por GAS.

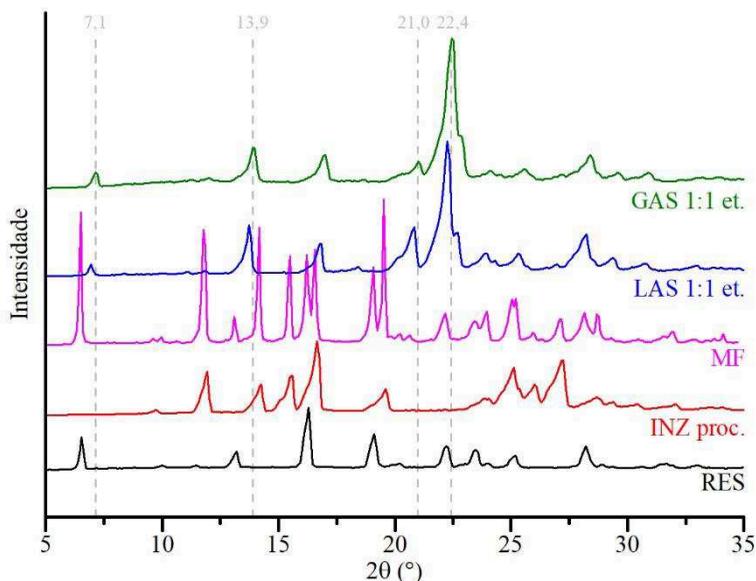
Composto	Tamanho de partícula (μm)	
	Antes do processamento por GAS	Após do processamento por GAS
RES	$31,1 \pm 17,7$	$17,2 \pm 13,2$
INZ	$> 100 \mu\text{m}$	$9,4 \pm 5,6$
NIC	$> 100 \mu\text{m}$	$10,9 \pm 6,7$

5.1.2 RES-INZ

Para avaliar a possibilidade de produção de cocristais utilizando a técnica GAS, 0,3 g de RES (0,0013 mol) e 0,178 g de INZ (0,0013 mol) foram dissolvidos em 20 mL de etanol utilizando agitação magnética. A solução formada injetada no sistema utilizando uma seringa com filtro de $0,44 \mu\text{m}$ conectado e depois seguidos os procedimentos relatados no item 3.2.3 utilizando uma vazão de CO_2 de $10 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ sob pressão de 90 bar e temperatura de 45°C .

Os padrões DRXP para o RES processado, INZ processada, mistura física RES-INZ e RES-INZ (GAS) são mostrados na Figura 5.3. Como já destacado no item 4.1.3, RES exibiu reflexões características nos valores de 6,5; 13,2; 16,3; 19,1; 22,2; 23,5; 25,2 e $28,2^\circ 2\theta$, enquanto a INZ processada exibiu reflexões características a valores de 12,0; 14,2; 15,6; 16,7; 19,6; 25,1 e $27,3^\circ 2\theta$. O difratograma de RES-INZ (GAS) foi distinguível dos compostos individuais e exibiu reflexões a valores de 7,1, 13,9, 21,0 e $22,4^\circ 2\theta$. Essas reflexões apresentam valores muito próximos aos apresentados pelo RES-INZ (LAS), além disso, a análise da Figura 5.3 mostra que seus difratogramas praticamente se sobrepõem indicando que ambos possuem a mesma rede cristalina.

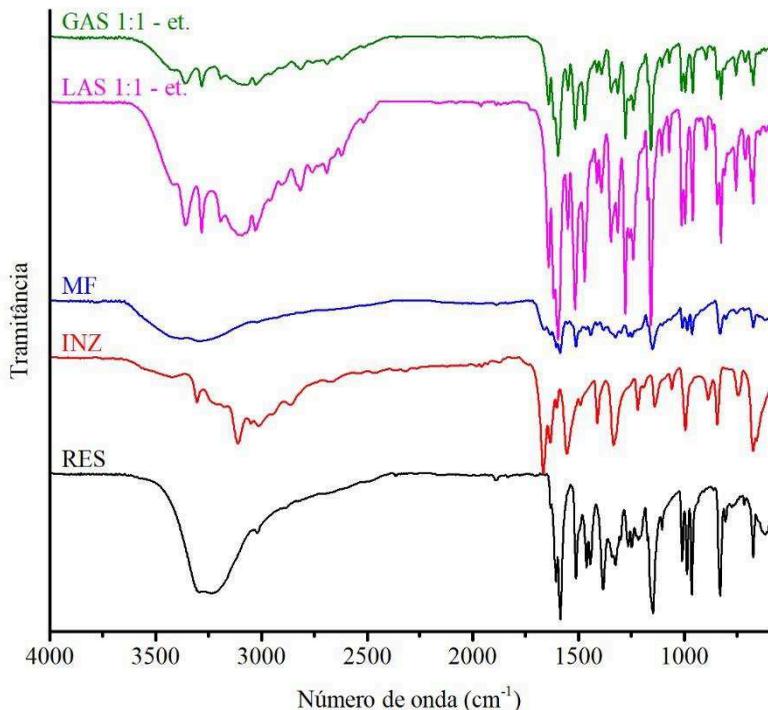
Figura 5.3 – Difratogramas do RES, INZ processada (INZ proc.), mistura física RES-INZ (MF), RES-INZ obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-INZ obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).



O grau de cristalinidade dos cocristais, como indicado pela intensidade da reflexão, foi ligeiramente menor para os cocristais produzidos usando CO_2 em comparação com os produzidos por antissolvente líquido. Acredita-se que a maior difusividade do CO_2 pressurizado, em comparação com o n-hexano, promova uma rápida transferência de massa entre o solvente e as fases antissolventes, o que facilita a cocrystalização, mas inibe a organização da rede cristalina.

A espectroscopia no infravermelho foi conduzida para examinar a natureza de quaisquer interações entre o RES e a INZ nos cocristais. Os espectros de FTIR para RES, INZ, uma mistura física de razão molar de 1: 1 dos dois, e os cocristais de RES-INZ formados por cocrystalização por líquido antissolvente e GAS são mostrados na Figura 5.4. As bandas do RES e INZ ocorreram em correspondência com a literatura conforme descrito no item 4.1.3 (pagina 96).

Figura 5.4 – FTIR do RES, INZ processada (INZ proc.), mistura física RES-INZ (MF), RES-INZ obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-INZ obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).

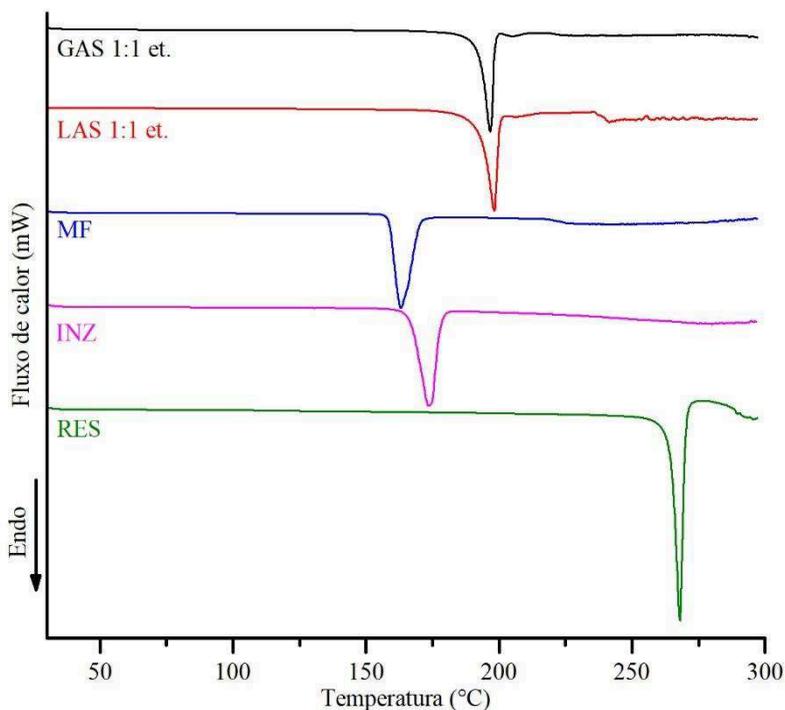


As bandas de estiramento do O-H do RES foram deslocadas de 3294 e 3234 cm^{-1} para 3417 e 3359 no cocristal, as bandas correspondentes ao estiramento da ligação N-H foram deslocados de 3304, 3172 e 3110 cm^{-1} para 3282 e 3192 cm^{-1} . A banda de estiramento da carbonila que ocorreu em 1666 cm^{-1} para a NIC pura, foi deslocada para 1641 cm^{-1} no cocristal. O estiramento da ligação C=N foi deslocada de 1554 cm^{-1} para 1550 cm^{-1} .

Todos os deslocamentos acima ocorreram de forma semelhante no cocristal formado por LAS, como pode ser visto na Tabela 4.1, ainda mais, se analisarmos os espectros dos cocristais obtidos por LAS e por GAS na figura acima percebemos que os mesmos praticamente se sobrepõem, confirmando a existências das mesmas interações nos dois.

Na Figura 5.5 são apresentados os termogramas do RES, INZ processada, mistura física RES-INZ, RES-INZ obtido por LAS utilizando etanol como solvente e RES-INZ obtido por GAS utilizando etanol como solvente.

Figura 5.5 – Curvas de DSC do RES, INZ processada (INZ proc.), mistura física RES-INZ (MF), RES-INZ obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-INZ obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).



Com relação ao comportamento térmico do produto do processamento do RES-INZ por GAS, foi possível observar, por meio das curvas de DSC, que a amostra teve um evento endotérmico com ponto de fusão de 196,6 °C ($\Delta H = 129,1 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) localizado entre os pontos de fusão RES e INZ, resultados semelhantes foram obtidos no que diz respeito à técnica antissolvente líquido. Existe na literatura vários casos reportando a formação de cocrystalos com menor entalpia de fusão por processos de

precipitação utilizando CO₂ supercrítico em consequência da sua natureza policristalina e imperfeições da superfície na rede cristalina (OBER et al., 2013; PADRELA et al., 2009). A velocidade com que ocorre a precipitação durante a pressurização no processo de GAS limita a extensão da cocristalização e impede a formação de uma rede perfeita no cocristal.

Quanto menor a entalpia de fusão, mais fácil é para os cristais se transformarem em líquido. Da mesma forma, durante a dissolução, uma menor entalpia de fusão pode promover a dissociação do cocristal e permitir a interação dos componentes com o meio de dissolução, aumentando assim a liberação do princípio ativo.

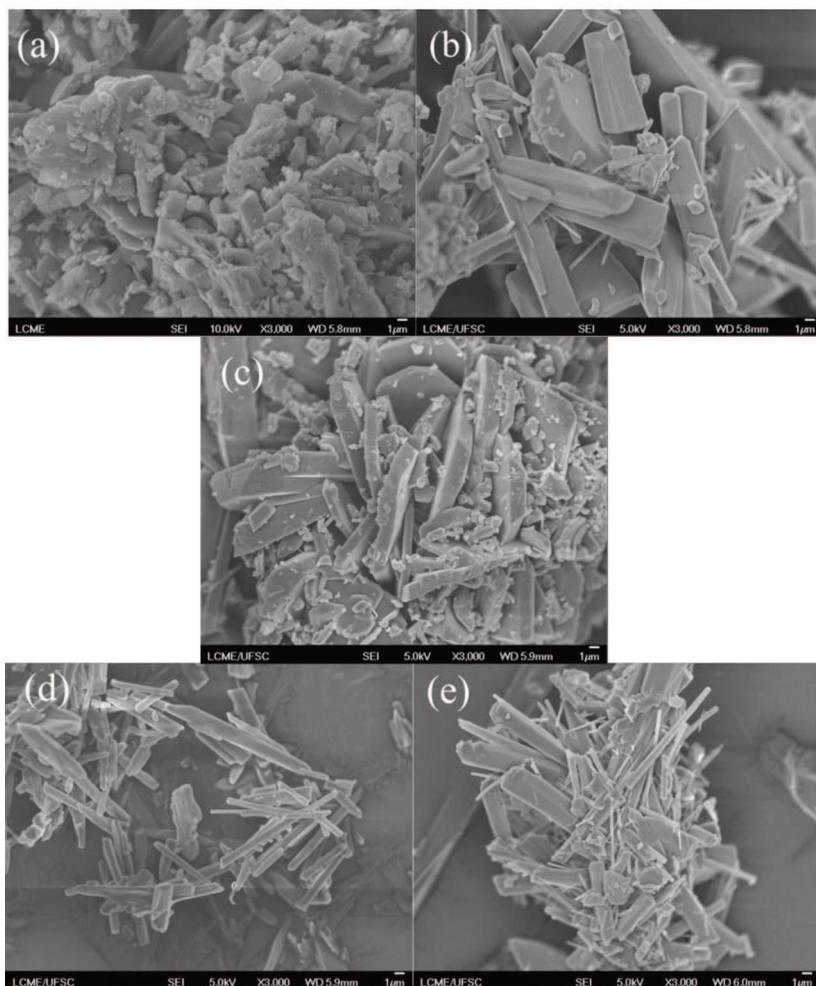
A Figura 5.6 mostra as micrografias FESEM do RES (após o processamento GAS), INZ (após o processamento GAS), a mistura física RES-INZ, RES-INZ (LAS) e RES-INZ (GAS) e os dados relativos ao tamanho das partículas podem ser vistos na Tabela 5.2. Na imagem de FESEM do RES (Figura 5.6a) é possível observar uma distribuição heterogênea de tamanho de partícula e forma aleatória. A INZ (Figura 5.6b) exibiu uma forma de coluna com o tamanho variando entre de 2-25 µm. A imagem FESEM da mistura física (Figura 5.6c) mostra as características dos dois componentes puros. Por outro lado, a análise das micrografias FESEM mostrou que a morfologia dos cocristais RES-INZ é diferente dos componentes individuais. De fato, tanto o cocristal RES-INZ obtido por LAS (Figura 5.6d) quanto o obtido por GAS (Figura 5.6e) foram compostos por uma morfologia fina semelhante a uma agulha, embora o RES-NIC (GAS) apresentasse maior tamanho de partícula.

Tabela 5.2 – Dados de tamanho de partícula para RES, INZ e cocristais RES-INZ (LAS e GAS).

Amostra	Tamanho de partícula (média da linha diagonal em µm)	Coefficiente de variação (%)
RES	17,2 ± 13,2	77,7
INZ	9,4 ± 5,6	59,6
RES-INZ (LAS)	6,2 ± 3,5	56,4
RES-INZ (GAS)	33,2 ± 21,3	64,2

Tamanho determinado a partir de imagens FESEM usando o software MeterSize (versão 1.1). A variação indica desvio padrão (n = 50 partículas).

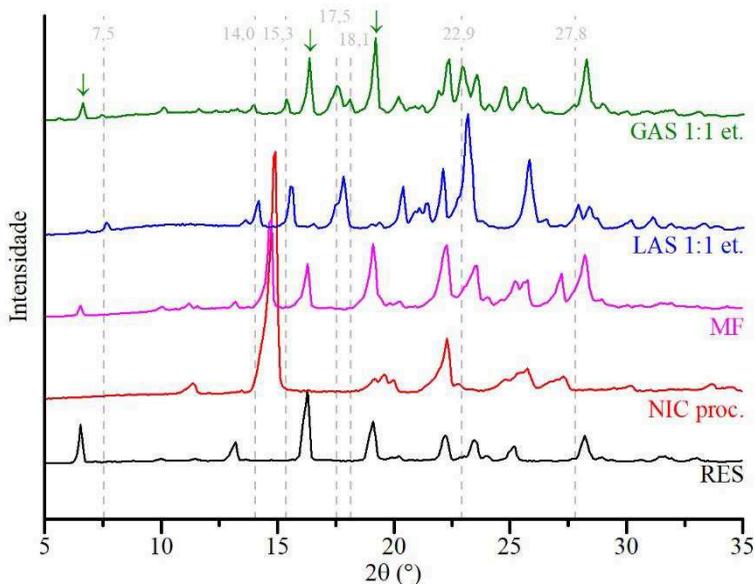
Figura 5.6 – Imagens do FESEM de (a) RES após o processo de GAS, (b) INZ após o processo de GAS, (c) mistura física de RES-INZ, (d) cocrystal de RES-INZ (LAS) e cocrystal de (e) RES-INZ (GAS).



5.1.3 RES-NIC

Na Figura 5.7 são apresentados os difratogramas de raios X do RES, da NIC, da mistura física RES-NIC e dos cocristais de RES-NIC (1:1) obtidos por LAS e por GAS.

Figura 5.7 – Difratogramas do RES, NIC processada (NIC proc.), mistura física RES- NIC (MF), RES- NIC obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES- NIC obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).

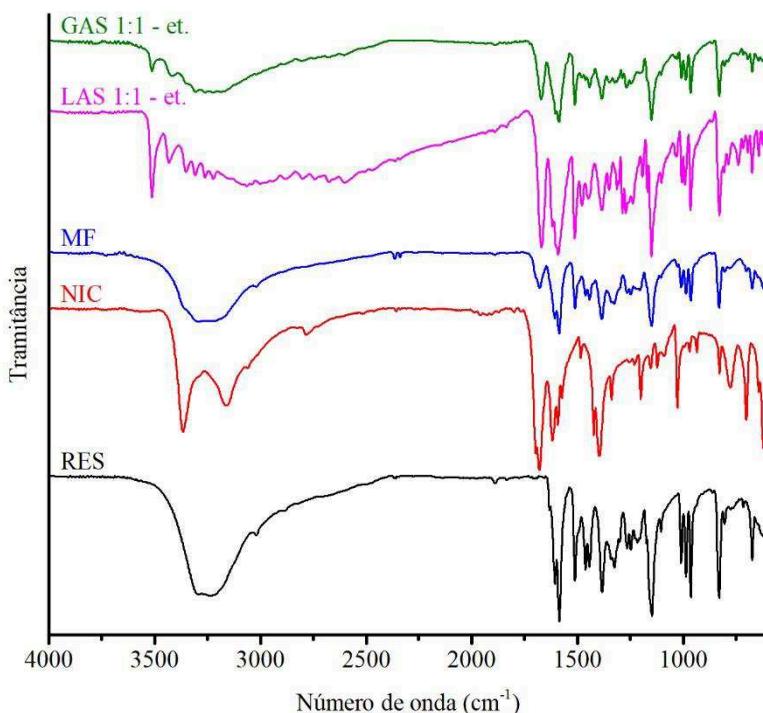


A partir da comparação dos difratogramas de DRXP dos compostos de partida (RES e NIC) com aqueles obtidos para o cocristal RES-NIC sintetizado por GAS, observou-se que o padrão de difração do cocristal RES-NIC produzido por GAS apresenta todas as reflexões encontradas no cocristal produzido por LAS (7,5, 14,0, 15,3, 17,5, 18,1, 22,9 e 27,8° 2θ), além disso, esses valores também estão de acordo com os relatados por He et al. (2017) para o cocristal RES-NIC produzido por evaporação de uma mistura de solventes orgânicos, entretanto, algumas reflexões correspondentes aos compostos puros, que não estão presentes no difratograma do cocristal produzido por LAS, se encontram presentes no difratograma do cocristal produzido por GAS, como por exemplo, as

que se encontram destacadas por uma seta (\downarrow) em $6,5^\circ$, $16,3^\circ$ e $19,2^\circ 2\theta$, indicando que o cocristal foi formado junto com material não cocristalizado.

A fim de confirmar a formação do cocristal RES-NIC sintetizado por GAS, foi realizada a análise espectrométrica das substâncias iniciais e das amostras RES-NIC (GAS) e RES-NIC (LAS), pela técnica de FTIR, a Figura 5.8 apresenta os espectros obtidos.

Figura 5.8 – FTIR do RES, NIC processada (NIC proc.), mistura física RES-NIC (MF), RES-NIC obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-NIC obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).



A partir dos resultados obtidos por FTIR, foi possível verificar que os espectros das amostras RES-NIC (GAS) e RES-NIC (LAS) são similares entre si, e apresentaram diferenças espectrais em relação aos seus compostos formadores (RES e NIC), evidenciando a formação do cocristal de RES-NIC (1:1). Estas diferenças podem ser observadas

principalmente na região com números de onda superiores a 1600 cm^{-1} e são idênticas e já sumarizadas na Tabela 4.2.

A partir da comparação do espectro da NIC com aquele obtido para o cocrystal RES-NIC (LAS e GAS), observou-se que o modo vibracional atribuído ao estiramento da carbonila (C=O) presente na NIC a 1680 cm^{-1} encontra-se deslocado para 1670 cm^{-1} . Também ocorreu o deslocamento das bandas espectrais da NIC em 3363 e 3159 cm^{-1} (atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo NH_2 para 3511 e 3222 cm^{-1} , respectivamente, no espectro do cocrystal).

Ao relacionar o espectro do cocrystal sintetizado com aquele obtido para o RES também foram observadas diferenças. Assim, verificou-se que as bandas de absorção deste composto localizadas em 3234 cm^{-1} , que são atribuídas ao estiramento da ligação OH se encontra deslocada para 3260 cm^{-1} no cocrystal. Portanto, estas alterações permitem inferir a formação de um cocrystal com modos vibracionais específicos. Ressalta-se que estes dados complementam os resultados obtidos na análise por DRXP, que também evidenciaram a formação de um novo arranjo cristalino.

A caracterização térmica dos compostos de partida (RES e NIC), da mistura física desses componentes e do cocrystal de RES-NIC (GAS e LAS) foi realizada utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC). A Figura 5.9 apresenta as curvas de DSC para estes materiais.

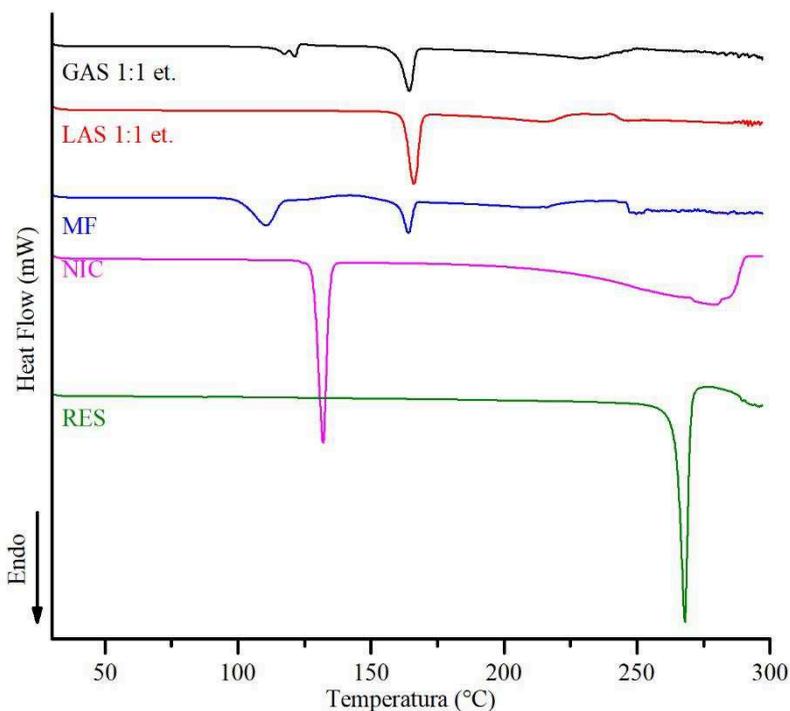
Para os compostos de partida, o RES apresentou um evento endotérmico em $268,0\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 276,2\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), sendo este evento característico do processo de fusão da substância. Para a NIC ocorreu um evento endotérmico em $131,9\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 197,7\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), correspondente ao seu processo de fusão. Na mistura física ocorreram 2 eventos endotérmicos e 1 evento exotérmico, já devidamente analisados anteriormente no item 4.1.4.

Observou-se a partir da comparação das curvas DSC dos compostos de partida (RES e NIC) com aquelas obtidas para o cocrystal RES-NIC sintetizado pelas metodologias empregadas neste estudo, que o material obtido por LAS apresentou um único evento endotérmico correspondente à fusão deste. Esta transição de fase ocorreu em $166,1\text{ }^\circ\text{C}$ com correspondente a $\Delta H = 87,5\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$. Entretanto, o RES-NIC obtido por GAS apresentou três eventos endotérmicos, dois muito próximos em $117,8$ e $121,5\text{ }^\circ\text{C}$, correspondendo provavelmente a fusão de mistura eutética ou componente puro, e mais um evento endotérmico em $164,3\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 58,05\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), correspondente ao processo de fusão do cocrystal.

A diferença entre os pontos de fusão do cocrystal e dos componentes iniciais é característica da formação de uma nova fase sólida.

Deste modo, as características desta transição confirmam termicamente a formação do cocrystal de RES a partir de sua interação com o coformador NIC, indicando que este material poderá apresentar aumento na solubilidade quando comparado ao API original, haja vista que uma temperatura de fusão menor pode evidenciar a existência de forças de interação mais fracas.

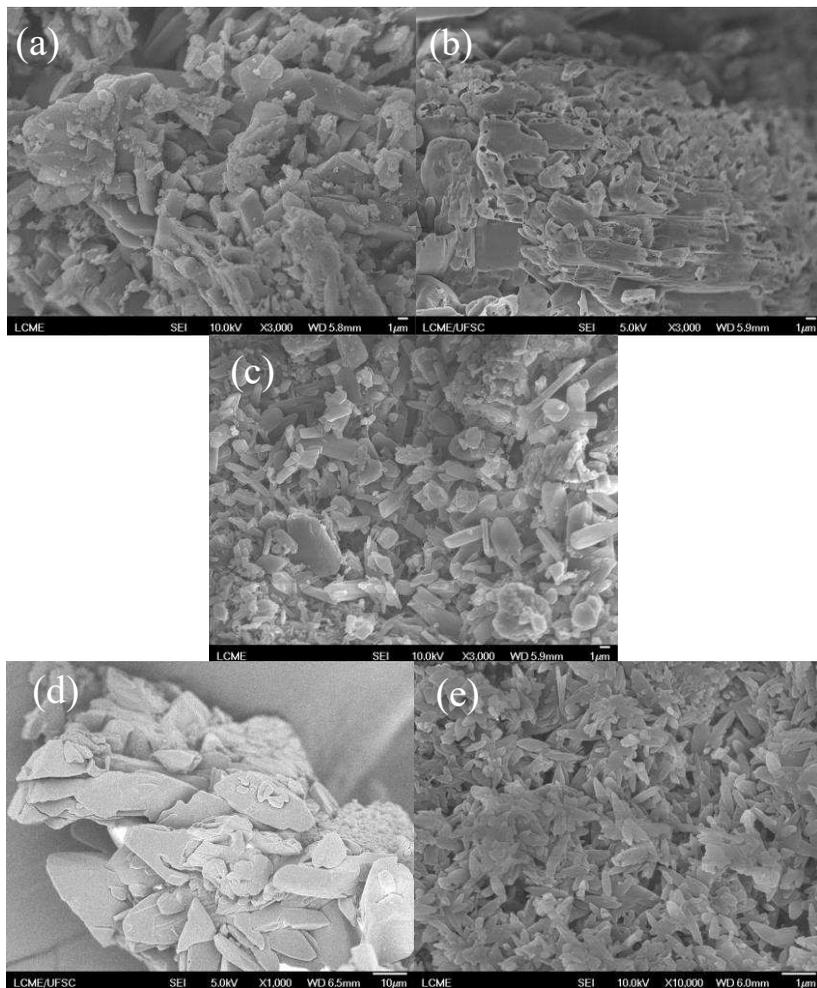
Figura 5.9 – Curvas de DSC do RES processado, NIC processada, mistura física RES-NIC (MF), RES-NIC obtido por LAS utilizando etanol como solvente (LAS 1:1 et.) e RES-NIC obtido por GAS utilizando etanol como solvente (GAS 1:1 et.).



Imagens FESEM dos componentes puros e cocrystal são mostradas na Figura 5.10a-e. O RES apresentou estruturas com forma

aleatória com tamanhos variando de 6 a 66 μm , como mostra a Figura 5.10a.

Figura 5.10 – Imagens do FESEM de (a) RES após o processo de GAS, (b) NIC após o processo de GAS, (c) mistura física de RES-NIC, (d) cocristal de RES-NIC (LAS) e cocristal de (e) RES-NIC (GAS).



A NIC apresentou partículas com forma de coluna com tamanho médio de 10,9 μm como mostrado na Figura 5.10b. Além disso, ambas as partículas irregulares e retangulares correspondentes aos compostos

originais foram observadas na mistura física (Figura 5.10c), indicando que não houve interação entre RES e NIC. Por outro lado, os cocristais de RES-INZ formados mostraram claramente que a sua morfologia era diferente em comparação com os componentes individuais, enquanto o cocristal RES-NIC (LAS) (Figura 5.10d) era composto de partículas em forma de flocos e tamanho da ordem de 25 μm , o RES-NIC (GAS) apresentou partículas em forma de agulha com tamanho muito menor (0,8 μm) como pode ser visto na Figura 5.10e. Os dados relativos ao tamanho das partículas se encontram resumidos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Dados de tamanho de partícula para RES, NIC e cocristais RES-NIC (LAS e GAS).

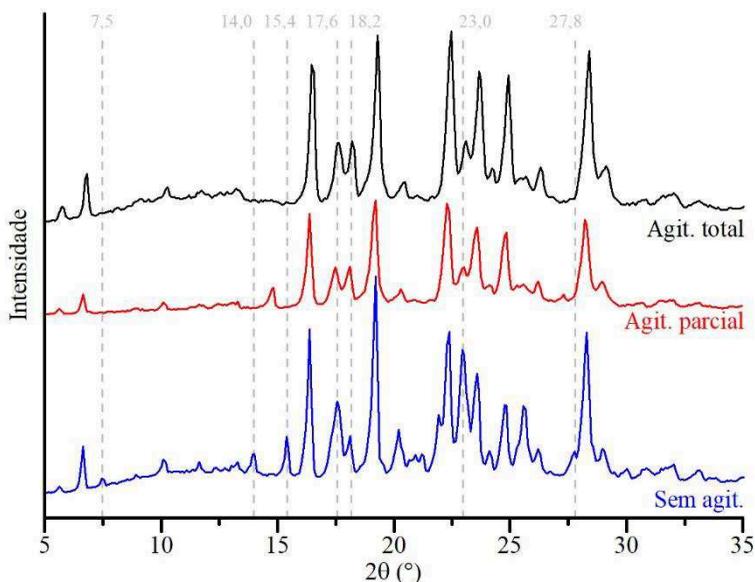
Amostra	Tamanho de partícula (média da linha diagonal em μm)	Coefficiente de variação (%)
RES	17,2 \pm 13,2	76,7
NIC	10,9 \pm 6,7	61,5
RES-NIC (LAS)	25,0 \pm 9,6	38,4
RES-NIC (GAS)	0,8 \pm 0,3	37,5

Tamanho determinado a partir de imagens FESEM usando o software MeterSize (versão 1.1). A variação indica desvio padrão (n = 50 partículas).

5.1.4 Efeito da agitação do sistema durante o processamento GAS

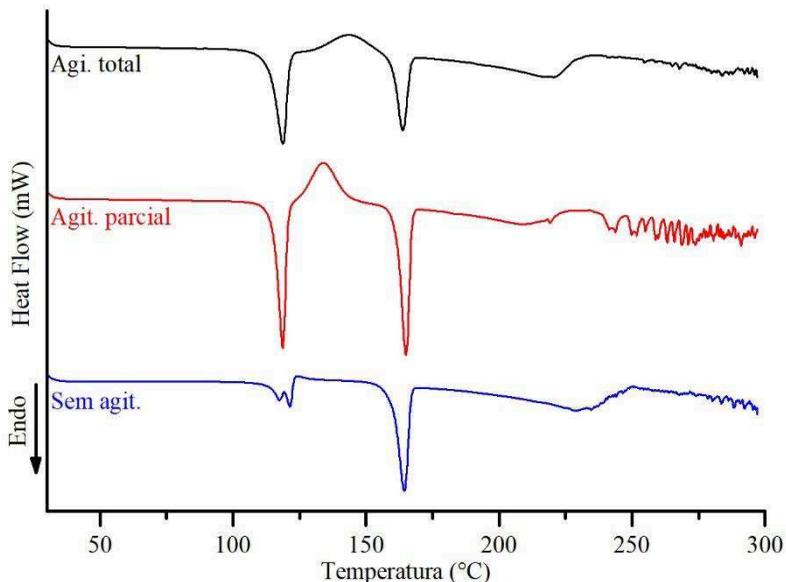
Para avaliar o efeito da agitação do sistema foram conduzidos experimentos com RES e o coformador NIC sem nenhuma agitação, com agitação apenas durante os 10 min quando o sistema ficou sem injeção de CO_2 , e com agitação durante todo o processo. O mecanismo de nucleação e crescimento de cristais na adição de antissolvente supercrítico envolve a combinação de dois fenômenos: a difusão do antissolvente para a fase orgânica e a evaporação do solvente orgânico na fase antissolvente, a expansão de volume causada pela difusão antissolvente reduz a solubilidade do soluto devido a redução da densidade, por outro lado, a evaporação do solvente na fase gasosa aumenta a concentração do soluto (PASQUALI; BETTINI; GIORDANO, 2008). A agitação do sistema produz uma maior dispersão do CO_2 no solvente, o que leva a uma rápida saturação dos componentes dissolvidos. Os difratogramas dos experimentos para avaliar o efeito da agitação do sistema são apresentados na Figura 5.11.

Figura 5.11 – Difratogramas dos experimentos realizados com agitação total, agitação parcial e sem agitação do sistema.



Pela análise dos difratogramas da Figura 5.11 é possível verificar, no difratograma do produto do experimento sem agitação, a presença de reflexões correspondentes ao cocristal produzido por LAS e que não estão presentes no difratogramas dos produtos dos experimentos conduzidos com agitação total ou parcial (7,5; 14,0; 15,4 e 27,8 °2θ), indicando que o produto sem agitação produziu o cocristal em maior proporção. Essa assertiva é apoiada pela análise da Figura 5.12, onde são apresentadas as curvas de DSC para os experimentos conduzidos com e sem agitação.

Figura 5.12 – Termogramas dos experimentos realizados com agitação total, agitação parcial e sem agitação do sistema.

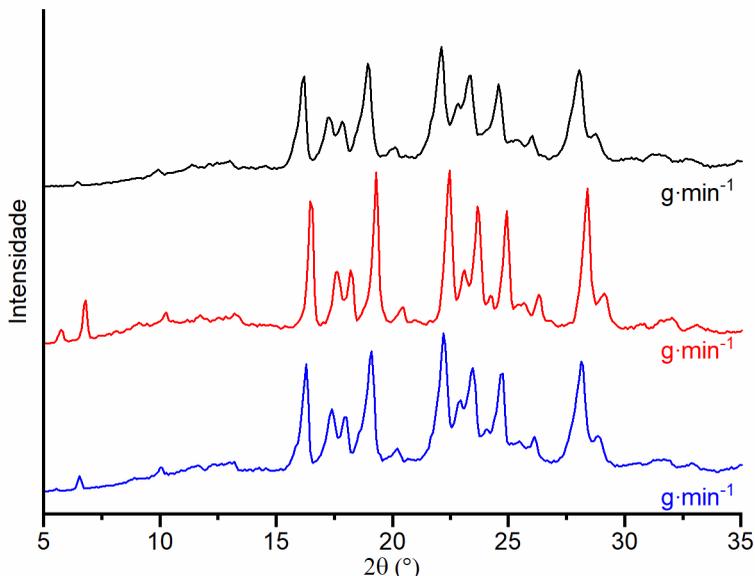


A curva de DSC correspondente ao experimento sem agitação apresentou o evento endotérmico correspondente a fusão da mistura eutética com menor variação de entalpia ($24,9 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$) em comparação com o a variação de entalpia do experimento com agitação parcial ($73,1 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$) e agitação total ($59,1 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$). Isso indica que, no caso desses componentes, a rápida saturação produzida pela agitação prejudica a formação do cocrystal RES-NIC.

5.1.5 Efeito da vazão de CO_2

Para avaliar o efeito da vazão do CO_2 na produção do cocrystal de RES-NIC pela técnica GAS foram realizados experimentos nas vazões de 5, 10 e 20 $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ de CO_2 . Os resultados do DRX são apresentados na Figura 5.13.

Figura 5.13 – Padrão de DRX para cocristais de RES-NIC obtidos por GAS para diferentes vazões de CO₂.



Os difratogramas apresentados praticamente se sobrepõem, indicando que a variação da vazão do CO₂, nos níveis estudados, não resultou em alterações consideráveis na estrutura cristalina dos cocristais formados. Esse resultado mostra que é possível trabalhar em uma vazão de CO₂ maior, o que torna o processo mais rápido, sem perda no rendimento da cocristalização.

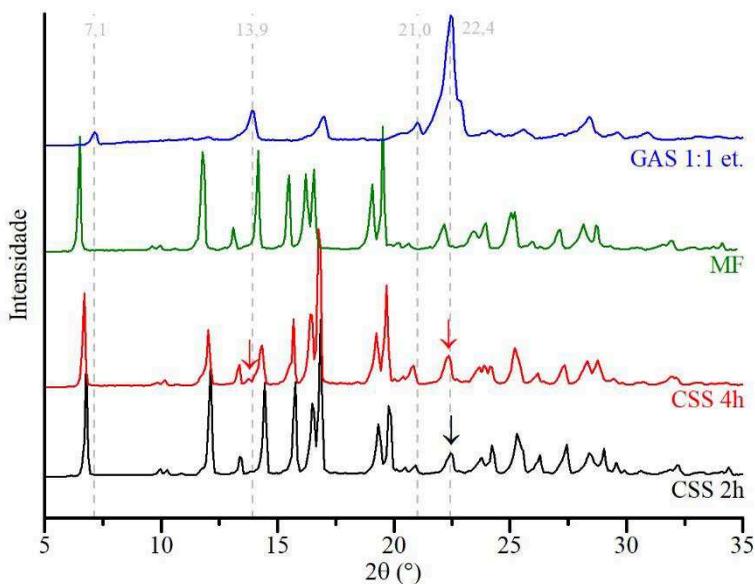
5.2 SOLVENTE SUPERCRÍTICO (CSS)

Como as tentativas de produção de cocristais do RES com a NIC pela técnica CSS não obtiveram sucesso, a INZ foi então escolhida para avaliar a possibilidade de produção de cocristais pela técnica de solvente supercrítico (CSS). A maior vantagem dessa metodologia se encontra no fato de não utilizar solvente orgânico, sendo o CO₂ supercrítico o meio utilizado para ocorrer a cocristalização. Os experimentos pela técnica CSS foram realizados a pressão de 90 bar e temperatura de 45 °C.

5.2.1 RES-INZ

Uma mistura física de RES (0,3 g equivalente a 0,013 mol) e INZ (0,178 g equivalente a 0,0013 mol) foi preparada e introduzida na câmara de precipitação sem nenhum solvente orgânico com aplicação da metodologia descrita no item 3.2.4. Experimentos foram realizados com duração de 2 e 4 h, durante o tempo para a etapa em que o sistema permaneceu sem vazão de CO₂. Na Figura 5.14 são apresentados os resultados do DRXP do cocristal obtido por GAS (GAS 1:1 et.), para comparação, da mistura física RES-INZ (MF), do experimento com CSS com duração de 4 h (CSS 4h) e do experimento com CSS com duração de 2 h (CSS 2h).

Figura 5.14 – DRXP do cocristal obtido por GAS (GAS 1:1 et.), da mistura física RES-INZ (MF), do experimento com CSS com duração de 4 h (CSS 4h) e do experimento com CSS com duração de 2 h (CSS 2h)

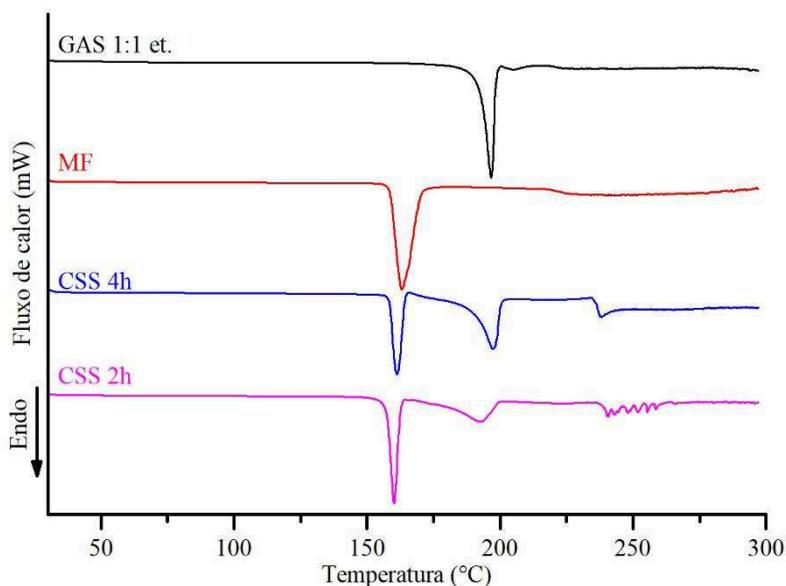


Esses resultados mostram que o produto obtido por CSS apresenta ainda uma grande quantidade de material não cocristalizado, como pode ser visto pela presença de várias reflexões correspondentes aos componentes puros, e, como é baseado na capacidade do fluido

supercrítico agir como solvente, isso pode ser atribuído a baixa solubilidade dos componentes iniciais no fluido supercrítico. Resultado semelhante foi obtido por Padrela et al. (2009) na obtenção de cocristais de indometacina e sacarina por meio da técnica CSS.

Verifica-se também a ausência da reflexão em $7,1^\circ 2\theta$ nos difratogramas dos produtos obtidos por CSS, entretanto, todas as outras reflexões atribuídas ao cocrystal RES-INZ estão presentes no produto obtido em 4 h, enquanto que no difratograma do produto obtido em 2 h a reflexão em $13,9^\circ 2\theta$ também não está presente. Isso sugere um aumento da quantidade de cocrystal formada no experimento realizado em 4 h. Para avaliar essa possibilidade foram obtidos os termogramas dos produtos dos experimentos que estão apresentados na Figura 5.15.

Figura 5.15 – DSC do cocrystal obtido por GAS (GAS 1:1 et.), da mistura física RES-INZ (MF), do experimento com CSS com duração de 4 h (CSS 4h) e do experimento com CSS com duração de 2 h (CSS 2h)



Um resumo das informações contidas na figura acima pode ser observado na Tabela 5.4. A curva correspondente aos experimentos elaborados em 4 e 2 h apresentam ambos dois eventos endotérmicos, o primeiro ocorreu em $160,2^\circ\text{C}$ para CSS 2h, com $\Delta H 88,2 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$, e em $161,2$

°C, com ΔH 79,7 J·g⁻¹, para o CSS 4h. Essas temperaturas estão bem próximas a temperatura de fusão eutético formado na mistura física (162,9 °C), porém, com o ΔH bem inferior. O segundo evento, correspondente a fusão do cocrystal, ocorre em 192,8 °C, com ΔH 76,3 J·g⁻¹, para o experimento CSS 2h e em 197,3 °C, com ΔH 107,8 J·g⁻¹, para o experimento CSS 4h. O aumento do ΔH de fusão do cocrystal em conjunto com a redução do ΔH de fusão do eutético apontam para uma maior quantidade de cocrystal formada em 4 h de experimento reforçando a possibilidade dissertada anteriormente na análise do DRXP. Esse resultado vai de encontro ao reportado por Padrela et al. (2009) que, ao estudar a formação de cocrystal de indometacina e sacarina, não encontrou efeito do tempo de exposição das amostras ao CO₂ supercrítico sobre a quantidade de cocrystal formados.

Tabela 5.4 Tabela 5.5 – Comportamento térmico obtido por DSC do produto RES-INZ obtido GAS, mistura física RES-INZ, produto do experimento CSS em 4 h e produto do experimento CSS em 2 h.

Amostra	1º evento			2º evento		
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (J·g ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (J·g ⁻¹)
GAS 1:1 et.	—	—	—	187,1	196,6	129,1
MF	156,7	162,9	191,3	—	—	—
CSS 4h	156,9	161,2	79,7	183,9	197,3	107,8
CSS 2h	155,1	160,2	88,2	180,3	192,8	76,3

5.3 CONCLUSÃO

A viabilidade da cocrystalização utilizando meio supercrítico pela técnica GAS para a produção de cocrystal do RES foi comparada com um processo tradicional de antissolvente líquido utilizando n-hexano. Cocrystal de RES de similar cristalinidade foram produzidos por ambos os métodos. A análise DRXP, FTIR e DSC estão em concordância com dados reportados anteriores da literatura para o cocrystal de RES-INZ e RES-NIC. No caso do cocrystal RES-NIC produzidos por GAS, a análise de DRXP e DSC revelou presença de alguma fração de componentes não-cristalizados que sofrem fusão eutética quando aquecidos, essa fração foi menor quando o experimento foi realizado sem nenhuma agitação do sistema. A influência da vazão de CO₂ supercrítico na formação do cocrystal pela técnica GAS no intervalo estudado se mostrou

negligenciável. A mistura RES-INZ foi utilizada para avaliar a viabilidade da técnica CSS não sendo possível a obtenção de cocristais puros. As análises de DRXP e DSC revelaram presença de material não cocristalizado sendo essa quantidade menor quando o tempo de exposição ao CO₂ é ampliado.

CAPÍTULO 6

6 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

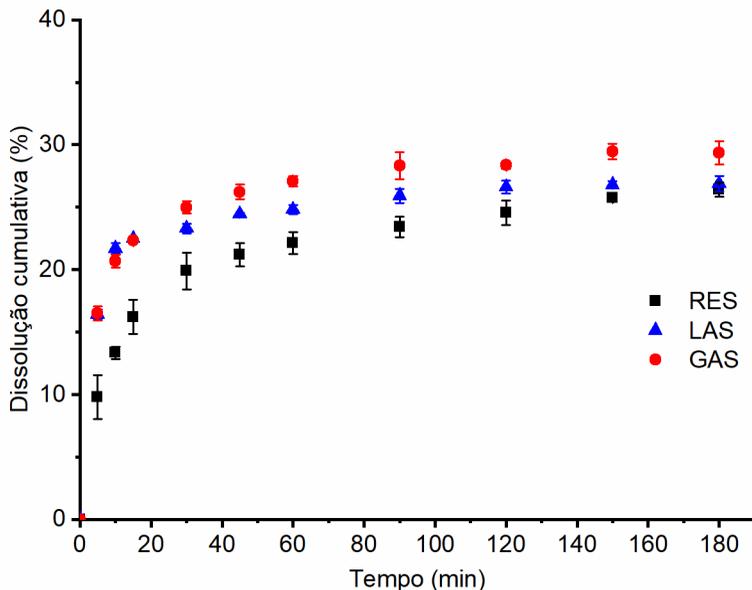
O perfil de dissolução pode ser alterado pela formação de cocristais e tanto um aumento quanto uma diminuição nas propriedades de dissolução foram relatados (HIENDRAWAN et al., 2016; MIN-SOOK et al., 2010; OBER; GUPTA, 2012; RAJESH GOUD; KHAN; NANGIA, 2014). O experimento de dissolução foi conduzido utilizando o RES após o processamento por GAS e nos cocristais RES-NIC. Os cocristais de RES-INZ não foram utilizados nessa fase em função da INZ ser antibiótico, usado como primeira escolha no tratamento da tuberculose, e que, portanto, não pode ser utilizado pela indústria de alimentos

Estudos de dissolução *in vitro* comparativos para cocristais do RES com NIC produzidos por LAS e GAS foram conduzidos a 37 °C durante um período de 3 h para avaliar a relevância em disponibilidade potencial e determinar como as diferenças na extensão da cocrystalização e do tamanho das partículas resultantes dos diferentes métodos de preparação do cocrystal podem afetar a taxa de dissolução do RES. Foram utilizados três meios para obter os perfis de dissolução: água destilada, solução tampão de fosfato (PBS) pH 6,8 e uma solução de HCl 0,1 M (pH 1,2), conforme relatado no item 3.4 na página 85.

6.1 ÁGUA DESTILADA

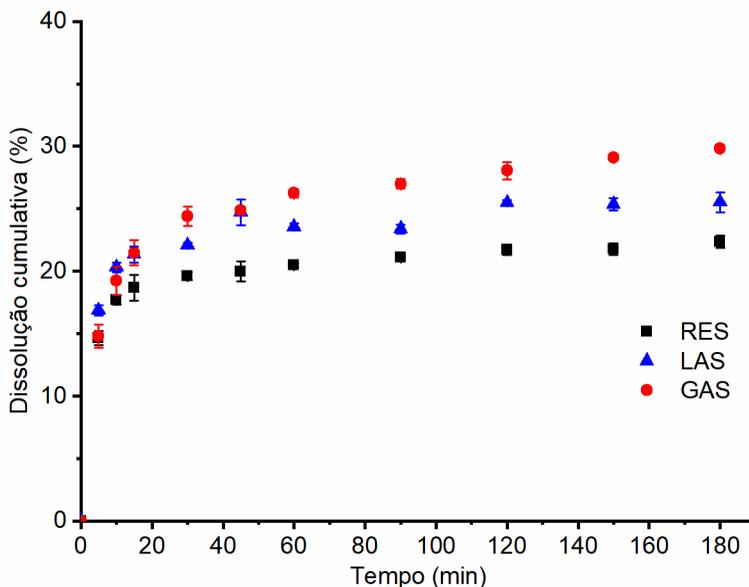
Os perfis de dissolução em água destilada para RES e dos cocristais de RES-NIC obtidos por LAS e GAS são mostrados na Figura 6.1. O RES exibiu baixa taxa de dissolução, alcançando menos de 25% de liberação em 2 h. Os cocristais preparados por ambos os métodos mostram uma dissolução significativamente mais rápida do que o RES, demonstrando assim a sua relevância para melhorar a sua biodisponibilidade. O cocrystal produzido por LAS apresenta uma maior taxa de liberação de RES e, em 45 min, atinge praticamente o mesmo percentual de liberação que o RES puro só atingiu em 2 h. O cocrystal produzido por GAS apresentou um perfil de liberação semelhante ao produzido por LAS até 15 min, a partir desse ponto passa a apresentar uma maior liberação do RES sendo que em 30 minutos libera praticamente o mesmo percentual que o RES puro liberou em 2 h.

Figura 6.1 – Perfis de dissolução de (■) RES, (▲) RES-NIC (LAS) e (●) RES-NIC (GAS) em água destilada, 37 °C. Os valores são médios e a barra de erro representa o desvio padrão, n = 3.



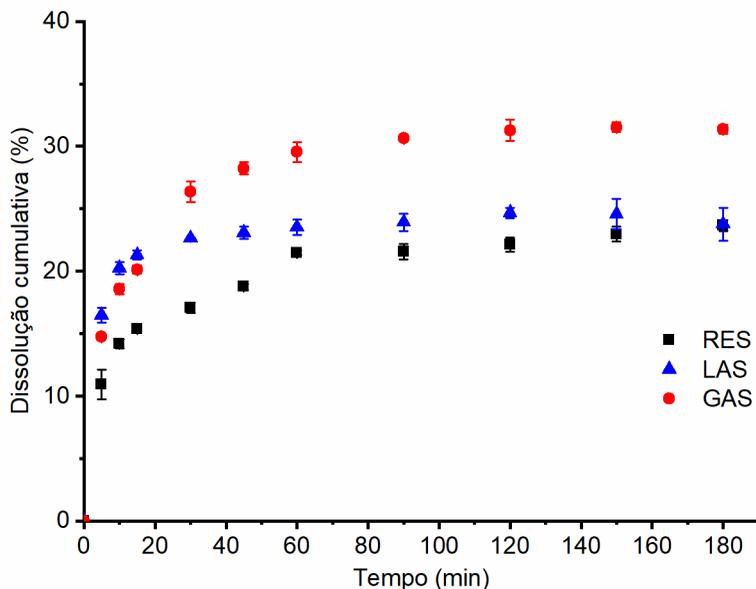
Os perfis de dissolução do RES e dos cocristais RES-NIC produzidos por LAS e GAS em pH 6,8 são apresentados na Figura 6.2. Os cocristais de RES-NIC produzidos usando CO₂ como antissolvente têm o perfil de liberação mais rápido, atingindo quase 30% de liberação em 3 h. Os cocristais de RES-NIC produzidos usando n-hexano têm liberação significativamente mais lenta, atingindo apenas 25,5% de liberação em 3 h. O RES por sua vez atingiu apenas 22% de liberação em 3 h. Aqui também temos o cocristal produzido por GAS apresentando um perfil de liberação semelhante ao produzido por LAS até 15 min e aumentado depois. Os dois cocristais analisados atingem em 15 min o percentual de liberação que o RES puro atingiu apenas em 2 h.

Figura 6.2 – Perfis de dissolução de (■) RES, (▲) RES-NIC (LAS) e (●) RES-NIC (GAS) em tampão fosfato (pH = 6,8), 37 °C. Os valores são médios e a barra de erro representa o desvio padrão, n = 3.



Os perfis de dissolução em pH 1,2 para RES e dos cocrystalis de RES-NIC obtidos por LAS e GAS são mostrados na Figura 6.3. Os resultados mostram que é evidente que tanto RES-NIC (LAS) como RES-NIC (GAS) aumentam o perfil de dissolução de RES, tendo a preparação do cocrystal por GAS produzindo melhores resultados. A taxa de dissolução do RES-NIC (GAS) e do cocrystal RES-NIC (LAS) atingiram os valores de 26,35% e 22,62% em comparação com o RES 17,07% em 30 min. Valores próximos aos percentuais obtidos pelos cocrystalis só foram obtidos pelo RES puro em 150 min.

Figura 6.3 – Perfis de dissolução de (■) RES, (▲) RES-NIC (LAS) e (●) RES-NIC (GAS) em solução de HCl 0,1 mol·L⁻¹ (pH = 1,2), 37 °C. Os valores são médios e a barra de erro representa o desvio padrão, n = 3.



Apesar dos cocrystalis produzidos por cada método terem estruturas cristalinas e químicas semelhantes, conforme determinado por DXRP e FTIR, parece que as diferenças morfológicas e composicionais resultantes do método de preparação podem ter um forte efeito na dissolução do RES. Vários autores propõem este aumento na taxa de dissolução no caso dos cocrystalis RES-NIC comparados ao fármaco puro processado, isso indica que os cocrystalis têm uma estrutura cristalina mais fraca e portanto uma taxa de dissolução maior, como observado pelos dados de DSC que revelaram redução na temperatura e entalpia de fusão dos cocrystalis em comparação com o composto original (EL-GIZAWY et al., 2015; KOTBANTAO; CHAROENCHAITRAKOOL, 2017; PANZADE et al., 2017). Por outro lado, a melhoria na dissolução do cocrystalis RES-NIC (GAS) em comparação com o RES-NIC (LAS), mesmo o primeiro contendo RES e NIC não cocrystalizados, é provavelmente devida à redução significativa do tamanho das partículas, como as imagens do FESEM mostraram.

Os resultados também mostram que o efeito do pH na solubilidade do resveratrol foi pouco pronunciado, resultados semelhantes foram encontrados por Zupančič, Lavrič e Kristl (2015).

A eficiência de dissolução (ED) também permite comparar adequadamente os perfis de dissolução de fármacos (KHAN, 1975). Esta variável está relacionada com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e é um importante parâmetro de cinética de dissolução. Este termo pode ser definido como a área sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo. A ED permite a comparação mais fidedigna entre produtos. Além disso, este parâmetro está relacionado com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (SERRA; STORPIRTIS, 2007). A eficiência de dissolução foi calculada a partir da área sob a curva obtida a partir da porcentagem dissolvida até 180 min em relação à área total do gráfico (ED₁₈₀).

Na Figura 6.4 e na Tabela 6.1 é apresentada a eficiência de dissolução, calculada no intervalo de 0 a 180 min (ED₁₈₀), relativa a amostras de RES puro, cocristal RES-NIC produzido por LAS e cocristal RES-INZ produzido por GAS. A taxa de dissolução dos cocristais medida pela eficiência de dissolução (ED₁₈₀) é consideravelmente mais rápida do que o RES puro. No teste de dissolução, o cocristal produzido pela técnica GAS apresentou melhor eficiência de dissolução nos três meios estudados (26,73% ± 0,47 em água destilada, 28,48% ± 0,31 em pH 1,2 e 26,04% ± 0,20 em pH 6,8), logo depois está o cocristal produzido pela técnica LAS, (24,84% ± 0,20 em água destilada, 23,13% ± 0,57 em pH 1,2 e 23,55% ± 0,11 em pH 6,8) enquanto que o RES puro apresentou menor eficiência de dissolução (22,22% ± 0,71 em água destilada, 20,30% ± 0,19 em pH 1,2 e 20,42% ± 0,23 em pH 6,8).

Figura 6.4 – Eficiência de dissolução em 180 min (ED_{180}) para o RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em água destilada, tampão fosfato (pH = 6,8) e solução de HCl 0,1 mol·L⁻¹ (pH = 1,2).

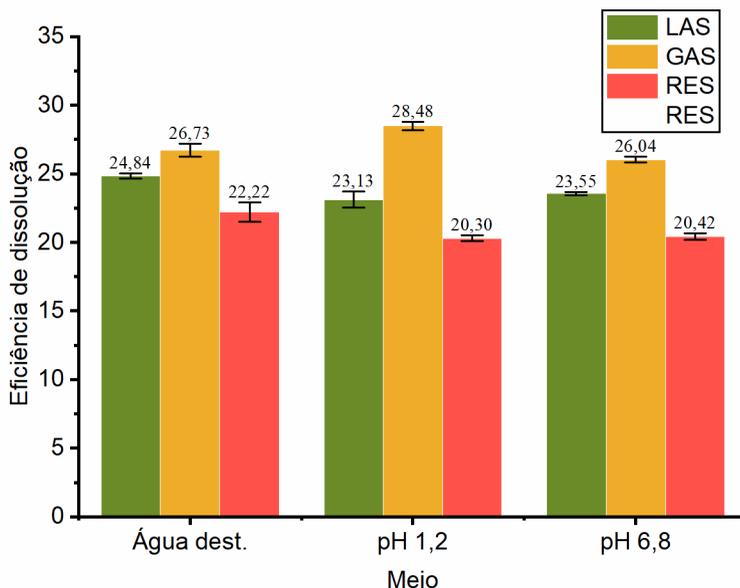


Tabela 6.1 - Eficiência de dissolução em 180 min (ED_{180}) para o RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em água destilada, tampão fosfato (pH = 6,8) e solução de HCl 0,1 mol·L⁻¹ (pH = 1,2).

Meio	Eficiência de dissolução (%)		
	RES	RES-NIC(LAS)	RES-NIC (GAS)
Água destilada	22,22 ± 0,71	24,84 ± 0,20	26,73 ± 0,47
Tampão (pH = 6,8)	20,42 ± 0,23	23,55 ± 0,11	26,04 ± 0,20
HCl (pH = 1,2)	20,30 ± 0,19	23,13 ± 0,57	28,48 ± 0,31

A análise de variância simples foi utilizada considerando-se como fator a eficiência de dissolução. A análise de variância (as tabelas de ANOVA para cada meio se encontram no apêndice D) demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre a eficiência de dissolução do RES e dos cocristais produzidos por LAS e GAS nos três meios ($F_{\text{água dest.}} = 60,8$; $F_{\text{pH 1,2}} = 340,7$; $F_{\text{pH 6,8}} = 684,0$; $p < 0,05$). Desta forma, foi realizado o teste de Tukey para cada meio e, de acordo com os valores obtidos, comparação múltipla de médias e $p < 0,05$, verificou-se que os valores de eficiência de dissolução do RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) são

estatisticamente diferentes entre si em cada meio. Como o RES pertence a classe 2 da classificação biofarmacêutica (PUJARA et al., 2017), cabe ressaltar que a dissolução *in vivo* é a etapa limitante da absorção e esta pode ser variável devido aos fatores relacionados as formulações. Assim, os estudos de dissolução *in vitro* são fundamentais para assegurar a qualidade das formulações na forma sólida, bem como para permitir a otimização das mesmas quando em desenvolvimento.

6.2 CONCLUSÃO

O resveratrol apresenta muitos benefícios para a saúde humana, o problema se encontra na sua baixa solubilidade e biodisponibilidade que limita seu uso. Os ensaios de dissolução *in vitro* apontaram que os cocristais de RES-NIC produzidos por LAS e GAS parecem ter relevância potencial para aumentar a biodisponibilidade do RES, com os cocristais formados apresentando um perfil de dissolução melhor com relação ao RES puro em todos os meios estudados, com destaque para o cocrystal produzido pela técnica GAS, que apresentou o melhor perfil de solubilidade que o cocrystal produzido por LAS, provavelmente em função do menor tamanho de partícula. A análise de variância realizada em função da eficiência de dissolução mostrou diferença estatisticamente significativa entre os cocristais e o RES.

CAPÍTULO 7

7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste capítulo são apresentadas as conclusões decorrentes do desenvolvimento do trabalho, além das sugestões para trabalhos futuros e produção técnico-científica decorrente da execução do trabalho.

7.1 CONCLUSÕES

A partir do *screening* realizado a baixa pressão foi possível a produção de cocristais do RES com a INZ e NIC. Os cocristais foram produzidos na proporção molar 1:1 utilizando etanol como solvente e n-hexano como antissolvente. Os cocristais produzidos foram caracterizados por DRXP, FTIR e DSC. O cocristal RES-INZ apresentou o mesmo padrão de DRXP do cocristal relatado anteriormente na literatura, apresentando também os mesmos deslocamentos nas principais bandas de FTIR e perfil térmico obtido por DSC. O cocristal RES-NIC apresentou novas reflexões no padrão de DRXP, além do desaparecimento de reflexões características dos compostos iniciais. Apresentou deslocamento em várias bandas de FTIR com destaque para a que corresponde ao estiramento da carbonila. Sua curva de DSC apresentou um evento único, correspondente a fusão do cocristal, em temperatura entre os pontos de fusão dos componentes puros. O padrão de DRXP e a análise de DSC apresentaram resultados bem próximos ao cocristal RES-NIC já descrito na literatura.

Foi possível obter os cocristais produzidos anteriormente em baixa pressão, ou pela técnica GAS utilizando etanol como solvente e CO₂ supercrítico como antissolvente. Os cocristais produzidos apresentaram as mesmas características estruturais e térmicas que os produzidos por LAS embora só tenha sido possível obter o cocristal RES-NIC agregado a material não cocristalizado, evidenciado por reflexões remanescentes no seu padrão de DRXP e por evento de fusão eutética, semelhante ao apresentado na mistura física, revelado na curva de DSC. A análise de FESEM mostrou que a morfologia dos cocristais RES-INZ é diferente dos componentes individuais, ambos os cocristais apresentam estruturas em forma de agulha. A morfologia dos cocristais RES-NIC também apresentaram morfologia diferente dos compostos puros, sendo que o produzido por LAS apresentou forma de flocos e tamanho da ordem de 25 µm enquanto que os produzidos por GAS apresentou partículas em forma de agulha com tamanho muito menor, da ordem de 0,8 µm. O efeito da agitação do sistema foi avaliado durante o processamento por GAS para produzir cocristais de RES-NIC, sendo o processo sem agitação o

que apresentou maior extensão de cocristalização segundo a análise de DRXP e DSC, indicando que a rápida saturação produzida pela agitação prejudica a formação do cocristal. O efeito da vazão de CO₂ também foi avaliado e não resultou em alterações consideráveis na estrutura cristalina dos cocristais formados.

Nos experimentos com CSS só foi possível a formação parcial de cocristal utilizando a INZ. A análise de DRXP e DSC apontou o aumento na quantidade de cocristal formada com o aumento no tempo de processamento.

Os cocristais de RES-NIC produzidos apresentaram um aumento significativo do perfil e eficiência de dissolução quando comparados ao RES puro, sendo que o produzido por GAS exibiu os melhores resultados provavelmente em função do seu menor tamanho de partícula, evidenciado pelas micrografias. Estes resultados abrem uma perspectiva de melhoria na biodisponibilidade do RES com a utilização de cocristais.

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho levam à conclusão de que a produção de cocristais por fluido supercrítico utilizando a técnica GAS é uma boa alternativa para aumentar a velocidade de dissolução de compostos além de reduzir o uso de solventes orgânicos em favor do CO₂, ambientalmente adequado, fornecendo informações úteis para o desenvolvimento de sistemas de entrega de resveratrol com relevância em aplicações alimentícias.

7.2 SUGESTÕES

Como sugestões neste trabalho estão:

- Avaliar a possibilidade de formação de cocristais com outros coformadores, com destaque para os que apresentam grupamento amino em sua estrutura.
- Utilizar os isômeros posicionais da nicotinamida (isonicotinamida e picolinamida) para avaliar o efeito da posição do nitrogênio piridínico na formação de cocristais.
- Determinar a solubilidade do RES e dos coformadores em CO₂ supercrítico e em misturas de CO₂ com solventes orgânicos.
- Estudar a influência de cada parâmetro separadamente na formação dos cocristais pela técnica GAS, principalmente

em relação a pressão, temperatura e tempo com o sistema sem vazão de CO₂.

- Verificar os perfis de dissolução *in vitro* dos cocristais da INZ utilizando Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC) para quantificação do RES liberado.
- Realizar estudos *in vivo* em modelos animais, avaliando a biodisponibilidade dos cocristais.
- Realizar estudos de fotodegradação e termodegradação dos cocristais em comparação com o RES.
- Avaliar a atividade antioxidante dos cocristais formados em comparação com o RES.

7.3 PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO

7.3.1 Trabalhos publicados/submetidos em periódicos

Pessoa, A. S.; Aguiar, G. P. S; Oliveira, J. V.; Bortoluzzi, A. J.; Paulino, A.; Lanza, M. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antissolvente. The Journal of Supercritical Fluids, aceito para publicação, 2018.

7.3.2 Trabalhos publicados em anais de congressos

Pessoa, A. S.; Aguiar, G. P. S; Oliveira, J. V.; Reis, P. M. C. L.; Oliveira, J. V.; Lanza, M. Produção de cocrystal do resveratrol com nicotinamida utilizando CO₂ supercrítico. In: IX Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada, 2017, Porto Alegre. IX Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada, 2017.

REFERÊNCIAS

- AAKERÖY, C. B. et al. Crystal engineering: hydrogen-bonded salts of hydroxybenzoic acids for second harmonic generation. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 2, p. 152-156, 1993.
- AAKERÖY, C. B.; BEATTY, A. M.; HELFRICH, B. A. A high-yielding supramolecular reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 48, p. 14425-14432, 2002.
- AAKERÖY, C. B. et al. Ranking relative hydrogen-bond strengths in hydroxybenzoic acids for crystal-engineering purposes. **Chemistry--A European Journal**, v. 19, n. 44, p. 14998-15003, 2013.
- AAKERÖY, C. B.; FORBES, S.; DESPER, J. Using cocrystals to systematically modulate aqueous solubility and melting behavior of an anticancer drug. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 47, p. 17048-17049, 2009.
- AGUIAR, G. P. S. et al. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 350-355, 2016.
- AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.
- ALHALAWEH, A. et al. pH-dependent solubility of indomethacin–saccharin and carbamazepine–saccharin cocrystals in aqueous media. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 9, p. 2605-2612, 2012.
- ALMQVIST, N. et al. Micromechanical and structural properties of a pennate diatom investigated by atomic force microscopy. v. 202, n. 3, p. 518-532, 2001.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- AMIN, K. et al. Lyophilization of polyethylene glycol mixtures. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 9, p. 2244-2249,
- ANDERTON, C. A valuable technique for polymorph screening. **American Pharmaceutical Review**, v. 10, n. 2, p. 34-40, 2007.

BAK, A. et al. The co-crystal approach to improve the exposure of a water-insoluble compound: AMG 517 sorbic acid co-crystal characterization and pharmacokinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 9, p. 3942-3956, 2008.

BAKILER, M.; BOLUKBASI, O.; YILMAZ, A. An experimental and theoretical study of vibrational spectra of picolinamide, nicotinamide, and isonicotinamide. **Journal of Molecular Structure**, v. 826, n. 1, p. 6-16, 2007.

BARBAS, R. et al. Polymorphism of Norfloxacin: Evidence of the Enantiotropic Relationship between Polymorphs A and B. **Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 6, p. 1463-1467, 2006.

BARBOSA, L. C. D. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1. Viçosa: Editora UFV, 2007.

BARRETT, A. M.; DEHGHANI, F.; FOSTER, N. R. Increasing the dissolution rate of itraconazole processed by gas antisolvent techniques using polyethylene glycol as a carrier. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1274-1289, 2008.

BASLY, J.-P. et al. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 9, p. 769-777, 2000.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006.

BERNSTEIN, J. et al. Patterns in hydrogen bonding: Functionality and graph set analysis in crystals. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, n. 15, p. 1555-1573, 1995.

BERRY, D. J. et al. Applying hot-stage microscopy to co-crystal screening: A study of nicotinamide with seven active pharmaceutical ingredients. **Crystal Growth and Design**, v. 8, n. 5, p. 1697-1712, 2008.

BERTACCHE, V. et al. Host-guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 279-287, 2006.

BETHUNE, S. J.; SCHULTHEISS, N.; HENCK, J.-O. Improving the poor aqueous solubility of nutraceutical compound pterostilbene through cocrystal formation. **Crystal Growth and Design**, v. 11, n. 7, p. 2817-2823, 2011.

BEVILL, M. J.; VLAHOVA, P. I.; SMIT, J. P. Polymorphic cocrystals of nutraceutical compound p-coumaric acid with nicotinamide: Characterization, relative solid-state stability, and conversion to alternate stoichiometries. **Crystal Growth and Design**, v. 14, n. 3, p. 1438-1448, 2014.

BHULLAR, K. S.; UDENIGWE, C. C. Clinical evidence of resveratrol bioactivity in cardiovascular disease. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 68-73, 2016.

BILLES, F. et al. Vibrational spectroscopy of resveratrol. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 68, n. 3, p. 669-679, 2007.

BLAGDEN, N. et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617-630, 2007.

BO, S. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 1323-1331, 2013.

BOSCHETTO, D. L. et al. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 352-360, 2013.

BRITAIN, H. G. et al. Physical characterization of pharmaceutical solids. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 963-973, 1991.

BRUNNER, G. **Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes** New York: Steinkopff, 1994. 387 ISBN 978-3-662-07382-7.

BUONOCORE, D. et al. Resveratrol-procyanidin blend: nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebocontrolled, double-blind study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 5, p. 159-165, 2012.

CAMONT, L. et al. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, n. 1, p. 121-128, 2009.

CHADHA, R. et al. Chrysin cocrystals: Characterization and evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 134, p. 361-371, 2017.

CHADHA, R.; DUREJA, J.; KARAN, M. Tempering trans-resveratrol from the molecule to crystal level: A contemporary approach toward polymorphic pursuits and morphological insights. **Crystal Growth and Design**, v. 16, n. 2, p. 605-616, 2016.

CHADWICK, K. et al. The utility of a ternary phase diagram in the discovery of new co-crystal forms. **CrystEngComm**, v. 11, n. 3, p. 412-414, 2009.

CHAN, M. M.-Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 99-104, 2002.

CHEN, A. M. et al. Development of a pharmaceutical cocrystal of a monophosphate salt with phosphoric acid. **Chemical Communications**, n. 4, p. 419-421, 2007.

CHEN, X. et al. Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 3, p. 257-265, 2007.

CHENEY, M. L. et al. Supramolecular architectures of meloxicam carboxylic acid cocrystals, a crystal engineering case study. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 10, p. 4401-4413, 2010.

CHIARELLA, R. A.; DAVEY, R. J.; PETERSON, M. L. Making co-crystals: The utility of ternary phase diagrams. **Crystal Growth and Design**, v. 7, n. 7, p. 1223-1226, 2007.

CHILDS, S. L. et al. Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. **CrystEngComm**, v. 10, n. 7, p. 856-864, 2008.

CHIU, M. H.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of

macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39-59, 2011.

COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.

CROWELL, J. A. et al. Resveratrol-associated renal toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 2, p. 614-619, 2004.

CUADRA, I. A. et al. Pharmaceutical co-crystals of the anti-inflammatory drug diflunisal and nicotinamide obtained using supercritical CO₂ as an antisolvent. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 13, p. 29-37, 2016.

CUADRA, I. A. et al. Polymorphism in the co-crystallization of the anticonvulsant drug carbamazepine and saccharin using supercritical CO₂ as an anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 136, p. 60-69, 2018.

CUSTODIO, J. M.; WU, C.-Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition, absorption / elimination / transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 6, p. 717-733, 2008.

DAL MAGRO, C. et al. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **Journal of Supercritical Fluids**, 2017.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.

DAS, S.; DAS, D. K. Resveratrol: A therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 133-138, 2007.

DE GROOTE, D. et al. Effect of the intake of resveratrol, resveratrol phosphate, and catechin-rich grape seed extract on markers of oxidative stress and gene expression in adult obese subjects. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 1, p. 15-24, 2012.

DE LA LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1156-1160, 2007.

DESIRAJU, G. R. **Crystal engineering: The design of organic solids**. 1 edition. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. 312

DESIRAJU, G. R. Supramolecular synthons in crystal engineering—A new organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, n. 21, p. 2311-2327, 1995.

_____. Hydrogen bridges in crystal engineering: Interactions without borders. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 7, p. 565-573, 2002.

DIAZ-GEREVINI, G. T. et al. Beneficial action of resveratrol: How and why? **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 174-178, 2016.

DONOHUE, J. The hydrogen bond in organic crystals. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 502-510, 1952.

DOUILLET, J. et al. Development of a solvate as an active pharmaceutical ingredient: Developability, crystallisation and isolation challenges. **Journal of Crystal Growth**, v. 342, n. 1, p. 2-8, 2012.

EL-GIZAWY, S. A. et al. Aerosil as a novel co-crystal co-former for improving the dissolution rate of hydrochlorothiazide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 773-8, 2015.

ELBAGERMA, M. A. et al. Identification of a new cocrystal of citric acid and paracetamol of pharmaceutical relevance. **CrystEngComm**, v. 13, n. 6, p. 1877-1884, 2011.

ERRIGUIBLE, A. et al. Cocrystallization induced by compressed CO₂ as antisolvent: Simulation of a batch process for the estimation of nucleation and growth parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 194-203, 2015.

ERVASTI, T.; AALTONEN, J.; KETOLAINEN, J. Theophylline–nicotinamide cocrystal formation in physical mixture during storage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1–2, p. 121-130, 2015.

ETTER, M. C. Encoding and decoding hydrogen-bond patterns of organic compounds. **Accounts of Chemical Research**, v. 23, n. 4, p. 120-126, 1990.

_____. Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 12, p. 4601-4610, 1991.

F.D.A. **Guidance for industry - Regulatory classification of pharmaceutical co-crystals**: U.S. Department of Health and Human Services 2013.

FÁBIÁN, L. Cambridge structural database analysis of molecular complementarity in cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 3, p. 1436-1443, 2009.

FÁBIÁN, L. et al. Cocrystals of fenamic acids with nicotinamide. **Crystal Growth and Design**, v. 11, n. 8, p. 3522-3528, 2011.

FAGES, J. et al. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, n. 3, p. 219-226, 2004.

FRANCESCHI, E. et al. **Precipitação e encapsulamento de β - caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica**. 2009. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - Brasil.

FUKTE, S. R.; WAGH, M. P.; RAWAT, S. Cofomer selection: An important tool in cocrystal formation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 6, 2014.

GALLAGHER, P. M. et al. Gas antisolvent recrystallization: New process to recrystallize compounds insoluble in supercritical fluids. In: (Ed.). **Supercritical Fluid Science and Technology**: American Chemical Society, v.406, 1989. cap. 22, p.334-354. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412-1678-9.

GHANIM, H. et al. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum Cuspidatum* containing resveratrol. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 9, p. E1-E8, 2010.

GHANIM, H. et al. A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1409-1414, 2011.

GU, C.-H. et al. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 283, n. 1-2, p. 117-125, 2004.

HALEBLIAN, J.; MCCRONE, W. Pharmaceutical applications of polymorphism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 8, p. 911-929, 1969.

HARSCOAT-SCHIAVO, C. et al. Influence of isomerism on recrystallization and cocrystallization induced by CO₂ as an antisolvent. **CrystEngComm**, v. 17, n. 29, p. 5410-5421, 2015.

HE, C.-X.; HE, Z.-G.; GAO, J.-Q. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 445-460, 2010.

HE, H. et al. Modulating the dissolution and mechanical properties of resveratrol by cocrystallization. **Crystal Growth and Design**, v. 17, n. 7, p. 3989-3996, 2017.

HEGER, A. et al. Intake of a resveratrol-containing dietary supplement has no impact on DNA stability in healthy subjects. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 749, n. 1-2, p. 82-86, 2012.

HIENDRAWAN, S. et al. Simultaneous cocrystallization and micronization of paracetamol-dipicolinic acid cocrystal by supercritical antisolvent (sas). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 10, 2016.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Advances in analytical chemistry and instrumentation. In: WILEY-INTERSCIENCE (Ed.). **Phase-Solubility Techniques**. New York, v.4, 1965. p.117-212.

HILFIKER, R.; BLATTER, F.; RAUMER, M. **Polymorphism: In the pharmaceutical industry**. Weinheim, Germany: Wiley, 2006.

HINO, T.; FORD, J. L.; POWELL, M. W. Assessment of nicotinamide polymorphs by differential scanning calorimetry. **Thermochemica Acta**, v. 374, n. 1, p. 85-92, 2001.

HOWELLS, L. M. et al. Phase I randomised double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases - safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 4, n. 9, p. 1419-1425, 2011.

IMCHALEE, R.; CHAROENCHAITRAKOOL, M. Gas anti-solvent processing of a new sulfamethoxazole–l-malic acid cocrystal. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 12-15, 2015.

JAIN, A.; YANG, G.; YALKOWSKY, S. H. Estimation of melting points of organic compounds. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 23, p. 7618-7621, 2004.

JOHNSTON, K. P.; PENNINGER, J. M. L. **Supercritical fluid science and technology**. American Chemical Society, 1989. 564 ISBN 0-8412-1678-9.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, n. 3, p. 179-219, 2001.

KALRA, E. K. Nutraceutical-definition and introduction. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 3, p. 27-28, 2003.

KAVURU, P. et al. Hierarchy of supramolecular synthons: Persistent hydrogen bonds between carboxylates and weakly acidic hydroxyl moieties in cocrystals of zwitterions. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 8, p. 3568-3584, 2010.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 48-49, 1975.

KING, J. W. Modern supercritical fluid technology for food applications. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 5, p. 215-38, 2014.

KNUTSON, M. D.; LEEUWENBURGH, C. Resveratrol and novel potent activators of Sirt1: effects on aging and age-related diseases. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 10, p. 591, 2008.

KOTBANTAO, G.; CHAROENCHAITRAKOOL, M. Processing of ketoconazole–4-aminobenzoic acid cocrystals using dense CO₂ as an antisolvent. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 17, p. 213-219, 2017.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167-180, 2013.

LAKSHMI KUMAR, T. et al. Salts of hydrates of imiquimod, an immune response modifier. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 11, p. 4822-4829, 2009.

LALANDE, L. et al. Mathematical modeling and systems pharmacology of tuberculosis: Isoniazid as a case study. **Journal of Theoretical Biology**, v. 399, p. 43-52, 2016.

LEHN, J.-M. Supramolecular chemistry—Scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 27, n. 1, p. 89-112, 1988.

LI, J. et al. Preparation and characterization of pelletized solid dispersion of resveratrol with mesoporous silica microparticles to improve dissolution by fluid-bed coating techniques. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 528-535, 2016.

LU, E.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N.; SURYANARAYANAN, R. A rapid thermal method for cocrystal screening. **CrystEngComm**, v. 10, n. 6, p. 665-668, 2008.

MAIA, H. et al. Advantages of the association of resveratrol with oral contraceptives for management of endometriosis-related pain. **International Journal of Women's Health**, v. 4, p. 543-549, 2012.

MASHHADI, S. M. A. et al. Isoniazid cocrystals with anti-oxidant hydroxy benzoic acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1076, p. 446-452, 2014.

MASSÉ, G. et al. A simple method for SEM examination of sectioned diatom frustules. v. 204, n. 1, p. 87-92, 2001.

MIGUEL, F. et al. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, n. 3, p. 225-235, 2006.

MILLAR, D. I. A. et al. Crystal engineering of energetic materials: Co-crystals of CL-20. **CrystEngComm**, v. 14, n. 10, p. 3742-3749, 2012.

MIN-SOOK, J. et al. Bioavailability of indomethacin-saccharin cocrystals. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1560-1568, 2010.

MOHAMMAD, M. A.; ALHALAWEH, A.; VELAGA, S. P. Hansen solubility parameter as a tool to predict cocrystal formation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1, p. 63-71, 2011.

MUKHERJEE, S.; DUDLEY, J. I.; DAS, D. K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose-Response**, v. 8, n. 4, p. 478-500, 2010.

MÜLLERS, K. C.; PAISANA, M.; WAHL, M. A. Simultaneous formation and micronization of pharmaceutical cocrystals by rapid expansion of supercritical solutions (RESS). **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 2, p. 702-713, 2015.

MUREŞAN-POP, M. et al. Novel nutraceutical Myricetin composite of enhanced dissolution obtained by co-crystallization with acetamide. **Composites Part B: Engineering**, v. 89, p. 60-66, 2016.

NALAWADE, S. P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L. P. B. M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 1, p. 19-43, 2006.

NANGIA, A.; DESIRAJU, G. R. Supramolecular synthons and pattern recognition. In: WEBER, E.; AOYAMA, Y., *et al* (Ed.). **Design of Organic Solids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p.57-95. ISBN 978-3-540-69178-5.

NAUHA, E.; KOLEHMAINEN, E.; NISSINEN, M. Packing incentives and a reliable N-H[three dots, centered]N-pyridine synthon in co-crystallization of bipyridines with two agrochemical actives. **CrystEngComm**, v. 13, n. 21, p. 6531-6537, 2011.

NEHM, S. J.; RODRÍGUEZ-SPONG, B.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Phase solubility diagrams of cocrystals are explained by solubility product and solution complexation. **Crystal Growth and Design**, v. 6, n. 2, p. 592-600, 2006.

NEUROHR, C. et al. Challenge of the supercritical antisolvent technique SAS to prepare cocrystal-pure powders of naproxen-nicotinamide. **Chemical Engineering Journal**, v. 303, p. 238-251, 2016.

NEUROHR, C. et al. Naproxen–nicotinamide cocrystals: Racemic and conglomerate structures generated by CO₂ antisolvent crystallization. **Crystal Growth and Design**, v. 15, n. 9, p. 4616-4626, 2015.

NEUROHR, C. et al. Naproxen–nicotinamide cocrystals produced by CO₂ antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 78-85, 2013.

NEVES, A. R. et al. Resveratrol in medicinal chemistry: A critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1663-1681, 2012.

NEWMAN, A. Specialized solid form screening techniques. **Organic Process Research & Development**, v. 17, n. 3, p. 457-471, 2013.

NUTLEY, B. P.; FARMER, P.; CALDWELL, J. Metabolism of trans-cinnamic acid in the rat and the mouse and its variation with dose. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 10, p. 877-886, 1994.

OBER, C. A.; GUPTA, R. B. Formation of itraconazole–succinic acid cocrystals by gas antisolvent cocrystallization. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1396-1406, 2012.

OBER, C. A.; MONTGOMERY, S. E.; GUPTA, R. B. Formation of itraconazole/L-malic acid cocrystals by gas antisolvent cocrystallization. **Powder Technology**, v. 236, p. 122-131, 2013.

OGIENKO, A. G. et al. A new method of producing monoclinic paracetamol suitable for direct compression. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 12, p. 3116-3127, 2011.

OKAYA, Y.; SAITO, Y.; PEPINSKY, R. New method in X-ray crystal structure determination involving the use of anomalous dispersion. **Physical Review**, v. 98, n. 6, p. 1857-1858, 1955.

PADRELA, L. et al. Tuning physicochemical properties of theophylline by cocrystallization using the supercritical fluid enhanced atomization technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 129-136, 2014.

PADRELA, L. et al. Insight into the mechanisms of cocrystallization of pharmaceuticals in supercritical solvents. **Crystal Growth and Design**, v. 15, n. 7, p. 3175-3181, 2015.

PADRELA, L. et al. Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 53, n. 1–3, p. 156-164, 2010.

PADRELA, L. et al. Formation of indomethacin–saccharin cocrystals using supercritical fluid technology. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, p. 9-17, 2009.

PAL, S. et al. Thermal studies of furosemide–caffeine binary system that forms a cocrystal. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2261-2268, 2014.

PANZADE, P. et al. Pharmaceutical cocrystal of piroxicam: Design, formulation and evaluation. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 399-408, 2017.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 399-410, 2008.

PATEL, K. R. et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer research**, v. 70, n. 19, p. 7392-7399, 2010.

PATIL, S.; UJALAMBKAR, V.; MAHADIK, A. Electrospray technology as a probe for cocrystal synthesis: Influence of solvent and cofomer structure. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 217-222, 2017.

PAULO, L. et al. Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1533-1538, 2010.

PINDELSKA, E.; SOKAL, A.; KOLODZIEJSKI, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 111-146, 2017.

POPAT, R. et al. A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, v. 160, n. 5, p. 714-717, 2013.

PUJARA, N. et al. Enhanced colloidal stability, solubility and rapid dissolution of resveratrol by nanocomplexation with soy protein isolate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 303-308, 2017.

RAGER, T.; HILFIKER, R. Stability domains of multi-component crystals in ternary phase diagrams. **International journal of research in physical chemistry and chemical physics**, v. 223, n. 7, p. 793–813, 2009.

RAJESH GOUD, N.; KHAN, R. A.; NANGIA, A. Modulating the solubility of sulfacetamide by means of cocrystals. **CrystEngComm**, v. 16, n. 26, p. 5859-5869, 2014.

RAMALINGAM, S. et al. FT-IR and FT-Raman vibrational spectra and molecular structure investigation of nicotinamide: A combined experimental and theoretical study. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 5, p. 1552-1558, 2010.

RANDOLPH, T. W. Supercritical fluid extractions in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 78-82, 1990.

RAVIKUMAR, N.; GADDAMANUGU, G.; ANAND SOLOMON, K. Structural, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman) and theoretical studies of the 1:1 cocrystal of isoniazid with p-coumaric acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1033, p. 272-279, 2013.

REDDY, J. S. et al. Fluoroquinolone salts with carboxylic acids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 8, p. 3160-3176, 2011.

REDDY, J. S. et al. Synthesis, crystal structure, spectral characterization and fluorescence studies of salts of α -mangostin with APIs. **Journal of Molecular Structure**, v. 1039, p. 137-143, 2013.

REICHARDT, C. **Solvents and solvent effects in organic chemistry**. 3. Weinheim: WILEY-VCH, 2006. 653

REMENAR, J. F. et al. Crystal Engineering of Novel Cocrystals of a Triazole Drug with 1,4-Dicarboxylic Acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 28, p. 8456-8457, 2003.

ROMERO-PÉREZ, A. I. et al. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1533-1536, 1999.

SANPHUI, P. et al. Fast dissolving curcumin cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 11, n. 9, p. 4135-4145, 2011.

SAREEN, S.; MATHEW, G.; JOSEPH, L. Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 12-17, 2012.

SATO, M. et al. Myocardial protection by Protokin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. **Free Radical Research**, v. 32, n. 2, p. 135-144, 2000.

SCHMIDT, G. M. J. **Photodimerization in the solid state**. Pure and Applied Chemistry, 27: 647 p. 1971.

SCHULTHEISS, N.; BETHUNE, S.; HENCK, J.-O. Nutraceutical cocrystals: utilizing pterostilbene as a cocrystal former. **CrystEngComm**, v. 12, n. 8, p. 2436-2442, 2010.

SCHULTHEISS, N.; NEWMAN, A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 6, p. 2950-2967, 2009.

SCHULTHEISS, N.; ROE, M.; BOERRIGTER, S. X. M. Cocrystals of nutraceutical p-coumaric acid with caffeine and theophylline: polymorphism and solid-state stability explored in detail using their crystal graphs. **CrystEngComm**, v. 13, n. 2, p. 611-619, 2011.

SEKHON, B. S. Nutraceutical cocrystals: An overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 2, n. 2, p. 16-25, 2012.

SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 603-616, 2007.

SERRA, C. H. D. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 79-88, 2007.

SHAH, B.; KAKUMANU, V. K.; BANSAL, A. K. Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 8, p. 1641-1665, 2006.

SHAN, N.; ZAWOROTKO, M. J. The role of cocrystals in pharmaceutical science. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9–10, p. 440-446, 2008.

SHAYANFAR, A.; ASADPOUR-ZEYNALI, K.; JOUYBAN, A. Solubility and dissolution rate of a carbamazepine–cinnamic acid cocrystal. **Journal of Molecular Liquids**, v. 187, p. 171-176, 2013.

SHIKHAR, A. et al. Formulation development of Carbamazepine–Nicotinamide co-crystals complexed with γ -cyclodextrin using supercritical

fluid process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 1070-1078, 2011.

SMOLIGA, J.; BLANCHARD, O. Enhancing the delivery of resveratrol in humans: If low bioavailability is the problem, what is the solution? **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17154, 2014.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

SOWA, M.; SLEPOKURA, K.; MATCZAK-JON, E. Cocrystals of fisetin, luteolin and genistein with pyridinecarboxamide cofomers: crystal structures, analysis of intermolecular interactions, spectral and thermal characterization. **CrystEngComm**, v. 15, n. 38, p. 7696-7708, 2013.

STAHL, P. H.; WERMUTH, C. G. **Pharmaceutical salts: properties, selection, and use**. 2. New York: VHCA ; Wiley-VCH: Weinheim, 2011. ISBN 978-3-90639-051-2.

STAHLY, G. P. Diversity in single- and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 7, n. 6, p. 1007-1026, 2007.

STARMANS, D. A. J.; NIJHUIS, H. H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 6, p. 191-197, 1996.

STEINER, T. The hydrogen bond in the solid state. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 1, p. 48-76, 2002.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79-89, 2001.

SWAPNA, B.; MADDILETI, D.; NANGIA, A. Cocrystals of the Tuberculosis Drug Isoniazid: Polymorphism, Isostructurality, and Stability. **Crystal Growth & Design**, v. 14, n. 11, p. 5991-6005, 2014.

TAKAOKA, M. The Phenolic Substances of white Hellebore (*Veratrum Grandiflorum* Loes fil.) II
Oxyresveratrol. **Nippon Kagaku Kaishi**, v. 60, n. 12, p. 1261-1264, 1939.

TANG, P. C.-T. et al. Resveratrol and cardiovascular health – Promising therapeutic or hopeless illusion? **Pharmacological Research**, v. 90, p. 88-115, 2014.

TIAGO, J. M. et al. Single-step co-crystallization and lipid dispersion by supercritical enhanced atomization. **Crystal Growth and Design**, v. 13, n. 11, p. 4940-4947, 2013.

TOMÉ-CARNEIRO, J. et al. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 110, n. 3, p. 356-363, 2012.

TRASK, A. V.; JONES, W. Crystal engineering of organic cocrystals by the solid-state grinding approach. In: TODA, F. (Ed.). **Organic Solid State Reactions: -/-. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p.41-70. ISBN 978-3-540-31462-2.**

TRASK, A. V.; MOTHERWELL, W. D. S.; JONES, W. Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 320, n. 1–2, p. 114-123, 2006.

TREMAYNE, M. The impact of powder diffraction on the structural characterization of organic crystalline materials. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 362, n. 1825, p. 2691, 2004.

UDENIGWE, C. C. et al. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 8, p. 445-454, 2008.

VASISHT, K. et al. Enhancing biopharmaceutical parameters of bioflavonoid quercetin by cocrystallization. **CrystEngComm**, v. 18, n. 8, p. 1403-1415, 2016.

VEVERKA, M. et al. Edaravone cocrystals: synthesis, screening, and preliminary characterization. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 144, n. 9, p. 1335-1349, 2013.

WANG, G.; HUANG, Y. Theoretical study on the co-crystal composed of poly(diiododiacetylene) and bis(nitrile) oxalamide. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 68, n. 10, p. 2003-2007, 2007.

WANG, L. et al. Pharmaceutical cocrystals of diflunisal with nicotinamide or isonicotinamide. **Organic Process Research and Development**, v. 17, n. 11, p. 1413-1418, 2013.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage carcinogenesis. In: (Ed.). **Cancer Medicine**. 6°. BC Decker: Hamilton, 2003.

WICHIANPHONG, N.; CHAROENCHAITRAKOOL, M. Statistical optimization for production of mefenamic acid–nicotinamide cocrystals using gas anti-solvent (GAS) process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, p. 375-382, 2018.

WOHLRAB, J.; KREFT, D. Niacinamide - mechanisms of action and its topical use in dermatology. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 6, p. 311-315, 2014.

WU, T.-K. et al. Simultaneous DSC-FTIR microspectroscopy used to screen and detect the co-crystal formation in real time. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p. 3148-3151, 2011.

YADAV, A. V. et al. Co-crystals: A novel approach to modify physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 4, p. 359-370, 2009.

YEO, S.-D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 3, p. 287-308, 2005.

ZHANG, Y.-N. et al. Preparation of a 1:1 cocrystal of genistein with 4,4'-bipyridine. **Journal of Crystal Growth**, v. 458, p. 103-109, 2017.

ZHOU, Z. et al. Identification of new cocrystal systems with stoichiometric diversity of salicylic acid using thermal methods. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 4, p. 1030-1039, 2016.

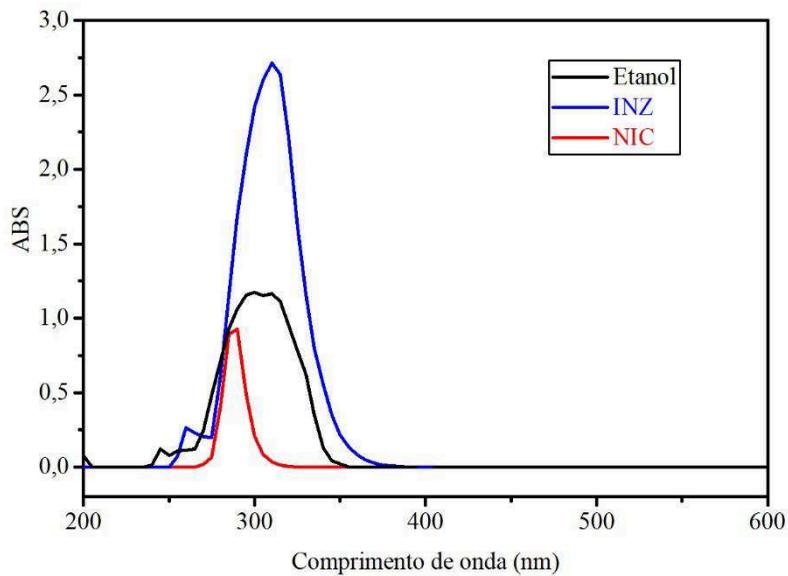
ZHOU, Z. et al. Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tableability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509, n. 1–2, p. 391-399, 2016.

ZHU, W. et al. Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 3, p. 393-400, 2012.

ZUPANČIČ, Š.; LAVRIČ, Z.; KRISTL, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 196-204, 2015.

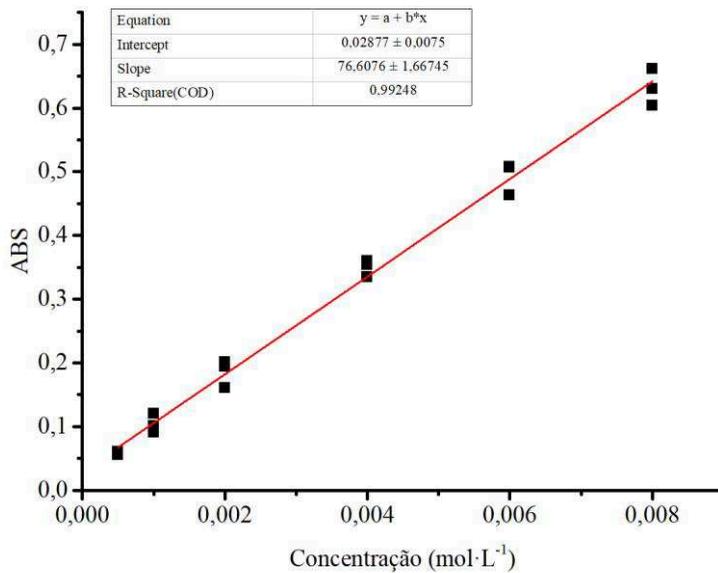
APÊNDICE A

Figura 7.1 – Varredura para avaliar a sobreposição dos espectros UV-Vis do RES, INZ e NIC.



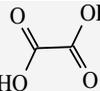
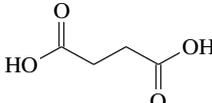
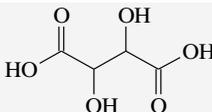
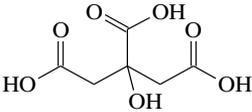
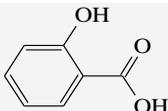
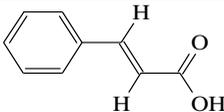
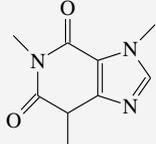
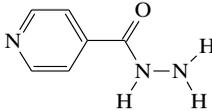
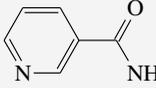
APÊNDICE B

Figura 7.2 – Curva de calibração média do RES obtida por espectrofotometria UV.



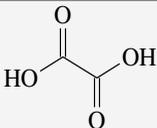
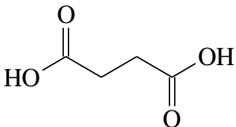
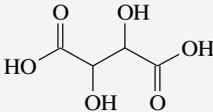
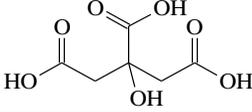
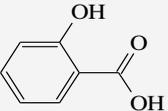
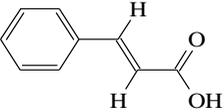
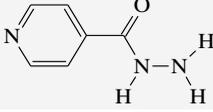
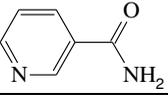
APÊNDICE C

Quadro 7.1 – Resultado do *screening* utilizando etanol como solvente

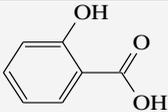
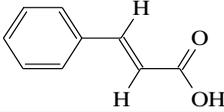
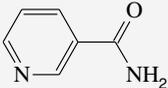
Coformador	Estrutura molecular	Razão molar (res:coformador)	Resultado
Ácido oxálico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
		2:1	Mistura física
Ácido succínico		1:1	Mistura física
Ácido tartárico		1:1	Mistura física
Ácido cítrico		1:1	Precipitou RES
		1:2	Mistura física
Ácido salicílico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
Ácido cinâmico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
		1:3	Mistura física
Cafeína		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
Isoniazida		1:1	Cocrystal
Nicotinamida		1:1	Cocrystal
		1:2	Cocrystal *
		1:3	Cocrystal *
		1:4	Mistura física
		2:1	Mistura física

* Os cocristais foram obtidos na razão 1:1.

Quadro 7.2 – Resultado do *screening* utilizando acetona como solvente

Coformador	Estrutura molecular	Razão molar (res:coformador)	Resultado
Ácido oxálico		1:1	Mistura física
Ácido succínico		1:1	Mistura física
Ácido tartárico		1:1	Mistura física
Ácido cítrico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
Ácido salicílico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
Ácido cinâmico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
		1:3	Mistura física
Isoniazida		1:1	Não ocorreu precipitação
Nicotinamida		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
		1:3	Mistura física

Quadro 7.3 – Resultado do *screening* utilizando acetato de etila como solvente.

Coformador	Estrutura molecular	Razão molar (res:coformador)	Resultado
Ácido salicílico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
Ácido cinâmico		1:1	Mistura física
		1:2	Mistura física
		1:3	Mistura física
Nicotinamida		1:1	Precipitou apenas RES

Obs.: apenas aqueles que se dissolveram em acetato de etilo foram testados.

APÊNDICE D

Tabela 7.1 – Análise de variância dos resultados obtidos para eficiência de dissolução do RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em tampão de fosfato (PBS) pH 6,8.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	47,6069	2	23,8034	684	$8,329 \cdot 10^{-8}$
Dentro dos grupos	0,20881	6	0,03480		
Total	47,8157	8			

SQ – Soma dos Quadrados; gl – graus de liberdade; MQ – Média Quadrática; F – Teste de Fisher.

Tabela 7.2 – Análise de variância dos resultados obtidos para eficiência de dissolução do RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em água destilada.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	30,8177	2	15,4088	60,8	0,000104
Dentro dos grupos	1,52058	6	0,25343		
Total	32,3382	8			

SQ – Soma dos Quadrados; gl – graus de liberdade; MQ – Média Quadrática; F – Teste de Fisher.

Tabela 7.3 – Análise de variância dos resultados obtidos para eficiência de dissolução do RES, RES-NIC (LAS) e RES-NIC (GAS) em solução $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 1,2).

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	103,575	2	51,7877	340,7	$6,648 \cdot 10^{-7}$
Dentro dos grupos	0,91191	6	0,15199		
Total	104,487	8			

SQ – Soma dos Quadrados; gl – graus de liberdade; MQ – Média Quadrática; F – Teste de Fisher.

ANEXO A

Certificado de análise do trans-resveratrol emitido pelo fabricante
Jiaherb Phytochem – Xi'an, China



JIAHERB[®]
Phytochem

Shaanxi Jiabao Phytochem Co., Ltd. Tel:0086-29-88344365 Fax:0086-29-88323510
A-6th floor, No.16 Jinye 1st Road, Xi'an, China 710077
Http://www.jiaherb.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Resveratrol 99% Resveratrol(HPLC)

Batch No.: Chz20150504 Manufacture Date: 20150504 Expiry Date: 20180503

General Information			
Part Used	Root	Solvents Used	Water&Ethanol
Botanical Source	<i>Polygonum cuspidatum</i>	Country Of Origin	China
ITEMS	SPECIFICATION	METHOD	TEST RESULTS
Physical&Chemical Data			
Color	Creamy	Organoleptic	Conform
Odour	characteristic	Organoleptic	Conform
Appearance	Fine Powder	Organoleptic	Conform
Analytical Quality			
Identification	Identical to <i>R.S.</i> sample	HPTLC	Identical
Resveratrol	≥99.0%	HPLC(on anhydrous basis)	99.10%
Sieve analysis	100 % through 80 mesh	USP36<786>	Conform
Water(KF)	≤2.0 %	Eur.Ph.7.0 [2.5.12]	0.25%
Total Ash	≤1.0 %	Eur.Ph.7.0 [2.4.16]	0.07%
Contaminants			
Lead (Pb)	≤3.0 mg/kg	Eur.Ph.7.0<2.2.58> ICP-MS	0.0412 mg/kg
Arsenic (As)	≤2.0 mg/kg	Eur.Ph.7.0<2.2.58> ICP-MS	<0.01 mg/kg
Cadmium (Cd)	≤1.0 mg/kg	Eur.Ph.7.0<2.2.58> ICP-MS	<0.01 mg/kg
Mercury (Hg)	≤0.1 mg/kg	Eur.Ph.7.0<2.2.58> ICP-MS	0.0279 mg/kg
Solvents Residue	Meet Eur.Ph.7.0 <5.4>	Eur.Ph.7.0<2.4.24>	Conform
Ethanol	<5000ppm		Conform
Methanol	<3000ppm		Conform
Pesticides Residue	Meet USP Requirements	USP36<561>	Conform
Microbiological			
Total Plate Count	≤1000 cfu/g	USP36<61>	Conform
Yeast & Mold	≤100 cfu/g	USP36<61>	Conform
E.Coli	Negative	USP36<62>	Conform
Salmonella	Negative	USP36<62>	Conform
Packing&Storage			
	Packed in paper-drums and two plastic-bags inside. N.W:25kgs, I.D.35×H51cm.		
	Store in a well-closed container. Away from moisture, light, oxygen.		
	36 months under the conditions above and in its original packaging.		
Shelf life			
Manufacturer			
	Shaanxi Jiabao Phytochem Co., Ltd. Xi'an, P.R. China.		

Quality Assurance Officer



No: STP-QCP-02> (812)

ANEXO B

Certificado de análise do trans-resveratrol emitido pelo fornecedor
SM Empreendimentos – São Paulo, Brasil



CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:		RESVERATROL		Pag 1			
ORIGEM/PROCEDENCIA:		CHINA/CHINA		DATA DE ANÁLISE:			
LOTE INTERNO:		1509957		04/08/2015			
DATA DE FABRICAÇÃO:		Maio/2015		LOTE FABRICANTE:			
CAS:		501-38-0		CHZ20150504			
				DATA DE VALIDADE:			
				Maio/2018			
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA AMBIENTE							
OBS 1: Nome da planta: Polygonum cuspidatum Sieb.							
OBS 2: Solventes utilizados: Água e Etanol							
OBS 3: Parte utilizada: Raiz							
DATA DE EMISSÃO:		NF: 1000.000		ORDEN FRACIONAMENTO:			
00/00/0000				150834308			
				DATA ENC: 04/08/2015			
TESTES		ESPECIFICAÇÕES		RESULTADOS		REFERÊNCIAS	
Descrição*		Pó fino creme, com odor característico		Pó fino creme, com odor característico		Fabricante	
Identificação		HPTLC		Conforme		Fabricante	
Umidade*		≤ 2,0%		0,14%		Fabricante	
Cinzas totais*		≤ 1,0%		0,24%		Fabricante	
Chumbo		≤ 3,0 mg/Kg		0,0412 mg/Kg		Fabricante	
Arsênio		≤ 2,0 mg/Kg		< 0,01 mg/Kg		Fabricante	
Cádmio		≤ 1,0 mg/Kg		< 0,01 mg/Kg		Fabricante	
Mercúrio		≤ 0,1 mg/Kg		0,0279 mg/Kg		Fabricante	
Solvente residual*		Etanol < 5000 ppm		2034,92 ppm		Fabricante	
		Metanol < 3000 ppm		345,07 ppm			
Pesticida residual		Conforme		Conforme		Fabricante	
Teor (base anidra)*		Resveratrol ≥ 99,0%		100,38%		Fabricante	
Granulometria		Passa 100% na malha 80		Conforme		Fabricante	
TESTES MICROBIOLÓGICOS							
Contagem total de bactérias*		≤ 1000 UFC/g		< 10 UFC/g		Fabricante	
Fungos e leveduras*		≤ 100 UFC/g		< 10 UFC/g		Fabricante	
Escherichia coli*		Negativo		Negativo		Fabricante	
Salmonella*		Negativo		Negativo		Fabricante	
TESTES ADICIONAIS							
Densidade aparente*		Informativo (sem compactação)		0,40 g/mL		Mét. Geral FB V	

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopelco) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como Informativo pelo LCQ SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA).

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Retornado


Responsável Técnico Substituto
Divina Naveira Mesquita Mendes - CRF-GO N° 5237


Responsável Técnico
João Paulo Sartori Mendes - CRF-GO: 7355


Laís Caroline de Oliveira Costa
Farmacêutica
CRF: 74.121