



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Camila Dal Magro

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE CURCUMINA E
RESVERATROL UTILIZANDO TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA**

FLORIANÓPOLIS
2023

Camila Dal Magro

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE CURCUMINA E
RESVERATROL UTILIZANDO TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lanza

Coorientadores: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira
Dr. Gean Pablo Silva Aguiar

Florianópolis

2023

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

Dal Magro, Camila

Produção e caracterização de cocristais de curcumina e resveratrol utilizando tecnologia supercrítica / Camila Dal Magro ; orientador, Marcelo Lanza, coorientador, José Vladimir de Oliveira, coorientador, Gean Pablo Silva Aguiar, 2023.

112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Compostos bioativos. 3. Tecnologia supercrítica. 4. Formação de partículas. 5. Cocristais. I. Lanza, Marcelo. II. Oliveira, José Vladimir de. III. Aguiar, Gean Pablo Silva IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Camila Dal Magro

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE CURCUMINA E
RESVERATROL UTILIZANDO TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Marcelo Lanza - Presidente - UFSC

Prof. Dr. Alcidênio Soares Pessoa - Membro Externo - Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano

Prof^a. Dr^a. Liz Girardi Müller - Membro Externo - Universidade Comunitária da Região
de Chapecó

Dr. Evertan Antônio Rebelatto - Membro Interno - PPGEAL - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak
Sub-coordenadora do Programa

Prof. Dr. Marcelo Lanza
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, pelo conhecimento que me possibilitou alcançar, pelas pessoas e condições que colocou em meu caminho que contribuíram de alguma forma para que esta tese se concretizasse.

A meus orientadores, Prof. Dr. Marcelo Lanza, Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira e Dr. Gean Pablo Silva Aguiar, por aceitarem seguir ao meu lado no doutorado, pelo comprometimento, ensinamentos, compreensão e apoio nesta etapa importante de minha formação.

À Profa. Dra. Liz Girardi Müller e ao Departamento de Ciências Ambientais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), pela parceria e colaboração na realização dos testes comportamentais.

Ao Prof. Dr. Adailton José Bortoluzzi do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela parceria e colaboração na realização das análises de DRXP e interpretação dos resultados.

A meu companheiro Zeno, pelo apoio incansável ao longo destes anos, pela compreensão nas horas em que não estive presente, pelo incentivo e amor que reabasteceram minhas forças em muitos momentos.

Aos meus filhos Augusto e Isabel (*In memoriam*), razão maior de minha existência, minha fonte inesgotável de motivação e inspiração para buscar meu melhor.

A meus pais Rui e Terezinha e minha irmã Letícia, pelos ensinamentos e valores repassados, pelo amor, apoio e esforço para que eu sempre alcançasse meus objetivos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da UFSC, de modo especial, a Jônatas, Evertan, Marcela Ribas, Alessandro, Guilherme, Patrícia Oliveira e Marcel, pelo auxílio nos experimentos, pela troca de conhecimentos e experiências, e a todos pelo carinho e companheirismo.

À minha amiga Aline Elias, pela parceria e auxílio diários desde o mestrado, por todas as contribuições técnicas, troca de conhecimento, companheirismo, apoio e escuta nos momentos mais exigentes.

A minhas amigas Heloísa, Talyta, Adriana e Rafaela, pelo carinho e apoio mesmo a quilômetros de distância.

Aos alunos de iniciação científica Roberto, Nicolas, Davi e Luan, pelo auxílio na execução de experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho. A todos os professores, pelos ensinamentos repassados. Ao secretário Fernando, pela dedicação e auxílio em tantas demandas.

À Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, em especial aos técnicos Leandro e Fernanda, Central de Análises do Departamento de Química, Laboratório Multiusuário em Alimentos (MULTIALI) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) e Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, pelas análises realizadas.

À banca examinadora do exame de qualificação e da defesa da tese, pela disponibilidade, atenção e valorosas contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“É justo que muito custe o que muito vale.”
(Santa Tereza D’Ávila)

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Produção e caracterização de cocristais de curcumina e resveratrol utilizando tecnologia supercrítica

O quê?

Cocristais de compostos bioativos de interesse nas indústrias de alimentos e farmacêutica, produzidos por meio de tecnologia supercrítica, visando potencialização de suas propriedades biológicas.

Por quê?

- Melhorar o perfil de dissolução de compostos pouco solúveis em soluções aquosas;
- Aumentar a biodisponibilidade por meio da melhora na solubilidade dos compostos;
- Aproveitar a possibilidade de efeito sinérgico entre compostos bioativos por meio da formação de cocristais princípio ativo-princípio ativo;
- Cocrystalização utilizando fluido supercrítico é uma alternativa às técnicas tradicionais, ambientalmente amigável e que fornece produtos livres de solvente residual.

Quem já fez?

- Consta na literatura trabalhos de produção de cocristais de curcumina ou de resveratrol com diferentes coformadores que resultam em melhora de propriedades físico-químicas, mas os efeitos nas propriedades biológicas ainda são pouco explorados;
- Ainda não há trabalhos que reportem a produção de cocristais princípio ativo-princípio ativo de curcumina e resveratrol;
- Os trabalhos existentes referentes à produção de cocristais de resveratrol e L-prolina foram conduzidos utilizando técnicas convencionais e não resultaram em melhora na dissolução em água do composto ativo.

Hipótese

- É possível produzir cocristais de curcumina-resveratrol utilizando tecnologia supercrítica?
- Os cocristais produzidos apresentarão melhores propriedades *in vitro* e *in vivo* comparados aos compostos puros e à mistura física dos compostos?
- A utilização de tecnologia supercrítica possibilita produzir cocristais de estrutura já conhecida, mas com propriedades físico-químicas e biológicas diferentes?
 - É possível reduzir a dose mínima efetiva de compostos ativos por meio da cocrystalização, obtendo o mesmo efeito?

Como fazer?

- Estudar o processo de cocrystalização;
- Avaliar as propriedades de dissolução, ponto de fusão, atividade antioxidante e solvente residual;
 - Avaliar os cocristais em modelo animal a fim de verificar o efeito antinociceptivo/anti-inflamatório em comparação aos compostos puros e sua mistura física.

Resultados esperados

- Produzir cocristais princípio ativo-princípio ativo de curcumina e resveratrol;
 - Melhorar o perfil de dissolução *in vitro* dos compostos;
 - Potencializar a atividade antioxidante e antinociceptiva/anti-inflamatória da curcumina e do resveratrol;
 - Diminuir a dosagem da curcumina frente aos testes *in vivo*;
- Aumentar a dissolução e capacidade antioxidante *in vitro* do resveratrol por meio de sua cocrystalização com L-prolina por meio de tecnologia supercrítica.

RESUMO

Compostos bioativos como curcumina e resveratrol têm sido apontados como agentes com potencial para prevenção e tratamento de diversas doenças, em substituição a compostos sintéticos que apresentam ação limitada. No entanto, ambos apresentam baixa solubilidade em meio aquoso e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade, o que limita sua aplicação em larga escala. A cocristalização é um processo capaz de modificar propriedades físico-químicas de compostos ativos por meio da ocorrência de forças intermoleculares entre os coformadores bem como pela possível modificação em sua matriz cristalina. Este trabalho tem como objetivo produzir cocristais de curcumina e resveratrol por meio de tecnologia supercrítica, visando melhorar o perfil de dissolução de seus componentes e potencializar suas atividades biológicas. O processo de confirmação da obtenção de cocristal se deu por meio de caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raios-x de pó (DRXP) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Foram obtidos cocristais de curcumina-resveratrol por meio da técnica de cocristalização com solvente supercrítico (CSS) utilizando acetona como cossolvente e cocristais de resveratrol-L-prolina por meio do método gás antissolvente (GAS). O processo CSS possibilitou alcançar melhora na dissolução do cocristal em comparação aos compostos puros, maior atividade antioxidante *in vitro* e maior potencial antinociceptivo/anti-inflamatório, observado por meio de testes comportamentais com camundongos. Da mesma forma, a cocristalização por GAS resultou em melhora do perfil de dissolução do resveratrol e de sua capacidade antioxidante *in vitro* em comparação ao resveratrol puro e à mistura física de resveratrol-L-prolina. As alterações observadas provavelmente estão relacionadas às modificações na estrutura cristalina dos compostos, sugerindo melhora em sua biodisponibilidade, o que fornece aos cocristais um bom potencial para utilização nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: compostos bioativos; tecnologia supercrítica; dissolução; antioxidante; anti-inflamatório.

ABSTRACT

Bioactive compounds such as curcumin and resveratrol have been appointed to have potential for prevention and treatment of several diseases, replacing synthetic compounds with limited action. However, both present low aqueous solubility and, consequently, low bioavailability, which limits their application on a large scale. Cocrystallization is a process that can modify the physicochemical properties of active compounds by the occurrence of intermolecular forces between them and possible modifications in the crystalline matrix. This research aims to produce curcumin and resveratrol cocrystals using supercritical technology, intending to improve the dissolution rate and to enhance the biological activity of the components. The confirmation of cocrystal production was performed by characterization employing differential scanning calorimetry (DSC), x-ray powder diffraction (XRPD), and Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR). Successful cocrystallization of curcumin-resveratrol was achieved by cocrystallization with supercritical solvent (CSS) using acetone as co-solvent, and cocrystallization of resveratrol-L-proline by the gas antisolvent (GAS) technique. CSS process resulted in higher cocrystal dissolution in comparison to pure compounds, better antioxidant activity *in vitro*, and better antinociceptive/anti-inflammatory potency, observed by behavioral tests in mice. In the same way, the dissolution profile and antioxidant capacity of resveratrol were enhanced by cocrystallization with L-proline via the GAS method, in comparison to pure compound and resveratrol-L-proline physical mixture. The changes observed probably are related to alterations in the crystalline structure, suggesting improvements in their bioavailability, which gives the cocrystals good potential for use in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: bioactive compounds; supercritical technology; dissolution; antioxidant; anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tautômeros da curcumina (a) ceto-enol e (b) di-ceto	28
Figura 2 - Estrutura química dos isômeros (a) trans-resveratrol e (b) cis-resveratrol	31
Figura 3 - Estrutura química da L-prolina	32
Figura 4 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para síntese de cocristais em meio supercrítico	43
Figura 5 - DSC da curcumina, resveratrol e das amostras CUR-RES produzidas por LAG com acetato de etila, acetona e etanol.....	56
Figura 6 - DSC da curcumina, resveratrol e das amostras CUR-RES produzidas por evaporação lenta com acetato de etila, acetona e etanol	57
Figura 7 - DSC da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por CSS	58
Figura 8 - DSC da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por GAS	60
Figura 9 - DRXP da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por CSS	61
Figura 10 - DRXP da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por GAS	63
Figura 11 - FTIR da curcumina, resveratrol e das amostras CUR-RES produzidas por CSS.....	64
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da (a) curcumina, (b) resveratrol, (c) amostras produzidas por CSS, (d) CSS com acetato de etila, (e) com acetona e (f) com etanol.....	66
Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da (a) curcumina, (b) resveratrol, (c) amostras produzidas por GAS com acetato de etila, (d) acetona e (e) etanol	67
Figura 14 – Distribuição normal de tamanho de partícula da curcumina (laranja), resveratrol (preto), amostra processada por CSS sem cossolvente (verde claro), CSS-acetato de etila (azul claro), CSS-acetona (rosa), CSS-etanol (azul escuro), GAS-acetato de etila (verde escuro), GAS-acetona (amarelo) e GAS-etanol (marrom).	68

Figura 15 - Solubilidades da curcumina e resveratrol puros e do cocrystal CUR-RES, em relação a cada componente, em diferentes solventes.	71
Figura 16 - Perfil de dissolução da curcumina (▲), do cocrystal CUR-RES (●) e da mistura física CUR-RES (▼) em água deionizada, 37 °C. Os valores referem-se às médias e as barras de erro representam o desvio padrão, n=3	74
Figura 17 - Perfil de dissolução do resveratrol (■), do cocrystal CUR-RES (●) e da mistura física CUR-RES (▲) em água deionizada, 37 °C. Os valores referem-se às médias e as barras de erro representam o desvio padrão, n=3	75
Figura 18 - Efeito antinociceptivo do cocrystal CUR-RES em camundongos. Os animais foram tratados oralmente com veículo (água destilada, 10 mL·kg ⁻¹), indometacina (10 mg·kg ⁻¹), curcumina (50 mg·kg ⁻¹ ou 0,31 mg·kg ⁻¹), resveratrol (0,19 mg·kg ⁻¹), mistura física de curcumina (0,31 mg·kg ⁻¹) + resveratrol (0,19 mg·kg ⁻¹) ou cocrystal CUR-RES (0,5 mg·kg ⁻¹). Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Análise de variância simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, *** P < 0,001 diferente do grupo controle	77
Figura 19 - Efeito antinociceptivo do cocrystal CUR-RES em camundongos no teste de campo aberto. Os animais foram tratados oralmente com veículo (água destilada, 10 mL·kg ⁻¹) ou cocrystal curcumina-resveratrol (0,5 mg·kg ⁻¹). Dados expressos como média ± desvio padrão. Teste-t não pareado (Mann-Whitney).....	78
Figura 20 – DSC do resveratrol, L-prolina, mistura física dos compostos e da amostra RES-PRO produzida por GAS.....	81
Figura 21 – DRXP do resveratrol, L-prolina, amostra RES-PRO obtida por GAS e padrão de DRXP simulado a partir de dados de raio-X de monocristal.....	82
Figura 22 – FTIR do resveratrol, L-prolina, cocrystal RES-PRO produzido por GAS e mistura física dos compostos.....	83
Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura do (a) resveratrol, (b) L-prolina, (c) cocrystal RES-PRO com magnitude de 500x e (d) com magnitude de 1000x.....	85
Figura 24 – Distribuição normal de tamanho de partícula do resveratrol (verde), L-prolina (preto) e cocrystal RES-PRO (vermelho).....	86
Figura 25 – Perfil de dissolução <i>in vitro</i> do (▲) resveratrol, (●) cocrystal RES-PRO e (■) mistura física em água destilada a 37 °C. Os valores representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão, n=3.....	88
Figura 26 – Curva de calibração para quantificação de ppm residual de etanol.....	104

Figura 27 - Curva de calibração média da curcumina obtida por espectrofotometria UV em 435 nm	105
Figura 28 - Curva de calibração média do resveratrol obtida por espectrofotometria UV em 326 nm	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de operação de CG-FID	50
Tabela 2 – Valores de EC ₅₀ obtidos para curcumina e resveratrol puros, para a mistura física dos compostos, para as amostras processadas por meio das técnicas CSS e GAS e para o BHT, utilizado como padrão.....	70
Tabela 3 - Valores de EC ₅₀ do resveratrol, cocrystal RES-PRO e mistura física	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade antioxidante

Abs_{amostra} – Absorbância da amostra no teste de capacidade antioxidante

Abs_{branco} – Absorbância do branco no teste de capacidade antioxidante

Abs_{controle} – Absorbância do controle no teste de capacidade antioxidante

BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica (*Biopharmaceutic Classification System*)

BHT - Butilhidroxitolueno

CCB – Centro de Ciências Biológicas

CG-FID – Cromatografia gasosa acoplada a ionizador de chama

CO₂ – Dióxido de carbono

CSS – Cocrystalização com Solvente Supercrítico

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DRXP – Difração de Raio-X de Pó

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

EC₅₀ – Mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH

FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

GAS – Método Gás Antissolvente

GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro (*Generally Recognized as Safe*)

i.p. – Injeção intraperitoneal

LAG – Moagem Assistida por Líquido (*Liquid Assisted Grinding*)

LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica

LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MULTIALI – Laboratório Multiusuário de Estudos em Alimentos

P_c – Pressão crítica

p.o. – Via oral

PTZ – Pentilenotetrazol

SEDS – Dispersão da Solução Aumentada por Fluido Supercrítico

T_c – Temperatura crítica

UNOCHAPECÓ – Universidade Comunitária da Região de Chapecó
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo geral.....	24
1.1.2 Objetivos específicos.....	24
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 CURCUMINA.....	26
2.2 RESVERATROL.....	29
2.3 L-PROLINA.....	31
2.4 COCRISTAIS.....	32
2.5 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS UTILIZANDO FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	35
2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	37
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 MATERIAS	41
3.2 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS A BAIXA PRESSÃO.....	42
3.2.1 Moagem assistida por líquido (<i>Liquid Assisted Grinding – LAG</i>).....	42
3.2.2 Evaporação lenta do solvente.....	42
3.3 SÍNTESE DE COCRISTAIS UTILIZANDO FLUIDO SUPERCRÍTICO	42
3.3.1 Unidade experimental.....	42
3.3.2 Cocrystalização com solvente supercrítico (CSS).....	45
3.3.3 Gás antissolvente (GAS).....	45
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	46
3.4.1 Análise térmica.....	47
3.4.2 Difração de raio-X de pó (DRXP).....	47
3.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)...	47
3.4.4 Morfologia e determinação da distribuição do tamanho de partícula.....	48

3.4.5	Determinação da capacidade de inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	48
3.4.6	Identificação e quantificação de solvente residual.....	49
3.4.7	Análise de solubilidade	51
3.4.8	Perfil de dissolução <i>in vitro</i>.....	51
3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS	52
3.5.1	Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	52
3.5.2	Teste de campo aberto.....	53
3.5.3	Análise estatística dos testes <i>in vivo</i>.....	53

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS I

	Produção de cocrystal de curcumina-resveratrol utilizando cocrystalização com solvente supercrítico	55
4.1	ANÁLISE TÉRMICA	56
4.2	DIFRAÇÃO DE RAIO-X DE PÓ (DRXP)	60
4.3	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	63
4.4	MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA	65
4.5	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)	69
4.6	ANÁLISE DE SOLUBILIDADE	71
4.7	PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	73
4.8	TESTES COMPORTAMENTAIS	76
4.9	CONCLUSÃO	79

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS II

	Produção e caracterização de cocrystal de resveratrol e L-prolina pelo método gás antissolvente	80
5.1	ANÁLISE TÉRMICA	80

5.2	DIFRAÇÃO DE RAIO-X DE PÓ (DRXP)	81
5.3	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	83
5.4	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL.....	84
5.5	MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA	84
5.6	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH ..	87
5.7	PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	88
5.8	CONCLUSÃO	89
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ...		90
6.1	CONCLUSÕES	90
6.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
CAPÍTULO 7 – PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO		92
7.1	TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICO	92
7.2	TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO	93
REFERÊNCIAS		94
APÊNDICE A – Curva de calibração construída por CG-FID para determinação de solvente residual		104
APÊNDICE B – Curvas de calibração para determinação da concentração de curcumina e resveratrol		105
ANEXO A – Especificação técnica e laudo de análise da curcumina emitidos pelo fornecedor Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda		107
ANEXO B – Certificado de análise do resveratrol emitido pelo fornecedor SM Empreendimentos – São Paulo, Brasil		109
ANEXO C – Certificado de análise do resveratrol emitido pelo fornecedor Active Pharmaceutica		110
ANEXO D - Certificado de aprovação dos estudos <i>in vivo</i> pelo Comitê de Ética		112

ORGANOGRAMA DO DOCUMENTO DE TESE

A presente tese de doutorado foi organizada em capítulos. O Capítulo 1 apresenta a introdução e os objetivos do trabalho, trazendo uma breve revisão sobre os temas abordados. No Capítulo 2, aborda-se uma revisão bibliográfica com respeito a temas relevantes para a compreensão da tese. O terceiro capítulo mostra a descrição dos materiais e métodos utilizados. Os resultados do trabalho foram divididos nos Capítulos 4 e 5. O Capítulo 6 apresenta as conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros. No Capítulo 7 encontram-se as produções científicas obtidas ao longo do desenvolvimento da tese. Por fim, os apêndices A e B apresentam os materiais suplementares da tese e os Anexo A, B, C e D apresentam os laudos técnicos dos compostos bioativos utilizados e certificação de aprovação dos estudos com animais pelo Comitê de Ética.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Compostos polifenólicos de origem vegetal, caracterizados pela presença de ao menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas, são metabólitos secundários não voláteis das plantas, nutrientes não essenciais, mas que exercem importantes funções benéficas a elas (RAMIREZ et al., 2017). Estes compostos têm atraído o interesse das indústrias de alimentos, química e farmacêutica por apresentarem propriedades biológicas promissoras, como elevada atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, entre outras, que costumam estar associadas à prevenção e tratamento de diversas doenças.

Para a indústria de alimentos, os polifenólicos representam a possibilidade de substituição de aditivos sintéticos em alimentos por compostos de origem natural, bem como o desenvolvimento de nutracêuticos. Na esfera farmacêutica, a utilização de compostos naturais em substituição aos compostos sintéticos visando à prevenção e tratamento de doenças apresenta inúmeras vantagens como a baixa toxicidade em relação à dosagem utilizada e ao ambiente celular e fisiológico, elevada atividade biológica seletiva, abundância de fontes disponíveis e fácil extração (RAMPOGU et al., 2019).

Dentre esta vasta classe de compostos, a curcumina [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona] é o componente majoritário presente na cúrcuma (*Curcuma longa*), utilizada tradicionalmente na medicina oriental para o tratamento de diversas enfermidades, como doenças respiratórias, inflamatórias e condições associadas à dor abdominal. Ao longo das últimas décadas, estudos têm demonstrado o potencial da curcumina como anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, anticarcinogênico e neuroprotetor (AFTAB; VIEIRA, 2010; BERTONCELLO et al., 2018; FADUS et al., 2016; JOE; VIJAYKUMAR; LOKESH, 2004; KANG; CHEN, 2009).

Outro polifenólico que vem sendo explorado em diversos estudos é o resveratrol (3, 4, 5-trihidroxi-trans-estilbeno), composto pertencente à classe dos estilbenos, que pode ser encontrado na casca de uvas, cranberries, cacau, amendoim, entre outras plantas. Atribui-se ao resveratrol propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, cardioprotetiva e anticarcinogênica. Assim como a curcumina, estudos

demonstram seu potencial neuroprotetor contra doenças como Alzheimer, Parkinson e epilepsia (BAUR; SINCLAIR, 2006; CHEN et al., 2004; MARAMBAUD; ZHAO; DAVIES, 2005; OLAS et al., 2001).

Entretanto, assim como grande parte dos compostos bioativos, curcumina e resveratrol apresentam baixa estabilidade frente à luz e temperaturas elevadas, bem como baixa solubilidade aquosa e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade, o que dificulta sua aplicação em larga escala. Segundo Kara e Rathnanand (2022), o modo mais favorável para administração de princípios ativos é a via oral, devido à simplicidade, conveniência, possibilidade de autoadministração pelo paciente e por geralmente tratar-se de uma forma segura de administração. No entanto, a baixa solubilidade e biodisponibilidade oral dos compostos limita a eficácia de sua administração e requer estratégias para superar tais deficiências. Para isso, diversas abordagens têm sido estudadas ao longo dos anos, como a micronização de compostos, encapsulamento, obtenção de polimorfos e a produção de cocrystalis.

Caracterizados como materiais sólidos cristalinos formados por dois ou mais compostos diferentes, geralmente em razão estequiométrica, os cocrystalis são formados por meio de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações π - π ou interações de van der Waals. Dessa forma, uma nova estrutura cristalina é formada, conferindo ao cocrystal propriedades físico-químicas distintas daquelas inerentes aos compostos puros que o compõem (AITIPAMULA et al., 2012).

Por meio da seleção adequada de compostos formadores, os cocrystalis possibilitam melhorar a estabilidade, solubilidade e propriedades mecânicas dos compostos bioativos. Em alguns casos, pode-se utilizar como coformador outra molécula bioativa que também apresente atividade biológica, o que promove benefícios como aumento da atividade devido a um efeito sinérgico entre os compostos, redução de efeitos colaterais, redução de custos e possibilidade de utilização de terapias combinadas (BOLLA; NANGIA, 2016).

Diferentes métodos podem ser empregados para obtenção das estruturas cristalinas multicomponentes, cuja escolha relaciona-se à possibilidade de ampliação de escala, impacto ambiental gerado, obtenção de produtos com elevada pureza e reprodutibilidade. Tradicionalmente, os métodos mais empregados são aqueles em solução, mecanoquímicos ou sonoquímicos.

Contudo, o uso de fluidos supercríticos na obtenção de cocristais mostra-se uma alternativa promissora, tendo em vista a possibilidade de formação de cocristais de nova estequiometria e estrutura molecular. Além disso, apresenta vantagens como redução ou eliminação do uso de solventes orgânicos, possibilidade de processamento de moléculas termolábeis e obtenção de produtos puros e com menor tamanho de partícula (REVELLI et al., 2014).

No que se refere a curcumina, alguns trabalhos avaliam a obtenção de cocristais com diferentes coformadores por meio de métodos convencionais e também utilizando tecnologia supercrítica, tendo resultado em melhorias na solubilidade, dissolução e estabilidade do composto (RIBAS et al., 2019b; SATHISARAN; DALVI, 2017).

Da mesma forma, a cocrystalização do resveratrol por meio de diferentes métodos tem sido abordada, ocasionando melhorias em suas propriedades físico-químicas e biológicas (PESSOA et al., 2019; ROSA et al., 2019). A obtenção de cocristais de resveratrol também possibilitou alcançar propriedades mecânicas superiores em comparação ao composto puro, o que é desejável do ponto de vista industrial, embora nem sempre seja acompanhada de melhora na dissolução do composto, como observado por He et al. (2017a) e Lou et al. (2021) na obtenção de cocristais de resveratrol e L-prolina via método de recristalização.

Considerando que as propriedades físico-químicas dos cocristais tendem a ser influenciadas pelas propriedades dos compostos usados em sua formação, a L-prolina [ácido (2S)-pirrolidino-2-carboxílico] representa uma interessante possibilidade de coformador por tratar-se de um aminoácido da família da arginina com uma elevada solubilidade, atividade osmoprotetora, pH neutro e ausência de toxicidade em concentrações elevadas. O composto, produzido nas plantas em resposta ao estresse ambiente, recentemente foi apontado também como protetor de injúrias em células animais, como a proteção de células renais de ratos contra aflatoxinas (LI et al., 2019), efeito termoprotetor em eritrócitos de galinhas (SZABELAK et al., 2021) e supressão do aumento do crescimento de tumores (PHANG; LIU, 2012), o que o destaca ainda mais na seleção de um coformador.

Embora a produção de cocristais de resveratrol e L-prolina por meio de técnicas convencionais não tenha gerado resultados satisfatórios em relação à

melhora da dissolução do composto ativo, de conhecimento da autora, até o momento não foi reportado na literatura a utilização de tecnologia supercrítica com essa finalidade, o que pode significar a obtenção de resultados diferentes.

Da mesma forma, até o momento não há registros da produção de cocristsais princípio ativo-princípio ativo de curcumina e resveratrol, nem mesmo por métodos tradicionais. Considerando o grande potencial apresentado por estes compostos como agentes de prevenção e tratamento de inúmeras doenças e, ainda, a possibilidade de aumentar sinergicamente este potencial por meio da cocrystalização, este trabalho teve como objetivo produzir cocristsais de curcumina e resveratrol utilizando tecnologia supercrítica visando aumentar a dissolução, capacidade antioxidante e anti-inflamatória dos compostos, bem como avaliar estes efeitos por meio de análises de atividade antioxidante *in vitro* e avaliação do efeito antinociceptivo/anti-inflamatório *in vivo*.

Ainda, buscou-se a obtenção de cocristsais de resveratrol e L-prolina por meio da utilização de tecnologia supercrítica com o objetivo de melhorar a dissolução e potencial antioxidante do composto ativo, avaliados por meio de análises *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo a obtenção e caracterização de cocristsais princípio ativo-princípio ativo de curcumina e resveratrol, com avaliação de suas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, e de cocristsais de resveratrol e L-prolina utilizando tecnologia supercrítica, com análise de sua atividade biológica *in vitro*.

1.1.2 Objetivos específicos

A partir do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Produzir cocristsais princípio ativo-princípio ativo de curcumina e resveratrol, a partir das técnicas CSS e GAS;

- Obter cocristais de resveratrol com o coformador L-prolina, de maior solubilidade aquosa, utilizando tecnologia supercrítica;
- Verificar a formação ou não de cocristais por meio da caracterização dos compostos por DSC, DRXP e FTIR;
- Analisar a morfologia, tamanho e distribuição de tamanho de partícula dos cocristais a partir de MEV;
- Verificar a presença de solvente residual nos cocristais produzidos por GAS;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos cocristais em comparação à dos compostos ativos puros e da mistura física dos coformadores;
- Comparar o perfil de dissolução dos cocristais ao dos compostos puros e da mistura física, realizando a quantificação dos compostos por espectrofotometria no ultravioleta visível;
- Avaliar o efeito antinociceptivo/anti-inflamatório dos cocristais princípio ativo-princípio ativo produzidos, a partir da aplicação *in vivo*, em comparação aos compostos puros e à mistura física dos compostos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão de literatura sobre os assuntos relevantes para a compreensão e contextualização deste trabalho.

2.1 CURCUMINA

A curcumina [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona] é o composto polifenólico majoritário presente na cúrcuma (*Curcuma longa L.*), especiaria utilizada há séculos nas culturas indiana e chinesa devido a seu poder aromatizante, conservante e corante, conferido por sua coloração amarelo intensa, bem como devido às propriedades medicinais popularmente atribuídas a ela. Estas propriedades incluem tratamento de feridas, resfriados, artrite, fibrose cística, câncer, inflamações, entre outros (AK; GÜLÇIN, 2008; WÜNSCHE et al., 2021).

Tais características, bem como a baixa toxicidade, custo e acessibilidade da curcumina fizeram com que diversos estudos avaliassem seu potencial na prevenção e tratamento de doenças ao longo dos anos, atribuindo a ela atividade antioxidante (AFTAB; VIEIRA, 2010), anti-inflamatória (FADUS et al., 2016), hepatoprotetora, cardioprotetora (KANG; CHEN, 2009) e anticarcinogênica (LI; ZHANG, 2014).

O potencial anti-inflamatório da curcumina foi demonstrado recentemente por Sharma; Sethi; Naura (2020) verificando a melhora de dermatite atópica induzida por ovalbumina e bloqueio da progressão da marcha atópica associada em camundongos. Da mesma forma, o uso da curcumina foi investigado frente a rinite alérgica induzida por ovalbumina em porquinhos-da-índia. Os autores avaliaram vários sintomas incluindo espirros, frequências de fricção, lacrimejamento e congestão nasal em várias condições de umidade, bem como em sensibilização repetida, percebendo redução significativa dos sintomas devido ao tratamento com curcumina. Além disso, observou-se melhora nas alterações histopatológicas (redução da infiltração de células inflamatórias) da mucosa nasal na rinite alérgica (THAKARE; OSAMA; NAIK, 2013).

O uso da curcumina para prevenção e tratamento da progressão de glioma devido a condições de estresse psicológico foi avaliado de modo satisfatório por Wang et al. (2021). Para tanto, estabeleceu-se um modelo de estresse adverso em ratos nus

e em células humanas para avaliar o efeito inibidor da curcumina na proliferação e invasão de glioma induzido por estresse psicológico adverso. Os resultados indicaram a capacidade da curcumina de inibir o crescimento de tumores transplantados nos ratos, além de induzir alterações no ciclo celular e aumento da apoptose, inibindo a proliferação celular dos gliomas.

Bertoncello et al. (2018) avaliaram o potencial anticonvulsivante da curcumina em sua forma pura e micronizada, em comparação ao medicamento antiepilético clássico valproato, por meio de um modelo de convulsão induzida por PTZ em zebrafish (*Danio rerio*). Os autores observaram efeito neuroprotetor dos compostos, diminuindo o tempo de desenvolvimento das convulsões tanto em larvas como em animais adultos.

A utilização da curcumina com finalidade neuroprotetora foi também investigada por Caesar et al. (2012) por meio da administração do composto visando aliviar a toxicidade do peptídeo beta amiloide, comumente observado na forma de depósitos extracelulares e acúmulo intraneuronal em paciente com doença de Alzheimer, em *Drosophila* transgênica. Concluiu-se que a longevidade e a atividade locomotora das moscas alimentadas com curcumina aumentou em 75%, comparado ao grupo controle. No entanto, os pesquisadores apontam como maior limitação para a utilização da curcumina no tratamento da doença, sua baixa biodisponibilidade e estabilidade em solução.

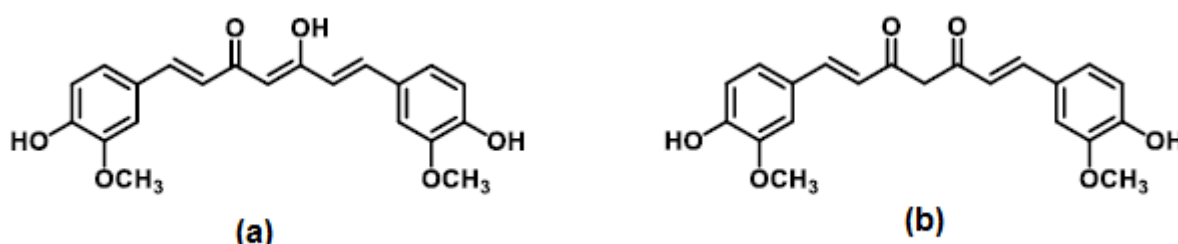
Da mesma forma, estudos clínicos de fase 1 e 2, que buscam avaliar a segurança e eficácia da curcumina para inibição do crescimento de tumores, demonstraram a baixa biodisponibilidade da curcumina em humanos, sendo que doses diárias de até 1,4 g resultaram em níveis indetectáveis de curcumina no sangue (CRUZ-CORREA et al., 2006; ZHOU et al., 2016a).

Assim, a utilização da curcumina visando sua ação farmacológica apresenta limitações devido à baixa solubilidade em água, estimada em $11 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, baixa biodisponibilidade devido a mínima absorção do composto, rápido metabolismo no fígado e na parede intestinal, bem como rápida eliminação sistêmica via urina e fezes (YU; HUANG, 2010; ANAND et al., 2007).

De nome químico diferuloilmetano e massa molar $368,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, a curcumina possui dois 2-metóxfenóis ligados simetricamente por meio de uma cadeia dicetona

insaturada de sete carbonos, o que induz tautomerismo ceto-enol, conforme estrutura química apresentada na Figura 1. No estado sólido, a forma ceto-enol mostra-se mais estável, assim como em fase gasosa. Já em solução, observa-se um equilíbrio entre os dois tautômeros, sendo a forma di-ceto favorecida em soluções ácidas e neutras, enquanto a forma ceto-enol sobressai em soluções alcalinas (SANPHUI; BOLLA, 2018). Em pHs neutros e ácidos a curcumina é praticamente insolúvel e, embora relativamente solúvel em meio alcalino, quando dissociada, degrada-se rapidamente. Além disso, em soluções orgânicas a curcumina decompõe-se quando exposta à luz (TØNNESEN; MÁSSON; LOFTSSON, 2002).

Figura 1 – Tautômeros da curcumina (a) ceto-enol e (b) di-ceto.



Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), uma forma de classificação científica de fármacos baseada na solubilidade aquosa e na permeabilidade intestinal que correlaciona a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade dos compostos, a curcumina enquadra-se como composto de classe II. Estes compostos têm sua biodisponibilidade limitada principalmente pela taxa de dissolução, ao passo que sua permeabilidade mostra-se elevada (KHADKA et al., 2014). Dessa forma, os estudos que têm como objetivo desenvolver novos produtos a partir destes, tem como foco o aumento da solubilidade.

Nos últimos anos, diversas estratégias têm sido utilizadas visando melhorar a solubilidade da curcumina, como a micronização, encapsulação, obtenção de polimorfos e cocristais. Esta última apresenta uma grande vantagem em relação à melhora da estabilidade do composto, visto que ela se relaciona ao ligante β -di-ceto da cadeia carbônica, cuja reatividade pode ser modulada por meio de ligações de

hidrogênio intermoleculares formadas na cocristalização com coformadores adequados (SANPHUI; BOLLA, 2018).

2.2 RESVERATROL

O resveratrol (3,4,5-trihidroxi-trans-estilbeno) é um composto polifenólico encontrado em inúmeras fontes vegetais como uvas, amoras, cacau, amendoim, entre outros, embora esteja presente em maiores concentrações nas raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta utilizada na medicina tradicional asiática há séculos para tratar inflamações. Pertencente ao grupo dos estilbenos, o composto caracteriza-se como um pó de coloração quase branca, com ponto de fusão próximo a 255 °C e massa molar de 228,25 g·mol⁻¹ (AGGARWAL et al., 2004).

O reconhecimento do resveratrol na prevenção de doenças cardiovasculares levou à criação do termo “paradoxo francês”, em referência à alimentação dos franceses, rica em gorduras saturadas, e a baixa incidência de aterosclerose coronária, atribuída ao consumo frequente de vinho e outros alimentos ricos no composto. De fato, Lagouge et al. (2006) avaliaram a capacidade do resveratrol de impactar a função mitocondrial e a homeostase metabólica, observando que o tratamento de camundongos com resveratrol aumentou significativamente sua capacidade aeróbica, o que foi evidenciado por seu tempo de execução aumentado e consumo de oxigênio em fibras musculares.

Diversos estudos têm apontado o elevado potencial do resveratrol como agente antioxidante, antibacteriano, anti-inflamatório, antiviral, cardioprotetor, neuroprotetor e anticarcinogênico. Suas propriedades quimiopreventivas têm sido associadas à supressão do processo de proliferação nas etapas de iniciação, promoção e progressão de diversas linhas de células cancerígenas como linfócitos, mama, glia e próstata (HWANG; LIM, 2015; MARAMBAUD; ZHAO; DAVIES, 2005; OPIPARI et al., 2004; ZHENG et al., 2006).

Simão et al. (2012) demonstraram a atividade anti-inflamatória do resveratrol estudando o efeito do pré-tratamento com o composto diante da resposta inflamatória do hipocampo após isquemia cerebral global em ratos, verificando a diminuição da expressão dos níveis de NF-κB e JNK, melhora dos níveis elevados de substrato iNOS

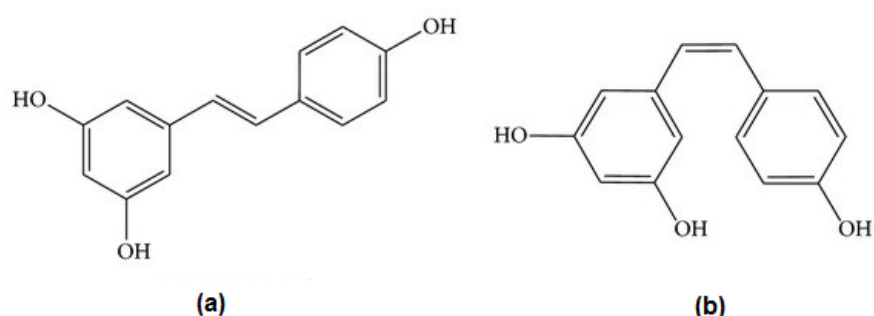
e COX-2 e diminuição da ativação de astrócitos e microglias após isquemia cerebral global.

O potencial anticonvulsivante do resveratrol foi recentemente investigado por Ethemoglu et al. (2017) em ratos adultos, utilizando modelo de convulsão epilética induzida por penicilina. O trabalho comparou o efeito provocado pelo resveratrol puro com resveratrol liberado em sistema de entrega lipossômica anfípica, além do grupo controle e do uso único de lipossomo. Observou-se que a administração conjunta de resveratrol e lipossomo foi a abordagem mais eficaz no tratamento das convulsões, diminuindo consideravelmente o número de picos por minuto em comparação aos demais grupos.

Da mesma forma, Almeida et al. (2021) avaliaram o potencial anticonvulsivante do resveratrol puro e micronizado utilizando tecnologia supercrítica e do medicamento clássico diazepam em zebrafish (*Danio rerio*) adultos em modelo de convulsão induzida por PTZ. O resveratrol micronizado foi capaz de reduzir a ocorrência de convulsão tônico-clônica e retardar o desenvolvimento das convulsões de forma semelhante ao diazepam, ao passo que o composto não processado não foi capaz de proteger os animais. O resultado observado pode ser atribuído ao menor tamanho de partícula e distribuição de tamanho mais estreita, decorrência do processo de dispersão de solução aumentada por fluido supercrítico (SEDS). Da mesma forma, possibilitou-se a ausência de efeitos comportamentais adversos, devido à menor toxicidade do resveratrol (puro ou micronizado) em relação ao diazepam.

Com estrutura química consistindo em dois anéis aromáticos unidos por uma ligação dupla de estireno, conforme apresentado na Figura 2, o resveratrol apresenta isomeria geométrica. A forma trans, embora apresente maior atividade biológica, é altamente fotossensível e rapidamente isomerizável para a forma cis quando exposto a luz visível ou ultravioleta. A cinética de isomerização é afetada pelo tempo de irradiação, comprimento de onda, temperatura e estado físico do resveratrol (ZUPANČIČ; LAVRIČ; KRISTL, 2015).

Figura 2 – Estrutura química dos isômeros (a) trans-resveratrol e (b) cis-resveratrol.



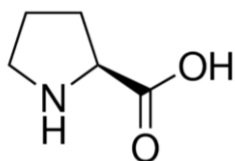
Fonte: elaborado pelo autor.

Assim como a curcumina, o resveratrol se apresenta no sistema de classificação biofarmacêutica classe II, com elevada permeabilidade, porém, baixa solubilidade aquosa, estimada em $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. A baixa solubilidade, somada à elevada instabilidade, elevado metabolismo e eliminação no organismo humano e baixa biodisponibilidade, levam à necessidade do desenvolvimento de estratégias que possibilitem o aproveitamento de seu potencial em maior escala (TRUZZI et al., 2021). A presença de três grupos hidroxila na molécula de resveratrol representa a existência de grupos funcionais propícios para a formação de ligações de hidrogênio, fornecendo ao resveratrol a possibilidade do melhoramento de suas propriedades por meio da cocristalização (ZHOU et al., 2016b).

2.3 L-PROLINA

A L-prolina [ácido (2S)-pirrolidino-2-carboxílico] é um aminoácido apolar (Figura 3) que apresenta importantes funções biológicas e aplicações biotecnológicas. Quando incorporada às proteínas, forma uma amida terciária, levando à quebra das estruturas α -hélice e β -folha das proteínas, o que confere às células proteção em situação de estresse. Assim, diante de situações de congelamento, desidratação, estresse osmótico, entre outros, a L-prolina é produzida e acumulada por uma variedade de plantas e micro-organismos (BACH; TAKAGI, 2013).

Figura 3 – Estrutura química da L-prolina.



Fonte: elaborado pelo autor.

Da mesma forma, estudos tem demonstrado o potencial protetor da L-prolina também em células animais, de modo particular na criopreservação de espermatozoides e ovócitos humanos e de outros mamíferos (MORADI et al., 2022; ZHANG et al., 2016). Krishnan; Dickman; Becker (2008) também confirmaram a capacidade do aminoácido de proteger diferentes células de mamíferos contra estresse causado por peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de terc-butila e indutor de estresse oxidativo cancerígeno.

Em razão de sua estrutura química que apresenta tanto doadores como aceptores de hidrogênio, a L-prolina apresenta potencial favorável para a obtenção de cocristais, tendo sido empregada como coformador em inúmeros trabalhos (BONILLALANDA et al., 2021; INAM et al., 2021; NUGRAHANI et al., 2020; SONG et al., 2019). Soma-se a isso, a elevada disponibilidade e baixa toxicidade do composto, bem como a elevada solubilidade aquosa (QIU et al., 2019), que fazem da L-prolina um excelente candidato para cocrystalização visando melhorar a solubilidade de compostos bioativos e potencializar seus efeitos biológicos.

2.4 COCRISTAIS

Os materiais cristalinos apresentam propriedades físicas relacionadas ao arranjo molecular de sua estrutura sólida. Alterações na estrutura cristalina e nas interações entre as moléculas podem provocar alterações nas propriedades do sólido. Assim, propriedades específicas de compostos bioativos podem ser melhoradas por meio das tecnologias de engenharia de cristais que incluem a formação de polimorfos metaestáveis, formas amorfas de elevada energia, partículas ultrafinas e cocristais (KHADKA et al., 2014).

Entre estas abordagens, a cocristalização consiste em um processo fundamentado na associação no estado sólido, por meio de interações não covalentes, de um composto ativo e outro componente molecular de modo a alterar positivamente propriedades físico-químicas do composto ativo, como solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade térmica, fotorreatividade, entre outras. Devido à possibilidade de melhorar tais propriedades, sem alterar a estrutura química dos compostos, a cocristalização vem encontrando crescente aplicação nas áreas farmacêutica, química, agrícola, ambiental e de alimentos (SHEMCHUK et al., 2020).

Assim, cocristais são materiais cristalinos multicomponentes compostos por diferentes entidades químicas, em uma razão estequiométrica, unidos por meio de interações como ligações de hidrogênio, π - π stacking e forças de van der Waals. Por meio destas interações entre os coformadores, a estrutura cristalina é gerada repetidamente, formando uma rede de menor energia comparada aos compostos cristalinos puros, o que confere aos cocristais maior afinidade com os solventes e melhor solubilidade (AITIPAMULA et al., 2012; BAVISHI; BORKHATARIA, 2016). Uma vez que as forças intermoleculares que possibilitam a formação do cocristal não alteram a estrutura química das moléculas ativas, as propriedades biológicas dos compostos são preservadas (BRUNI et al., 2019).

As alterações nas propriedades físico-químicas dos compostos cocristalinos são refletidas também no ponto de fusão, espectro de infravermelho, difração de raios-X e dados de ressonância magnética nuclear destes compostos. Assim, a confirmação da formação do cocristal e sua caracterização podem ser realizadas por meio de técnicas termoanalíticas e espectroscópicas (CHADHA et al., 2017).

Os cocristais costumam apresentar propriedades físico-químicas intermediárias às propriedades dos compostos formadores. Dessa forma, costuma-se utilizar coformadores que apresentem uma determinada propriedade de interesse, que se deseja melhorar no composto ativo. A seleção de um coformador deve considerar também sua segurança e toxicidade, dando-se preferência a substâncias Geralmente Reconhecidas como Seguras (*Generally Recognized as Safe*, na sigla em inglês GRAS). Pode-se, ainda, utilizar como coformador outra molécula bioativa com sua própria atividade farmacológica, formando os chamados cocristais princípio ativo-princípio ativo (SEKHON, 2012).

Nestes casos, além das alterações nas propriedades físico-químicas do cocrystal, em relação aos compostos puros, as atividades biológicas dos compostos ativos também podem apresentar diferenças relevantes, resultando em aumento da ação devido ao efeito sinérgico dos compostos, redução dos efeitos colaterais, redução no número de prescrições e custos administrativos, aumento da adesão dos pacientes à farmacoterapia em razão da simplificação do tratamento e aplicação de terapias combinadas.

Atualmente, diversas desordens complexas, como algumas doenças infecciosas, requerem a administração de dois ou mais fármacos e o custo-benefício, assim como a combinação de compostos de dose fixa com múltiplos alvos, como ocorre na cocrystalização, apresenta ainda benefícios como a redução adicional do risco de efeitos adversos ou de resistência ao tratamento, redução de custos de fabricação, de embalagens e de logística e de prescrições de medicamentos. As dificuldades relacionadas à associação de fármacos, como instabilidade e diferenças de solubilidade, tem na cocrystalização uma possibilidade de solução (BOLLA; NANGIA, 2016; THIPPARABOINA et al., 2016).

Considerando que a cocrystalização ocorre baseada em interações intermoleculares, a análise de compatibilidade dos grupos funcionais pode ser uma ferramenta útil, embora insuficiente para prever a possibilidade satisfatória de obtenção de cocrystalis. Assim, diferentes métodos experimentais têm sido utilizados visando a cocrystalização, como moagem, moagem assistida por líquido e métodos em solução, mais tradicionalmente empregados. Para a técnica de moagem, os coformadores costumam ser moídos juntamente em moinho de bolas ou mesmo por meio de pistilo e gral, em escala laboratorial. Para facilitar o processo de cocrystalização, uma pequena quantidade de solvente orgânico pode ser adicionada ao processo, no que se denomina moagem assistida por líquido (OBER; MONTGOMERY; GUPTA, 2013).

Já nos métodos baseados em solução, os coformadores são dissolvidos em um solvente adequado, geralmente misturados por meio de sonicação, e então a solução é levada à supersaturação com a remoção do solvente por meio de evaporação ou substituição por um antissolvente. Com a variação da composição inicial da solução ou suspensão, é possível variar as rotas termodinâmicas que levam

os coformadores a se rearranjar separadamente ou simultaneamente, formando os cocristais. Assim, é importante que composto ativo e coformador tenham solubilidades próximas no solvente a ser utilizado (YU; CHOW; TAN, 2010).

Contudo, existem estudos que demonstram a possibilidade de produção de cocristais em condições de saturação incongruente por meio de evaporação muito rápida, como a utilização de *spray drying*, por exemplo. Nestes casos, sugere-se a ocorrência do confinamento da zona de estabilidade do diagrama de fases, superando-se os fenômenos termodinâmicos. Isto é o que ocorre também com as técnicas que fazem uso de fluidos supercríticos e que representam a possibilidade de produção de novos cocristais difíceis de serem obtidos por meios tradicionais (NEUROHR et al., 2013). Os métodos tradicionais de cocrystalização apresentam, ainda, problemas como dificuldade de escalonamento, presença de cristais dos componentes individuais (homocristais) no produto final e, frequentemente, a necessidade de uma etapa adicional para separação do solvente, o que torna o uso de tecnologia supercrítica ainda mais atraente.

2.5 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS UTILIZANDO FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Um fluido supercrítico consiste em uma substância que se encontra em condições de temperatura e pressão acima de suas condições críticas e que apresenta propriedades consideradas intermediárias entre líquidos e gases, como elevado poder de solvatação, baixa tensão superficial, baixa viscosidade e alta difusividade (BRUNNER, 1994). Devido a estas características, tecnologias que utilizam fluidos supercríticos têm encontrado cada vez mais aplicações como na extração de compostos bioativos, reações de polimerização, reações enzimáticas, micronização, encapsulação e cocrystalização de diferentes compostos.

Atualmente, o dióxido de carbono (CO_2) é o fluido supercrítico mais utilizado em função de seu baixo custo e elevada pureza, por ser não tóxico, não inflamável, inodoro, incolor, inerte e por suas condições críticas moderadas ($T_c = 31,04 \text{ }^\circ\text{C}$ e $P_c = 73,8 \text{ bar}$) que podem ser facilmente alcançadas em escala laboratorial ou industrial e evitam a degradação de compostos termolábeis (CUADRA et al., 2018).

O uso de fluidos supercríticos possibilita a formação de cocristais cineticamente metaestáveis, em razão da rápida secagem, da interação entre os compostos e do gradiente de concentração gerado. O uso de diferentes técnicas e a modificação das condições experimentais como temperatura e pressão, por exemplo, podem resultar em diferenças na morfologia e tamanho dos cristais obtidos, o que pode acarretar grandes alterações em suas propriedades físico-químicas (OBER; GUPTA, 2012).

Os métodos de cocrystalização utilizando fluidos supercríticos fundamentam-se em três propriedades básicas: seu poder solvente, fortemente relacionado à pressão de processo; sua miscibilidade com líquidos orgânicos, que causa um efeito antissolvente nos compostos a serem cocrystalizados; e à atomização provocada pela despressurização do sistema através de um bocal coaxial. Assim, a cocrystalização em meio supercrítico pode ser realizada preferencialmente a partir de duas diferentes abordagens: utilizando o fluido supercrítico como solvente ou como antissolvente (PADRELA et al., 2010).

A técnica mais difundida que utiliza o fluido supercrítico como antissolvente é denominada GAS e consiste na pressurização e dissolução do CO₂ comprimido em uma solução de um solvente líquido miscível com o fluido supercrítico, contendo os coformadores do cocrystal. À medida que o fluido supercrítico é dissolvido na solução, o solvente líquido é expandido e seu poder de solvatação é reduzido, o que leva à supersaturação do sistema e induz os coformadores a coprecipitarem em uma mesma estrutura cristalina, em razão de uma nucleação simultânea, crescimento dos cristais e aglomeração. O fluxo controlado de CO₂, além de promover a precipitação dos cocristais, possibilita, em muitos casos, a remoção quase que completa do solvente orgânico, gerando partículas livres de solvente residual (PANDO; CABAÑAS; CUADRA, 2016).

Por outro lado, a utilização do fluido supercrítico como solvente, no que se denomina Cocrystalização com Solvente Supercrítico (CSS), baseia-se na solubilização dos compostos formadores do cocrystal no próprio fluido supercrítico, puro ou por meio da utilização de uma quantidade muito pequena de cossolvente. Para isso, os coformadores são previamente inseridos na câmara de precipitação, que então é preenchida com o CO₂ até atingir a pressão de processo. Após um período

estático, a despressurização gradual do sistema é realizada, reduzindo o poder de solvatação do fluido, levando à supersaturação e mudança de fase. Dessa forma, a cocristalização ocorre na câmara de precipitação durante a etapa de despressurização. As vantagens desta técnica consistem na redução do volume do equipamento, redução de custos e de etapas adicionais de separação de solvente na produção de cocristais (MACEACHERN; KERMANSHAHI-POUR; MIRMEHRABI, 2020).

Além disso, a utilização de tecnologia supercrítica para obtenção de cocristais, em substituição a técnicas convencionais, apresenta vantagens como a rapidez de processamento realizado em uma única etapa, possibilidade de maior controle do tamanho e morfologia das partículas, redução do estresse térmico ou mecânico a que os coformadores são submetidos, comparado aos processos de moagem, redução ou mesmo eliminação do uso de solventes orgânicos e da presença de solvente residual nas partículas (WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRAKOOL, 2018).

2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Nos últimos anos, diversas abordagens têm sido utilizadas com o objetivo de melhorar a solubilidade e biodisponibilidade tanto da curcumina como do resveratrol, entre as quais a cocristalização se mostra cada vez mais presente, graças aos benefícios já citados, como a relativa simplicidade de operação, exequibilidade, custo-efetividade e reduzido impacto ambiental.

A cocristalização da curcumina foi relatada com diferentes coformadores como resorcinol e pirogalol, por meio de moagem assistida por líquido, resultando em taxas de dissolução em água 5 e 12 vezes maior, respectivamente, em comparação à curcumina pura (SANPHUI et al., 2011). Outros coformadores como dextrose também foram avaliados, por meio de cristalização em solução, fornecendo um aumento de 2,5% na solubilidade da curcumina (KATHERINE; NUGROHO; SUGIH, 2018) e ácido cinâmico, utilizando moagem no estado sólido e evaporação do solvente, sem, entretanto, avaliar a solubilidade dos cocristais (RATHI; PARADKAR; GAIKAR, 2019).

Há ainda registros de patentes referentes à produção de cocrystalis de curcumina com 2-aminobenzimidazol, L-lisina (GATELY; TRIEZENBERG; WANG, 2016), naproxeno, piperazina, piperidina e ibuprofeno (CHAVA; GORANTLA; MUPPIDI, 2015). Pantwalawalkar et al. (2021) produziram cocrystalis de curcumina com ácido ascórbico por meio do método de evaporação do solvente, alcançando um aumento expressivo na solubilidade aquosa da curcumina, 576 vezes maior em água destilada comparada à do composto puro, sem, entretanto, avaliar os efeitos disso em relação a atividades biológicas.

Entretanto, o uso de fluido supercrítico para cocrystalização da curcumina por meio da técnica CSS ainda é pouco explorado, tendo sido recentemente realizado para nicotinamida e N-acetilcisteína como coformadores (RIBAS et al., 2019a, 2019b). Como resultado, observou-se para ambos cocrystalis produzidos um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade de dissolução em água da curcumina. Este aumento influenciou o aumento na biodisponibilidade, que para o cocrystal curcumina-nicotinamida foi observado por meio do aumento no potencial antinociceptivo/anti-inflamatório do composto. O mesmo foi observado por Paulazzi et al. (2022) para o mesmo sistema, cocrystalizado pelo método GAS, identificando, além do efeito anti-inflamatório, a inibição da quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

Por sua vez, a cocrystalização do resveratrol também tem sido realizada por métodos tradicionais como moagem assistida por líquido e rápida remoção do solvente, tendo como coformadores 4-aminobenzamida e isoniazida e resultando em melhora na solubilidade aquosa, taxa de dissolução e tabletabilidade (capacidade de transformação de um material em pó em um formato de comprimido, sob pressão de compactação suficiente) do composto (ZHOU et al., 2016b).

Cocrystalis de resveratrol com piperina também foram produzidos empregando método em solução com evaporação do solvente, porém, resultando em diminuição na solubilidade e dissolução do composto, exatamente o oposto almejado no trabalho (HE et al., 2017b). Da mesma forma, He et al. (2017a) e Lou et al. (2021) produziram cocrystalis de resveratrol e L-prolina via método de recristalização, alcançando propriedades mecânicas superiores em comparação ao composto puro, porém, sem melhora no perfil de dissolução do composto ativo.

Já a obtenção de cocristais de resveratrol utilizando tecnologia supercrítica foi reportada por Pessoa et al. (2019) por meio da técnica GAS, utilizando nicotinamida e isoniazida como coformadores e resultando em melhora na taxa de dissolução do resveratrol tanto em meio ácido como em meio neutro.

Tendo em vista este resultado e considerando o potencial de utilização da L-prolina como coformador em função de sua elevada solubilidade, apesar dos resultados limitados encontrados nos trabalhos que a utilizaram, pensou-se na possibilidade de obtenção de cocristais de resveratrol e L-prolina por meio da utilização de tecnologia supercrítica, o que não foi reportado na literatura até o momento. Em razão das grandes diferenças relacionadas aos métodos de preparação, acredita-se que o processamento utilizando fluido supercrítico possa apresentar resultados diferentes aos observados pelos autores citados, preferencialmente com melhora no perfil de dissolução em água do resveratrol.

Considerando o potencial promissor apresentado pela curcumina e resveratrol na prevenção e tratamento de doenças, alguns autores buscaram formas de unir os compostos visando aumentar seu potencial, como a administração conjunta dos compostos (MALHOTRA; NAIR; DHAWAN, 2014; MOHAPATRA et al., 2015).

Majumdar et al. (2009) avaliaram o efeito da curcumina e do resveratrol na inibição do crescimento de células de câncer de cólon, observando que a inibição do crescimento das células foi maior quando se utilizou os compostos combinados. Da mesma forma, Lodi et al. (2017) perceberam que o uso combinado de curcumina e resveratrol foi mais efetivo que a administração isolada dos compostos, na inibição do crescimento de tumores em um modelo de aloenxerto de câncer de próstata em ratos.

Avaliou-se ainda a síntese de moléculas híbridas de resveratrol e curcumina (DIMAURO, 2010) e de seus derivativos (DE FREITAS SILVA et al., 2018), com potencial para o tratamento da doença de Alzheimer e para inibição da progressão da mitose em células de câncer de mama, respectivamente. Outras abordagens estudadas incluem sua co-encapsulação em nanopartículas lipídicas sólidas (CASSANO et al., 2022; GUMIREDDY et al., 2019) e em nanocomplexos de zein-quitosana, capazes de retardar a fotodegradação e aumentar a termoestabilidade dos compostos ativos (CHEN et al., 2020).

No entanto, de conhecimento da autora, este é o primeiro trabalho realizado envolvendo a cocristalização de curcumina e resveratrol, seja por meio de técnicas convencionais ou por meio do emprego de técnicas que utilizam fluido supercrítico. Diante disto e levando em consideração os benefícios gerados com a produção de cocristais por meio de tecnologia supercrítica descritos anteriormente, a relevância deste trabalho torna-se evidente.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são especificados os materiais e os métodos utilizados para obtenção e caracterização dos cocristais, testes *in vitro* e *in vivo*.

3.1 MATERIAIS

Curcumina e resveratrol foram utilizados como formadores para a obtenção de cocrystal, conforme resultados descritos no Capítulo 4. Curcumina com pureza em massa de 95,0% foi adquirida de Neon Comercial, Suzano/SP, Brasil, e resveratrol com pureza de 99,5% foi adquirido da SM Empreendimentos, São Paulo/SP, Brasil.

Resveratrol foi também utilizado para obtenção de cocrystal juntamente com o coformador L-prolina, conforme resultados apresentados no Capítulo 5. Para este sistema, resveratrol com pureza em massa de 98% foi adquirido da Active Pharmaceutica, Brasil, e L-prolina com pureza em massa de 98,5% foi adquirida de Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brasil.

Os solventes orgânicos selecionados para os experimentos de produção de cocrystal tanto por métodos convencionais, como por meio de tecnologia supercrítica, foram acetato de etila, acetona e etanol. Sua seleção deu-se em função da solubilidade dos princípios ativos e coformadores nos solventes citados, que se situou sempre na mesma ordem de grandeza, de modo a favorecer a cocrystalização. Todos os solventes apresentaram pureza de 99,5% e foram adquiridos da Neon Comercial LTDA/SP. Dióxido de carbono, utilizado como fluido supercrítico, com pureza de 99% em fase líquida, foi adquirido da White Martins S.A.

3.2 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS POR MÉTODOS CONVENCIONAIS

Métodos convencionais de produção de cocristais, especificamente moagem assistida por líquido e evaporação lenta do solvente, foram empregados na tentativa de obtenção de cocristais de curcumina e resveratrol, cujos resultados são descritos no Capítulo 4. Em ambos os métodos, a razão molar utilizada entre curcumina e resveratrol foi de 1:1.

3.2.1 Moagem assistida por líquido (*Liquid-assisted grinding* – LAG)

A metodologia de moagem assistida por líquido foi adaptada do trabalho de Zhou et al. (2016). Princípio ativo e coformador foram pesados de forma a obter a razão molar desejada e colocados em um gral. Em seguida foram adicionados 200 µL de solvente orgânico e moídos com o auxílio de um pistilo durante 60 min, com a formação de pó de fluxo livre. Ao final da moagem, as amostras foram coletadas e armazenadas em frasco âmbar a 4 °C até o momento da caracterização. Os solventes utilizados como assistentes para a moagem foram acetato de etila, acetona e etanol.

3.2.2 Evaporação lenta de solvente

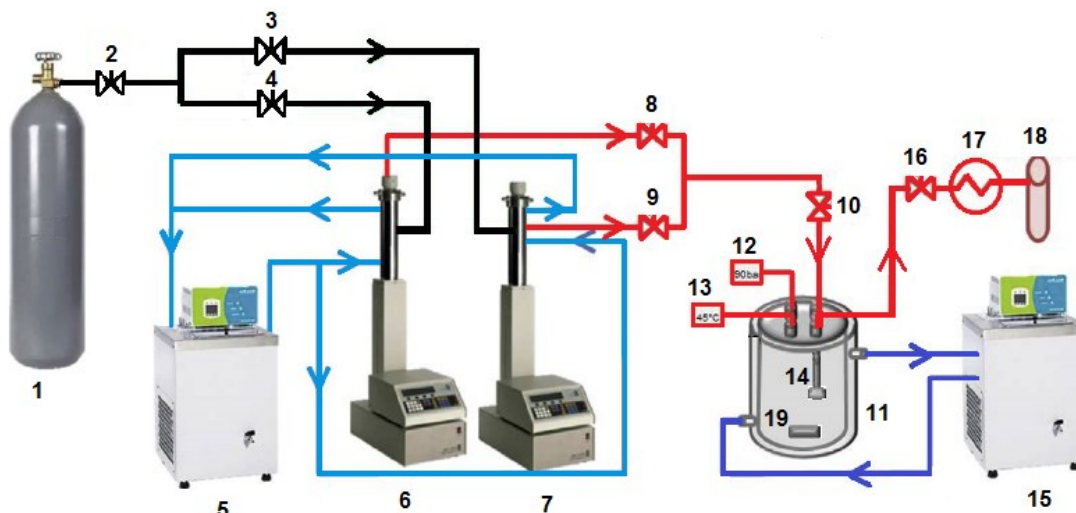
Os componentes formadores, na fração molar desejada, foram adicionados a um frasco âmbar contendo 10 mL de solvente orgânico (acetato de etila, acetona ou etanol). Em seguida as soluções foram homogeneizadas por ultrassom durante 10 min. Após homogeneização, os frascos foram deixados abertos em temperatura ambiente até completa evaporação do solvente. O precipitado foi então coletado e armazenado em frasco âmbar a 4 °C para posterior caracterização (WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRAKOOL, 2018).

3.3 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS UTILIZANDO FLUIDO SUPERCRÍTICO

3.3.1 Unidade experimental

O aparato e procedimento experimentais para obtenção dos cocristais foram baseados nos trabalhos de Pessoa et al. (2019) e Ribas et al. (2019) que estudaram a cocrystalização do resveratrol e da curcumina, respectivamente, com diferentes coformadores. Especificamente, os parâmetros de processo foram estudados de forma mais detalhada por Pessoa et al. (2019), obtendo-se as condições mais favoráveis para produção de cocrystal, que foram reproduzidas neste estudo. A Figura 4 apresenta um diagrama esquemático da unidade experimental utilizada para produção de cocristais em meio supercrítico por meio das técnicas GAS e CSS.

Figura 4 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para obtenção de cocristais em meio supercrítico.



Fonte: adaptado de Ribas et al. (2019).

De acordo com a Figura 4, a unidade experimental para cocristalização utilizando fluido supercrítico é constituída dos seguintes elementos:

- (1) Reservatório de CO₂;
- (2) Válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (Check-valve HIP, modelo 15-41AF1-T, pressão de operação até 1034 bar);
- (3) e (4) Válvulas de esfera que permitem o fluxo de CO₂ para as bombas de alta pressão (Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (5) Banho ultratermostático de recirculação (Nova ética, modelo 512/2D), utilizado para controlar a temperatura das bombas;
- (6) e (7) Bombas de alta pressão compostas por um cilindro de 506 mL de capacidade (ISCO, modelo 500D, pressão de trabalho até 258 bar e vazão máxima de 170 mL·min⁻¹);
- (8) e (9) Válvulas de esfera que permitem o fluxo de CO₂ pressurizado das bombas para a câmara de cocristalização (Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);

(10) Válvula métrica tipo agulha utilizada para controle da vazão de CO₂ das bombas de alta pressão para a câmara de precipitação (HIP, modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);

(11) Câmara de cocristalização cilíndrica de aço inox 316, encamisada, com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm) constituída de cinco entradas na tampa: uma central e quatro periféricas, sendo que uma é mantida fechada;

(12) Entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão utilizado para monitorar a pressão dentro da câmara (Transdutor absoluto – 0 a 250 bar, SMAR, modelo LD301). Está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação;

(13) Entrada periférica para um sensor de temperatura ligado a um indicador de temperatura (Universal, NOVUS, modelo N1500);

(14) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno, disposto na parte interna da câmara de cocristalização e ligado à conexão de liberação do CO₂. Utilizada para retenção das partículas precipitadas no interior da câmara, permitindo apenas o fluxo do fluido supercrítico e do solvente orgânico. Um dos filtros apresenta porosidade de 1 µm, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm servindo de base para o segundo filtro de 0,22 µm de porosidade, 8 mm de diâmetro e 150 µm de espessura;

(15) Banho ultratermostático de recirculação (Nova ética, modelo 512/2D), utilizado para controle da temperatura da câmara de cocristalização;

(16) Válvula métrica tipo agulha (HOKE, modelo 1315G2Y) posicionada na saída da câmara de cocristalização, utilizada para controle do fluxo de liberação do CO₂;

(17) Fita de aquecimento (FISATON, modelo 5, 200 W de potência). Utilizada devido ao efeito Joule-Thomson ser pronunciado pela expansão do CO₂ durante a despressurização congelando a linha de liberação. A temperatura utilizada na fita é de 200°C;

(18) Filtro de segurança recheado com algodão;

(19) Agitador magnético.

3.3.2 Cocrystalização com solvente supercrítico (CSS)

A metodologia experimental para cocrystalização com solvente supercrítico inicia com a pesagem dos componentes puros (princípio ativo e coformador) de modo a obter a razão molar desejada e posterior inserção dos compostos na câmara de cocrystalização, com adição ou não de 200 μL de solvente (acetato de etila, acetona ou etanol).

Simultaneamente, aciona-se o banho ultratermostático (5) a 5 °C com o objetivo de resfriar as bombas de alta pressão. Na sequência, as válvulas (2) e (4) são abertas permitindo o enchimento da bomba (6) com CO_2 . Depois de preenchida com CO_2 , a bomba costuma apresentar um volume de 500 mL e pressão de 58 bar, equivalente à pressão do cilindro de CO_2 . A bomba é então pressurizada a 200 bar.

Realiza-se a montagem da câmara de precipitação e sua conexão com os demais equipamentos, o banho ultratermostático (15) é ligado na temperatura de trabalho (45 °C), o agitador magnético é acionado (19) e as válvulas (8) e (10) são gradualmente abertas, permitindo o enchimento da câmara com CO_2 até atingir a pressão de trabalho (90 bar). Então, as válvulas (8) e (10) são fechadas mantendo o sistema sem entrada de CO_2 durante 60 min. Após este período, a agitação magnética é desligada e a despressurização é feita lentamente, por meio da abertura da válvula (16), até que a câmara atinja a pressão atmosférica.

Após a despressurização, a câmara é aberta e a amostra coletada e armazenada em frasco âmbar a 4 °C para posterior caracterização.

O método CSS foi utilizado na obtenção de cocrystalos de curcumina e resveratrol, com razão molar 1:1, tendo seus resultados apresentados no capítulo 4.

3.3.3 Método gás antissolvente (GAS)

O procedimento inicia com a pesagem dos coformadores de modo a obter a razão molar desejada e subsequente dissolução em solvente orgânico, acetato de etila, acetona ou etanol. A solução obtida é então adicionada à câmara de cocrystalização.

Da mesma forma que no método CSS, procede-se ao acionamento do banho ultratermostático (5) a 5°C de modo a resfriar as bombas de alta pressão. Em seguida as válvulas (2), (3) e (4) são abertas permitindo o enchimento das bombas (6) e (7) com CO₂, para então serem pressurizadas a 200 bar.

Realizada a montagem da câmara de precipitação e sua conexão com os demais equipamentos, o banho ultratermostático (15) é ligado na temperatura de trabalho (45 °C), o agitador magnético é acionado (19) e as válvulas (8) e (10) são gradualmente abertas para permitir o enchimento da câmara com CO₂ até atingir a pressão de trabalho (90 bar). Após atingir a pressão desejada dentro da câmara, a válvula (8) é fechada mantendo o sistema sem vazão de CO₂ durante 10 min.

Decorrido este tempo, as válvulas (9) e (16) são abertas permitindo um fluxo contínuo de CO₂ por meio da câmara. Nesta etapa, a pressão é mantida a 90 bar dentro da câmara. Este processo é realizado durante 50 min e tem por objetivo a secagem do solvente devido à ação antissolvente do fluido supercrítico. Finalizada a secagem, a agitação magnética é desligada, as válvulas (9) e (10) são fechadas e a despressurização é feita lentamente, por meio da abertura da válvula (16), até que a câmara atinja a pressão atmosférica.

Após a despressurização, a câmara é aberta e a amostra coletada e armazenada em frasco âmbar a 4 °C para posterior caracterização.

Neste trabalho, a técnica GAS foi empregada na tentativa de produção de cocristais de curcumina e resveratrol, com resultados apresentados no capítulo 4, utilizando-se razão molar 1:1 e volume de solvente (acetato de etila, acetona e etanol) igual a 10 mL. A obtenção de cocristais de resveratrol e L-prolina, cujos resultados são tratados no capítulo 5, também foi realizada pelo método GAS, na proporção 1:2 e com volume de etanol igual a 30 mL.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Na presente seção, são apresentadas as técnicas empregadas para caracterização das amostras obtidas a partir das diferentes metodologias para obtenção de cocristais utilizadas.

3.4.1 Análise térmica

Os perfis calorimétricos das amostras obtidas em todas as técnicas de produção de cocristais, dos compostos formadores puros e da mistura física dos compostos foram analisados visando observar alterações no ponto de fusão decorrentes do processo de cocrystalização.

As curvas 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 30 a 300 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL·min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C·min⁻¹.

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

3.4.2 Difração de raio-X de pó (DRXP)

A análise de DRXP foi realizada utilizando um equipamento θ - θ D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre K α ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$), 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 de 2θ na faixa de 5 a 40° e com passo angular de 0,091°·s⁻¹.

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

3.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos em temperatura ambiente a partir de um equipamento Agilent Technologies (Cary 600 Series FTIR Spectrometer) equipado com ATR (Attenuated Total Reflectance – refletância total atenuada) com cristal ZnSe, em uma faixa espectral de 4000 a 400 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.

3.4.4 Morfologia e determinação da distribuição de tamanho de partícula

A análise da morfologia das partículas produzidas em meio supercrítico, bem como dos coformadores puros, foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura. A análise foi conduzida no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, em microscópio eletrônico JEOL JSM6390LV (MEV), Estados Unidos. As partículas foram aderidas adequadamente em “stubs” com fita carbono de dupla face, recobertas com ouro (camada de 30 nm de espessura) e submetidas à análise com visualização realizada em aumentos de 50 a 3000 vezes, aplicando tensão de 10 kV.

As imagens obtidas foram utilizadas para determinar o tamanho das partículas com auxílio do software SizeMeter (versão 1.1, desenvolvido por Luiz Henrique Castelan Carlson), levando-se em consideração o comprimento médio da linha diagonal de 200 partículas para cada amostra. A partir dos dados de tamanho de partícula, determinou-se a distribuição normal de tamanho de partícula utilizando o Excel, onde a moda foi utilizada como um indicativo do tamanho médio de partícula (valor mais provável) (ALXNEIT, 2020).

3.4.5 Determinação da capacidade de inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

As amostras processadas utilizando fluido supercrítico, assim como os coformadores puros, a mistura física dos compostos puros e o antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) foram avaliados quanto à capacidade antioxidante pelo método de inibição do radical DPPH de acordo com Khan et al. (2016). A análise consiste na reação das partículas em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mM, com concentrações crescentes das partículas analisadas (10, 25, 50, 75, 90, 125 e 185 mg·mL⁻¹), por 30 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o tempo de reação, a absorbância das amostras é lida em

espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm. O percentual de inibição das amostras sobre o radical DPPH é calculado convertendo-se as absorbâncias em percentual de atividade antioxidante de acordo com a Equação 1.

$$AA (\%) = 100 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde, $Abs_{amostra}$ é absorbância da amostra, Abs_{branco} é absorbância do branco (meio sem DPPH) e $Abs_{controle}$ é absorbância do controle (meio sem amostra). Com os dados obtidos, a atividade antioxidante vs concentração é plotada e utilizada para determinar o valor de EC_{50} , definido como a mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

Com o objetivo de determinar diferenças significativas nos resultados da capacidade de inibição do radical DPPH das amostras processadas, mistura física e compostos puros, os valores de EC_{50} foram avaliados por análise unidirecional de variância ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

As determinações da capacidade de inibição do radical DPPH referentes ao sistema curcumina-resveratrol, com resultados descritos no Capítulo 4, foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC, utilizando-se espectrofotômetro MULTILEITORA INFINITE M200 TECAN. Por sua vez, as análises relativas ao sistema resveratrol-L-prolina foram feitas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, com leitura das absorbâncias em espectrofotômetro PerkinElmer Lambda 45 UV/Vis Spectrophotometer.

3.4.6 Identificação e quantificação de solvente residual

O percentual de solvente residual presente na amostra RES-PRO obtida por GAS foi determinado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent GC 7890 A acoplado com detector de ionização de chama (CG-FID) em frasco de *headspace*, segundo metodologia descrita por Santos et al. (2022). As condições de operação são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições de operação de CG-FID.

Parâmetros	
Porta de injeção	Interfaces voláteis
Temperatura	160 °C
Split ratio	Sem split
Gás carregador	Hélio
Fluxo transportador	0,8 mL·min ⁻¹
CG Programação do forno	
Temperatura inicial	40 °C
Tempo inicial	3 min
Razão	40 °C por 3 min, seguido de 20 °C·min ⁻¹ a 90 °C por 1 min e então 30 °C·min ⁻¹ a 140 °C por 2 min
Temperatura final	250 °C
Tempo total de execução	9,91 min
Coluna	30 m × 250 µm × 0.25 µm
Condições do <i>Headspace</i>	
Volume de injeção	500 µL
Tamanho da seringa	2,5 mL-HS
Temperatura de incubação	85 °C
Tempo de incubação	600 s
Temperatura da seringa	105 °C
Temperatura do detector	250 °C
Velocidade do agitador	250 rpm
Modelo	Agilent GC auto Sampler 80

Fonte: elaborado pelo autor

Um amostrador automático (*headspace sampler*), injetor CGSampler 80 e coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Agilent), 30 m x 250 µm x 0,25 µm, composta por 5% de fenil-95% de metilpolisiloxano foram utilizados nas análises. Para quantificação do teor de solvente, uma curva de calibração tendo etanol como padrão foi elaborada (Apêndice A).

3.4.7 Análise de solubilidade

A solubilidade dos compostos ativos curcumina e resveratrol no cocrystal obtido por CSS com acetona (resultados no Capítulo 4) foi avaliada em comparação à solubilidade dos compostos puros nos seguintes solventes: água deionizada, solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M e solução tampão fosfato (pH 6,8). O procedimento consistiu na adição de uma quantidade em excesso (100 µg) de cada amostra em erlenmeyers de vidro contendo 100 mL dos solventes avaliados. Os erlenmeyers foram sonicados por 10 min e então incubados em *shaker* orbital (Marconi, modelo MA410 CFT) com temperatura controlada em 37 °C e rotação de 100 rpm durante 72 h. Após este período, as amostras foram filtradas (0,45 µm VertiClean™ PTFE) e lidas em espectrofotômetro UV-vis (MULTILEITORA INFINITE M200 TECAN) a 435 nm e 326 nm para determinação da concentração de curcumina e resveratrol, respectivamente, presentes nas amostras (AGUIAR et al., 2018). As curvas padrão de curcumina e resveratrol foram produzidas por diluições seriadas dos compostos e são apresentadas no Apêndice B. A análise de solubilidade foi realizada nos laboratórios Multiusuário em Alimentos (MULTIALI) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC.

3.4.8 Perfil de dissolução *in vitro*

A análise de dissolução *in vitro* dos cocrystal, dos compostos ativos curcumina e resveratrol puros, das misturas físicas CUR-RES e RES-PRO foi realizada baseada na metodologia descrita por Dal Magro et al. (2017) e Scapinello et al. (2018).

Para o sistema CUR-RES, adicionou-se um excesso de amostra (10 mg) a erlenmeyers contendo 100 mL de água deionizada. Os erlenmeyers foram então mantidos sob agitação constante de 100 rpm a temperatura de 37 °C (Marconi, model MA410 CFT). Em intervalos de tempo específicos, 0, 10, 20, 30, 50, 80, 120 e 180 min, coletou-se 1 mL da solução, o qual foi imediatamente repostado por água destilada para manutenção do volume inicial constante. A alíquota coletada foi filtrada (0,45 µm

VertiClean™ PTFE) e analisada por espectrofotometria UV–vis (MULTILEITORA INFINITE M200 TECAN) a 435 nm e 326 nm para determinação das concentrações de curcumina e resveratrol, respectivamente. Os comprimentos de onda utilizados para análise espectrofotométrica foram determinados por meio de varredura realizada previamente. O estudo do perfil de dissolução *in vitro* foi realizado nos laboratórios MULTIALI do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e LAMEB do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

A avaliação do perfil de dissolução do resveratrol no sistema resveratrol-L-prolina seguiu a mesma metodologia, com exceção dos equipamentos utilizados para análise: a agitação e manutenção da temperatura durante o processo de dissolução foram realizadas por meio de Dubnoff Reciprocal Shaker Ethik Technology, modelo 304-TPA; e a análise espectrofotométrica das alíquotas coletadas ao longo do tempo foi realizada em espectrofotômetro PerkinElmer Lambda 45 UV/Vis Spectrophotometer. O estudo foi realizado no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica e na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados em parceria com a Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Para estes testes foi escolhido o cocrystal de curcumina e resveratrol produzido por CSS com acetona como cossolvente, visto que esta foi a única condição experimental estudada que resultou na produção de cocrystal.

3.5.1 Animais

Para os testes comportamentais (*in vivo*), camundongos Swiss machos criados internamente na Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ) foram usados em todos os experimentos. Os animais foram mantidos em ambiente controlado com temperatura de 22 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 6 h da manhã até às 18 h), alimentados com ração de

laboratório padrão e água *ad libitum*. Os cuidados com os animais e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da pesquisa em animais, com a legislação brasileira (Brasil, 2018, 2008) e de acordo com a Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias de 24 de novembro de 1986 (86/609/CEE) e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Comunitária Regional de Chapecó (número de aprovação 007-17), conforme certificado no Anexo D. Todos os experimentos foram realizados entre às 9 h e às 14 h.

3.5.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A atividade antinociceptiva/anti-inflamatória do cocrystal foi investigada utilizando o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, de acordo com método previamente descrito por Walker et al. (2008). Camundongos Swiss machos (27 ± 5 g) foram utilizados neste experimento. Para tanto, os animais foram divididos em grupos ($n = 8$) e tratados oralmente com o cocrystal de curcumina-resveratrol ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ou com a mistura física de curcumina ($0,31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e resveratrol ($0,19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) – de acordo com suas proporções no cocrystal – ou pura curcumina ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou $0,31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ou puro resveratrol ($0,19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Indometacina ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) foi utilizada como controle positivo. As gavagens ocorreram 1 h antes da aplicação de 0,6% de ácido acético ($0,1 \text{ mL}\cdot 10 \text{ g}^{-1}$, i.p). A contagem de contorções foi realizada durante 20 min. Todas as substâncias foram dissolvidas em água destilada (veículo), exceto o ácido acético, o qual foi dissolvido em solução salina. A dose de curcumina utilizada foi determinada com base em estudo prévio (SRIMAL; DHAWAN, 1973).

3.5.3 Teste de campo aberto

Os efeitos da administração do cocrystal CUR-RES ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) na atividade locomotora dos animais foi avaliado por meio do teste de campo aberto, de acordo com Müller et al. (2012). O aparato utilizado para o teste consistiu em uma caixa de acrílico com o fundo dividido em quadrantes iguais ($40 \times 30 \times 30$ cm). Camundongos Swiss machos (32 ± 1 g) foram utilizados para o teste. Os animais ($n = 8$) foram

tratados oralmente com o cocrystal de curcumina-resveratrol ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), por meio de gavagem única, 1 h antes do teste de campo aberto. O cocrystal foi dissolvido em água destilada com auxílio de ultrassom. Finalmente, os animais foram colocados individualmente no centro do aparato experimental e o número de *crossings* (cruzamentos entre os quadrantes do aparato), *rearings* (exploração vertical do aparato), *groomings* (comportamento de auto-limpeza) e bolos fecais foram registrados durante 10 min.

3.5.4 Análise estatística dos testes *in vivo*

Os resultados do teste de contorções induzidas por ácido acético foram analisados pela análise unidirecional de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. A avaliação dos resultados do teste de campo aberto foi realizada pelo Teste t não pareado. O software GraphPad Prism 5.01 foi utilizado para realização das análises estatísticas. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS I

Produção de cocrystal de curcumina-resveratrol utilizando cocrystalização com solvente supercrítico

Neste capítulo são apresentados os principais resultados obtidos a partir das diferentes técnicas utilizadas para produção de cocrystal de curcumina e resveratrol. Foram testadas técnicas convencionais, a baixa pressão, sendo elas: moagem assistida por líquido e evaporação lenta do solvente. Também foram avaliadas técnicas que utilizam fluido supercrítico, seja na forma de solvente, por meio da técnica CSS, ou como antissolvente, por meio da técnica GAS. Para todos os métodos avaliados, curcumina e resveratrol foram utilizados na proporção 1:1. Nas diferentes técnicas, os seguintes solventes foram empregados: acetato de etila, acetona e etanol.

Em todas as condições avaliadas, com exceção do emprego da técnica GAS utilizando etanol como solvente, foi obtido uma quantidade de amostra suficiente para ser analisada pelas diferentes técnicas de caracterização de partículas. Neste caso específico, a quantidade de amostra resultante foi muito pequena, mesmo depois de repetidos testes, sendo insuficiente para sua caracterização.

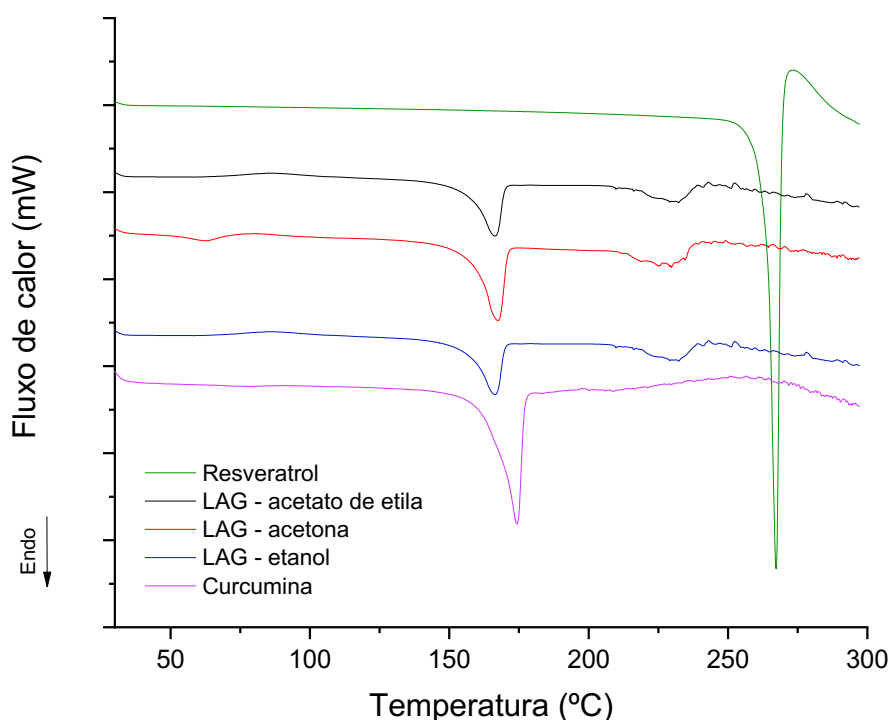
Apenas a análise de microscopia eletrônica de varredura pode ser realizada, visto que utiliza uma quantidade extremamente pequena de amostra. Este resultado pode estar relacionado à elevada solubilidade dos coformadores na mistura etanol + CO₂ supercrítico (BERNA; CHÁFER; MONTÓN, 2001; CUNICO; ACOSTA; TURNER, 2017), não ocorrendo o efeito antissolvente que promove a precipitação e cocrystalização dos compostos na câmara de precipitação, ou à formação de partículas de tamanho muito reduzido, capazes de passar pelo filtro de politetrafluoretileno cuja porosidade é 0,22 µm, que teriam sido arrastadas por meio do fluxo de CO₂ para fora da câmara de precipitação.

A análise térmica por DSC foi utilizada como uma avaliação inicial da formação de cocrystal, uma vez que o ponto de fusão dos compostos costuma ser afetado pelo processo de cocrystalização.

4.1 ANÁLISE TÉRMICA

O comportamento térmico das amostras produzidas por moagem assistida por líquido (LAG) utilizando acetato de etila, acetona ou etanol como cossolvente, bem como da curcumina e resveratrol puros, são apresentados na Figura 5. Curcumina e resveratrol puros apresentaram um único pico endotérmico em 174,3 °C e 277,3 °C, respectivamente. Todas as amostras produzidas por LAG apresentaram mais de um ponto de fusão, indicativo da presença de mais de uma fase cristalina na amostra e, portanto, não sendo consideradas para as próximas análises.

Figura 5 – DSC da curcumina, resveratrol e das amostras CUR-RES produzidas por LAG com acetato de etila, acetona e etanol.

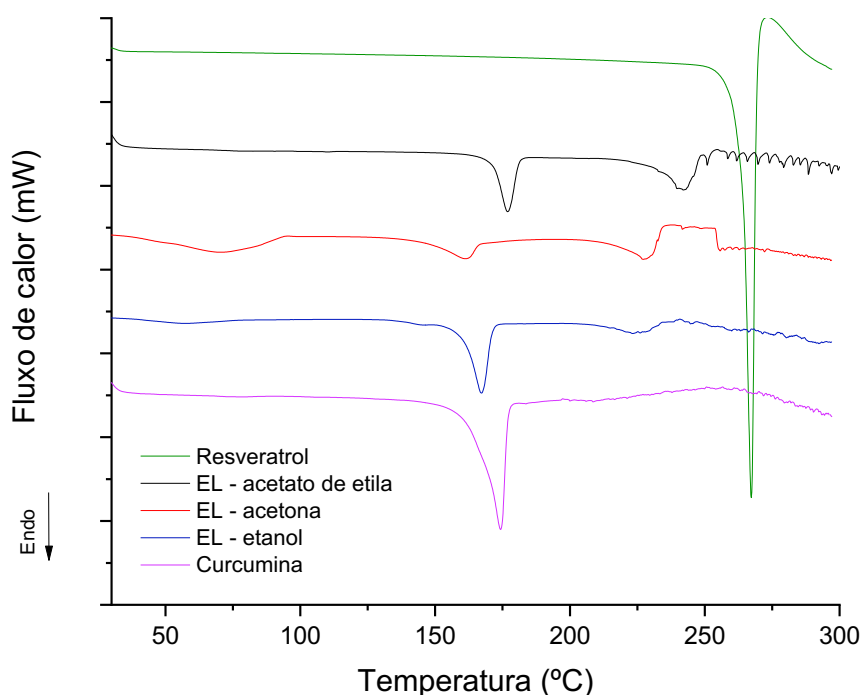


Fonte: elaborado pelo autor.

Da mesma forma, as amostras obtidas por evaporação lenta com os diferentes solventes avaliados foram analisadas por DSC e os termogramas obtidos,

juntamente com os termogramas da curcumina e resveratrol puros, são apresentados na Figura 6. As amostras produzidas por este método também apresentaram mais de um pico endotérmico, sendo assim desconsideradas para as análises posteriores.

Figura 6 – DSC da curcumina, resveratrol e das amostras CUR-RES produzidas por evaporação lenta com acetato de etila, acetona e etanol.

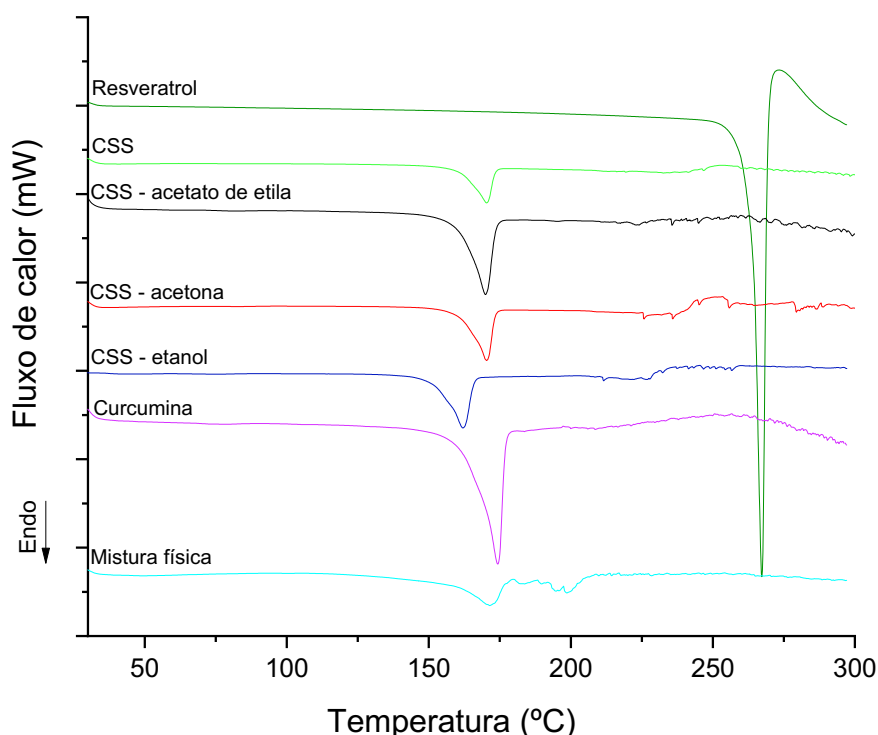


Fonte: elaborado pelo autor.

Por sua vez, as amostras produzidas pela técnica CSS nas diferentes condições (sem uso de cossolvente e com acetato de etila, acetona ou etanol como cossolventes) apresentaram um único evento endotérmico, conforme apresentado na Figura 7, inferior aos pontos de fusão da curcumina (174,3 °C) e resveratrol (277,3 °C) puros. Os picos foram observados em 170,4 °C para a amostra obtida sem uso de cossolvente, 169,9 °C para a amostra obtida utilizando-se acetato de etila como cossolvente, 170,4 °C para a amostra que utilizou acetona e 161,9 °C para a amostra produzida com uso de etanol como cossolvente. A existência de um pico único na

curva de DSC representa uma amostra com estrutura cristalina homogênea, que pode tratar-se de cocrystal (PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017).

Figura 7 – DSC da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por CSS.



Fonte: elaborado pelo autor.

A mistura física de curcumina e resveratrol nas mesmas concentrações utilizadas para obtenção dos cocristsais foi analisada para comparação com as demais amostras, sendo também apresentada na Figura 7. Observou-se, para a mistura física, um pico endotérmico em 171,5 °C que pode ser atribuído à fusão de um eutético metaestável. Este pico endotérmico foi imediatamente seguido por um evento exotérmico atribuído à cocrystalização induzida pelo calor e, na sequência, outro evento endotérmico em 198,6 °C devido à fusão deste cocrystal. Tal comportamento é característico de misturas propícias à formação de cocrystal (YAMASHITA et al., 2013). Já as amostras obtidas por CSS apresentaram curvas de DSC com um evento

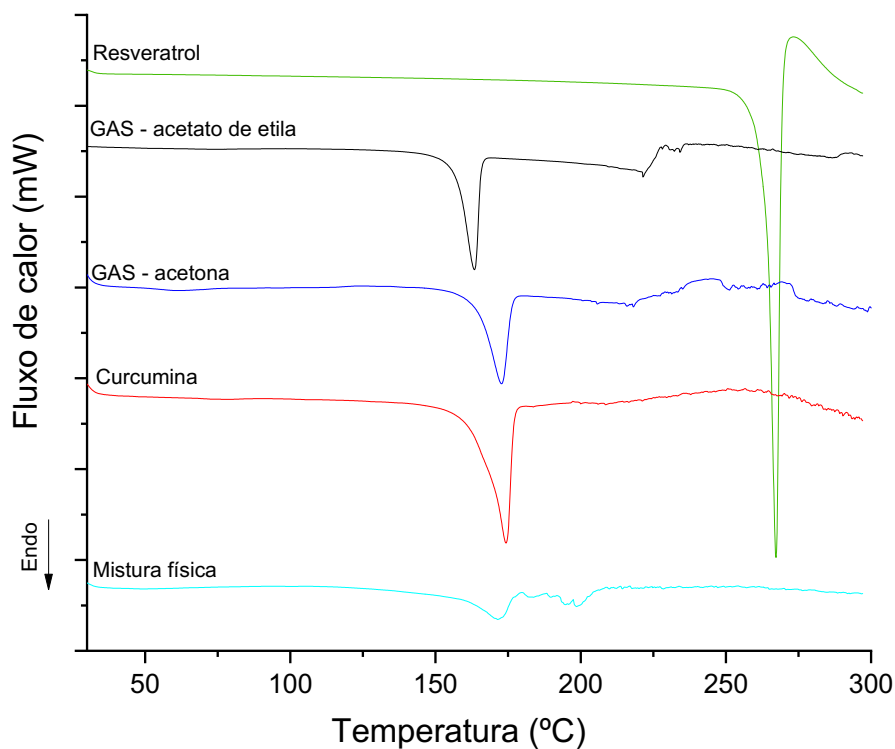
endotérmico e nenhum evento exotérmico, o qual se relacionaria à cocrystalização induzida pelo calor. Assim, este único evento endotérmico observado refere-se à fusão de cocrystal previamente formado por outro mecanismo, uma vez que a técnica CSS empregada para produção de cocrystalis foi conduzida na temperatura de 45 °C, muito inferior aos pontos de fusão apresentados.

Todas as amostras apresentaram temperaturas de fusão inferiores ao ponto de fusão dos componentes puros, o que se relaciona à existência de uma estrutura cristalina mais fraca (PADRELA et al., 2010). Observa-se que as três primeiras amostras produzidas por este método apresentaram pontos de fusão muito próximos, enquanto a amostra obtida utilizando etanol apresentou temperatura de fusão cerca de 10 °C inferior às demais, o que sugere diferenças também em sua estrutura cristalina. Para confirmar a formação de cocrystal, as amostras obtidas por CSS foram então analisadas por DRXP, sendo os resultados obtidos apresentados na seção seguinte.

As curvas de DSC das amostras produzidas por meio da técnica GAS utilizando acetato de etila e acetona como solventes, juntamente com as curvas da curcumina e resveratrol puros e da mistura física dos compostos, são apresentadas na Figura 8. Ambas as amostras apresentaram apenas um evento endotérmico, localizado em 163,4 °C para a amostra tendo como solvente acetato de etila e em 172,8 °C para a amostra obtida utilizando acetona. Assim, as amostras produzidas por GAS foram também analisadas por DRXP, cujos resultados são apresentados na sequência.

As amostras que apresentaram um único evento endotérmico diferente daquele apresentado pelos compostos puros foram selecionadas, pois indicam a possível formação de uma nova fase cristalina. Em seguida, realizou-se a análise de DRXP para comprovar a formação de uma nova fase cristalina a partir do deslocamento ou mudança nos padrões de difração das amostras.

Figura 8 – DSC da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por GAS.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 DIFRAÇÃO DE RAIO-X DE PÓ (DRXP)

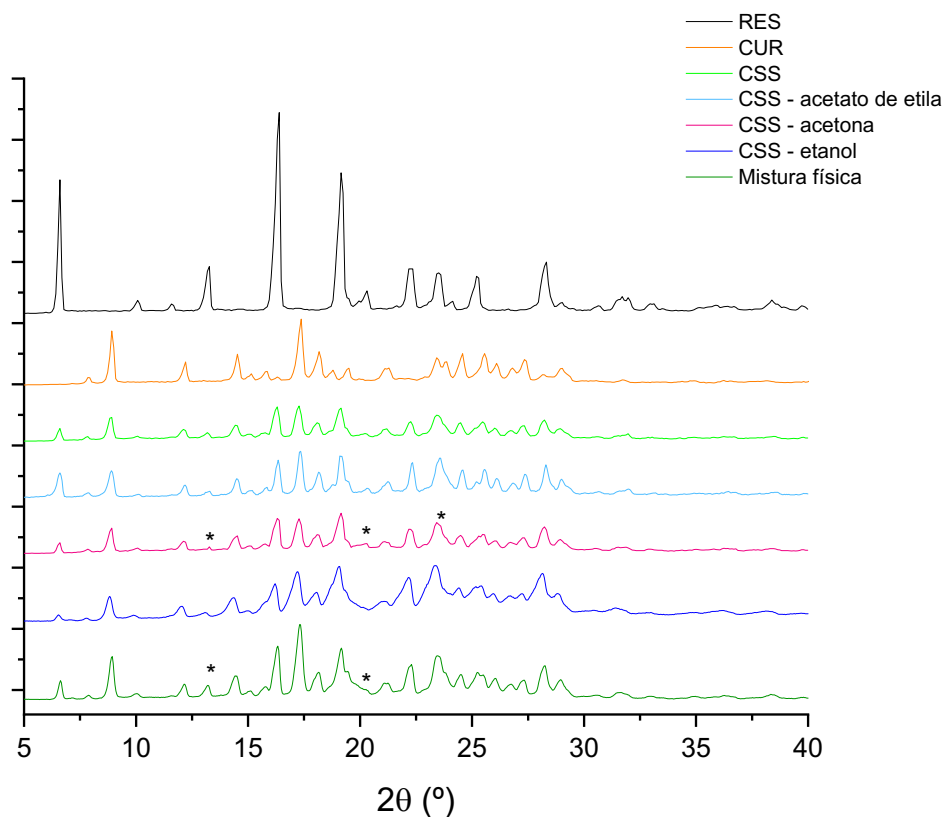
A técnica de DRXP é a principal ferramenta utilizada para caracterizar estruturas policristalinas, uma vez que diferentes padrões de difração correspondem a diferentes estruturas cristalinas. Estas estruturas podem representar diferentes compostos ou vários polimorfos, solvatos, sais e cocristais de um determinado composto ativo (KARA; RATHNANAND, 2022).

As amostras produzidas a partir dos diferentes métodos, que apresentaram um único evento endotérmico na análise térmica, foram submetidas a análise de DRXP e os padrões obtidos foram comparados aos da curcumina e resveratrol puros, com o objetivo de confirmar a formação dos cocristais. Tal confirmação pode ser feita a partir da observação de deslocamentos, aparecimentos ou desaparecimentos de

reflexões características dos compostos, o que se relaciona à formação de uma nova fase cristalina.

Os padrões de DRXP da curcumina e resveratrol puros, da mistura física dos compostos, bem como das amostras produzidas por CSS sem uso de cossolvente, com acetato de etila, acetona ou etanol como cossolvente, são apresentados na Figura 9. A curcumina apresentou reflexões características em $7,8^\circ$, $8,9^\circ$, $12,2^\circ$, $14,5^\circ$, $17,4^\circ$, $18,2^\circ$, $21,2^\circ$, $23,4^\circ$, $23,9^\circ$, $24,6^\circ$, $25,6^\circ$, $26,1^\circ$, $26,8^\circ$, $27,3^\circ$ e $29,0^\circ$ 2θ , enquanto as reflexões características do resveratrol foram observadas em $6,6^\circ$, $13,2^\circ$, $16,3^\circ$, $19,1^\circ$, $20,3^\circ$, $22,2^\circ$, $23,5^\circ$, $25,2^\circ$ e $28,3^\circ$ 2θ . Os padrões obtidos para ambos os compostos correspondem a dados presentes na literatura (ZHAO et al., 2015; DAL MAGRO et al., 2017).

Figura 9 – DRXP da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por CSS.



Fonte: elaborado pelo autor.

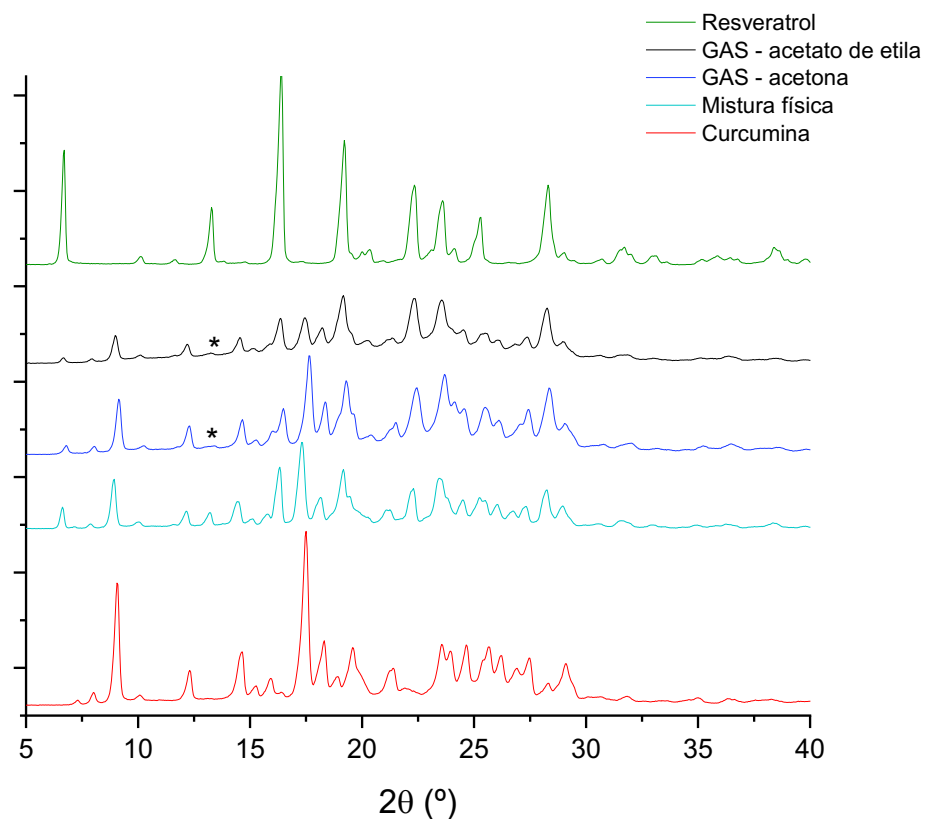
O padrão de DRXP da mistura física apresentou a sobreposição dos padrões dos compostos puros, com todas as reflexões características da curcumina e do resveratrol presentes, com alguns leves deslocamentos. No caso dos padrões das amostras obtidas por CSS, observa-se que algumas reflexões se sobrepõem às reflexões dos compostos puros, porém, algumas reflexões características desapareceram ou foram deslocadas. Nos padrões das quatro amostras houve o desaparecimento da reflexão em $23,9^\circ 2\theta$, característica da curcumina. O mesmo acontece para a amostra CSS-acetona e CSS-etanol em $20,3^\circ 2\theta$ para a reflexão características do resveratrol. Em $13,2^\circ 2\theta$, também reflexão característica do resveratrol, percebe-se o desaparecimento da reflexão no caso da amostra produzida com acetona. Para essa amostra, observou-se também o deslocamento, pelo surgimento de novas reflexões, de reflexões comparadas à curcumina em $12,1^\circ$, $17,2^\circ$, $18,1^\circ$, $24,5^\circ$, $25,4^\circ$ e $28,9^\circ 2\theta$, e em $28,2^\circ 2\theta$ em comparação ao resveratrol. As diferenças mais significativas entre o perfil de difração da amostra e da mistura física estão marcados na Figura 9 com um asterisco.

A redução da intensidade das reflexões observada nas amostras processadas está relacionada a um menor grau de cristalinidade, sendo que a intensidade dos picos de difração e sua área aumentam proporcionalmente com o aumento do grau de cristalinidade (PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017).

Diante das circunstâncias observadas, considerou-se que a amostra produzida por CSS tendo acetona como cossolvente pode se tratar de uma nova estrutura cristalina, indicativa de cocrystal.

Por sua vez, os padrões de DRXP da curcumina, resveratrol, mistura física e amostras produzidas por GAS utilizando acetato de etila e acetona como solventes são apresentados na Figura 10. Novamente, percebe-se nos padrões de DRXP das amostras produzidas por GAS que muitas reflexões se sobrepõem às reflexões dos compostos puros, com exceção da reflexão em $13,2^\circ 2\theta$, característica do resveratrol, que desapareceu em ambas as amostras. Por esta razão, pode-se considerar que o processo GAS não foi eficiente para produção de cocrystal de curcumina e resveratrol nas condições estudadas, sendo as amostras produzidas desconsideradas nas análises subsequentes.

Figura 10 – DRXP da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e das amostras CUR-RES produzidas por GAS.



Fonte: elaborado pelo autor.

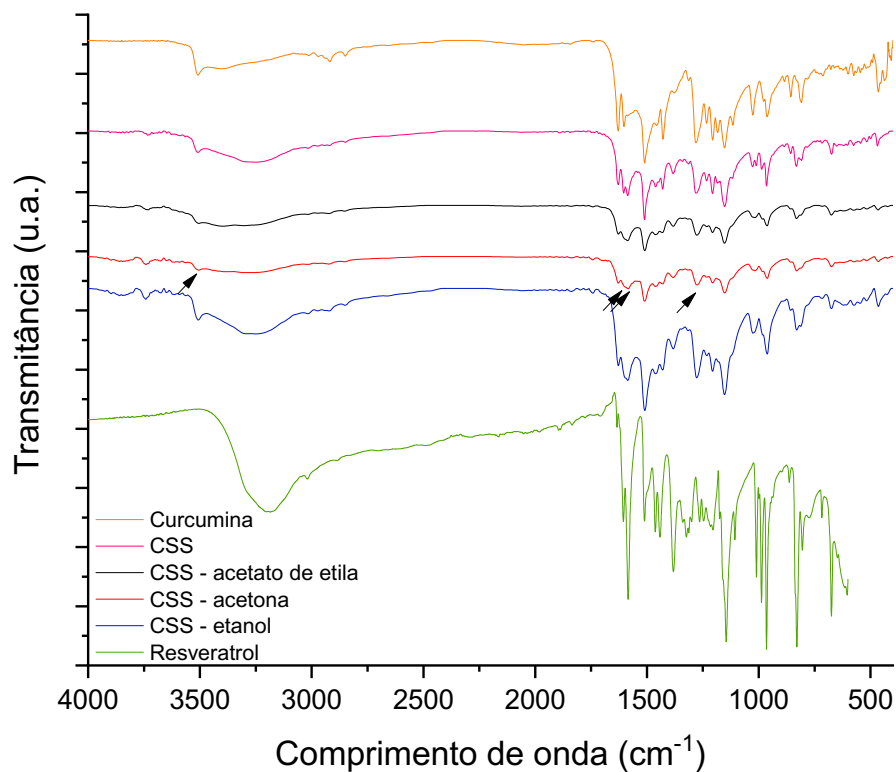
4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Diante dos resultados observados nas análises térmica e de difração de raio-X de pó, as amostras produzidas por CSS tiveram suas interações químicas investigadas por FTIR e os espectros obtidos foram comparados aos da curcumina e resveratrol puros, conforme Figura 11.

Observou-se que a curcumina apresenta bandas características em 3509 cm^{-1} , correspondente à frequência de estiramento do O–H fenólico, 1627 e 1602 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento do C=O e C=C do grupo aromático, respectivamente, 1427 cm^{-1} referente à curvatura do plano C–O no enol e 1280 cm^{-1} devido ao estiramento do C–O aromático (CHOW et al., 2014; SANPHUI et al., 2011). Por sua vez, o espectro

do resveratrol apresenta as maiores absorções correspondendo ao estiramento do O–H como uma ampla absorção entre 3204 e 3184 cm^{-1} , estiramento do C=C aromático em 1606 cm^{-1} e estiramento da ligação C=C olefínica em 1584 cm^{-1} . Em 964 cm^{-1} observa-se a banda característica da forma trans do resveratrol (AGARWAL; KHARB; SAHARAN, 2014).

Figura 11 – FTIR da curcumina, resveratrol e das amostras CUR-RES produzidas por CSS.



Fonte: elaborado pelo autor.

No caso da amostra produzida por CSS sem cossolvente, a banda correspondente ao estiramento do O–H manteve-se em 3509 cm^{-1} , como apresentado pela curcumina, observando-se o mesmo comportamento nas demais bandas, idênticas aos compostos puros. Já no espectro das amostras obtidas com cossolvente, a banda correspondente ao estiramento do O–H fenólico foi observada

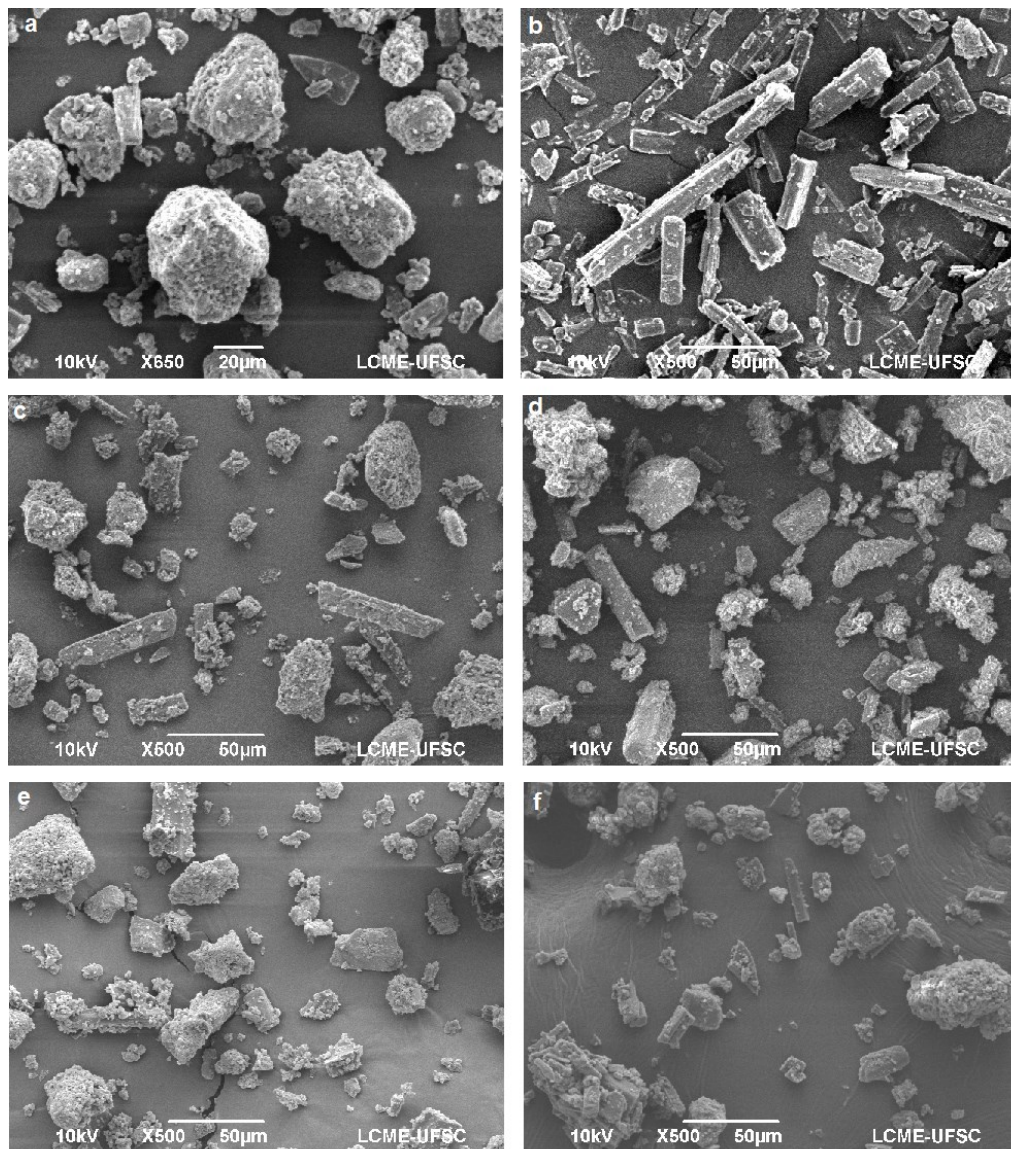
em 3504 cm^{-1} para a amostra CSS-acetato de etila e 3507 cm^{-1} para a amostra CSS-etanol. As amostras CSS, CSS-acetato de etila e CSS-etanol apresentaram também uma absorção alargada correspondendo ao estiramento do O–H por volta de 3300 a 3210 cm^{-1} , de modo semelhante ao observado para o resveratrol. Já a banda correspondente ao estiramento C=C aromático foi mudada para 1598 cm^{-1} nas três amostras. Em relação à ligação C=C olefínica, a amostra CSS-acetona apresentou a banda correspondente em 1583 cm^{-1} , que foi mantida em 1585 nos demais espectros. A banda referente à curvatura do plano C–O no enol também foi observada em 1429 cm^{-1} para as três amostras. Por fim, nos três casos, a banda relativa ao estiramento do C–O aromático foi alterada para 1276 cm^{-1} .

Nos espectros das três amostras produzidas por CSS com cossolvente, percebe-se que as alterações mais representativas, em comparação aos espectros da curcumina e resveratrol puros, estão relacionadas ao ambiente químico relativo aos grupos fenólicos, sugerindo a ocorrência de interações intermoleculares nestes locais. Embora as variações nos resultados de FTIR sejam relativamente sutis para identificar claramente variação na estrutura química da amostra, os resultados corroboram com aqueles apresentados nas análises de DSC e DRXP, os quais são mais representativos no que diz respeito às interações entre os coformadores que resultam em cocrystal.

4.4 MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA

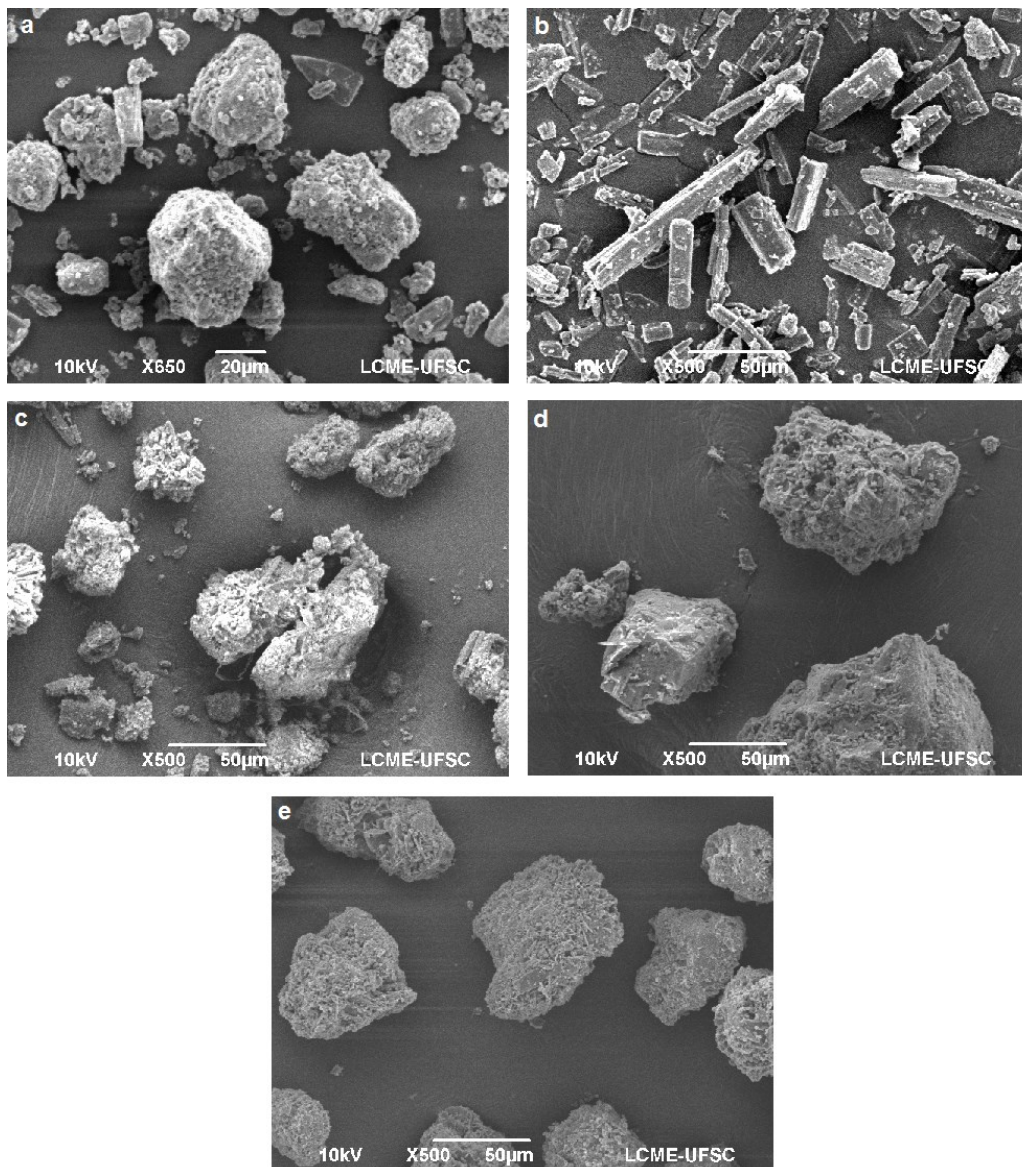
Embora apenas a amostra produzida por CSS com acetona como cossolvente tenha sido considerada um cocrystal, todas as amostras processadas em meio supercrítico foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, com o objetivo de avaliar o efeito dos processos na morfologia e tamanho das partículas. As imagens MEV obtidas para curcumina, resveratrol e amostras produzidas por CSS (Figura 12) e GAS (Figura 13) são apresentadas a seguir.

Figura 12 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da (a) curcumina, (b) resveratrol, (c) amostras produzidas por CSS, (d) CSS com acetato de etila, (e) com acetona e (f) com etanol.



Fonte: elaborado pelo autor.

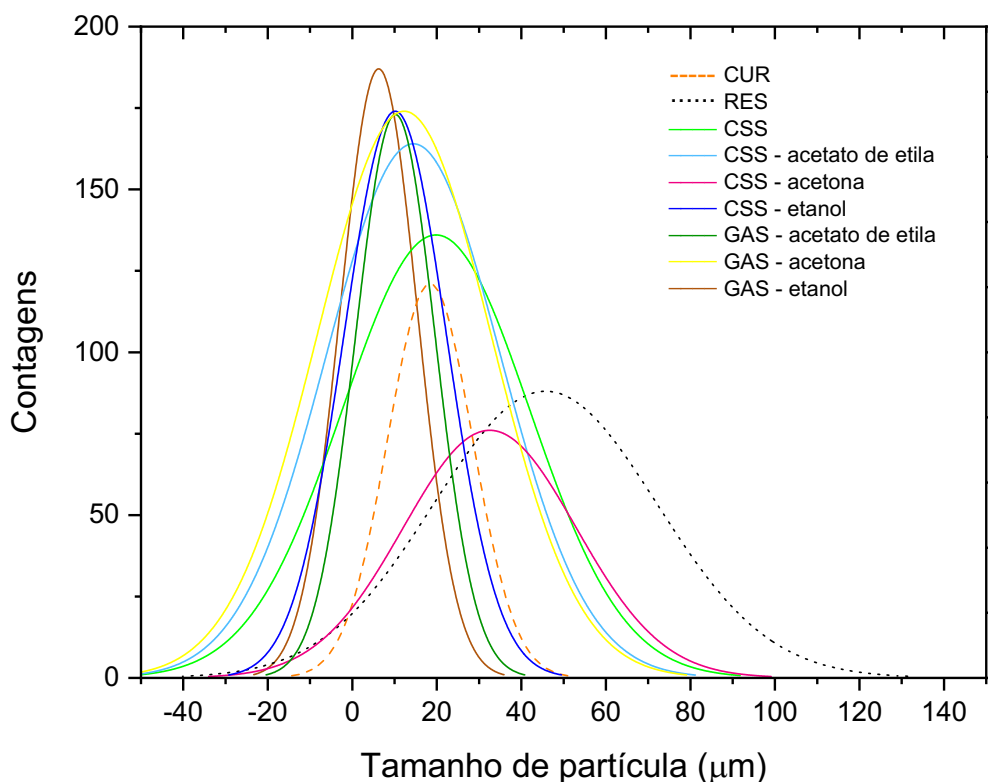
Figura 13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da (a) curcumina, (b) resveratrol, (c) amostras produzidas por GAS com acetato de etila, (d) com acetona e (e) com etanol.



Fonte: elaborado pelo autor.

Assim como a curcumina e o resveratrol puros, todas as amostras produzidas por CSS e GAS apresentaram morfologia irregular, com elevado índice de aglomeração e uma ampla variação de tamanho. As micrografias obtidas foram também utilizadas para determinação da distribuição normal de tamanho de partícula, apresentada na Figura 14.

Figura 14 – Distribuição normal de tamanho de partícula da curcumina (laranja), resveratrol (preto), amostra processada por CSS sem cossolvente (verde claro), CSS-acetato de etila (azul claro), CSS-acetona (rosa), CSS-etanol (azul escuro), GAS-acetato de etila (verde escuro), GAS-acetona (amarelo) e GAS-etanol (marrom).



Fonte: elaborado pelo autor.

A partir da curva de distribuição normal, observa-se que o processo CSS utilizando etanol como cossolvente e o método GAS resultaram na produção de partículas com distribuição de tamanho mais estreita em comparação ao resveratrol puro (variação de mais de 100 μm), embora próxima à observada para a curcumina, com uma variação de aproximadamente 50 μm , exceto para a amostra produzida por GAS com acetona. Esta amostra apresentou distribuição de tamanho um pouco mais ampla, intermediária entre o observado para os compostos puros, assim como as amostras produzidas por CSS sem cossolvente e com acetato de etila.

Em ambos os processos, a utilização de etanol resultou na obtenção de partículas menores e mais homogêneas, sendo o menor tamanho médio observado

(valor mais provável) de 6,3 μm para a amostra GAS-etanol, justamente o processo que resultou em quantidade de amostra insuficiente para caracterização pelas demais análises. Este resultado corrobora com a hipótese de que as partículas produzidas nesta condição experimental, em sua maioria, não puderam ser retidas pelo filtro de politetrafluoretileno, tendo sido arrastadas para fora da câmara de precipitação. Por outro lado, a utilização de acetona influenciou a produção de partículas com distribuição de tamanho mais ampla, especialmente no caso do método CSS, em que o maior tamanho médio foi observado, 32,5 μm .

4.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

Assim como na análise de microscopia eletrônica de varredura, as amostras produzidas pelos métodos CSS e GAS foram avaliadas quanto a sua capacidade antioxidante por meio do ensaio de inibição do radical DPPH e comparadas aos resultados obtidos para a curcumina e resveratrol puros, além de uma mistura física dos compostos na mesma proporção utilizada nos experimentos supercríticos e do antioxidante sintético BHT, comumente utilizado pelas indústrias alimentícia e farmacêutica. O radical DPPH apresenta absorvância a 517 nm, porém, quando reduzido por um antioxidante sua absorção decresce. Quando um átomo de hidrogênio ou um elétron é transferido ao elétron ímpar do DPPH \cdot , a absorvância em 517 nm decresce proporcionalmente ao aumento das formas não-radicais do DPPH (ANCEREWICZ et al., 1998). Os valores de EC_{50} obtidos, que se referem à concentração mínima necessária para inibir 50% do radical livre DPPH, são apresentados na Tabela 2.

Curcumina e resveratrol puros apresentaram valores de EC_{50} próximos a resultados encontrados na literatura (AK; GÜLÇİN, 2008; SAKATA et al., 2021), não tendo sido observado melhora na capacidade antioxidante para a mistura física dos compostos, visto que o EC_{50} obtido não difere significativamente do apresentado pela curcumina.

Tabela 2 – Valores de EC₅₀ obtidos para curcumina e resveratrol puros, para a mistura física dos compostos, para as amostras processadas por meio das técnicas CSS e GAS e para o BHT, utilizado como padrão.

Amostra	EC₅₀ (µg·mL⁻¹)
Curcumina	30,4 ± 0,9 ^{ab}
Resveratrol	31,9 ± 0,3 ^a
CSS	17,6 ± 0,7 ^{gh}
CSS – acetato de etila	22 ± 2 ^{ef}
CSS – acetona	14,3 ± 0,3 ^h
CSS – etanol	25,4 ± 1,4 ^{cd}
GAS – acetato de etila	21,7 ± 0,2 ^{ef}
GAS – acetona	22,5 ± 1,4 ^{de}
Mistura física	27 ± 1,0 ^{bc}
BHT	19 ± 1,9 ^{fg}

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), ANOVA seguido pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Fonte: elaborado pelo autor.

Por outro lado, o EC₅₀ encontrado para todas as amostras processadas foi estatisticamente inferior ao dos compostos puros e da mistura física, para a qual apenas a amostra CSS-etanol não diferiu significativamente. A melhora na capacidade antioxidante dos compostos, em alguns casos adquirindo valor estatisticamente igual ao padrão BHT, pode ser atribuída à micronização, ou seja, redução de tamanho e distribuição de tamanho de partícula ocasionada pelos métodos CSS e GAS.

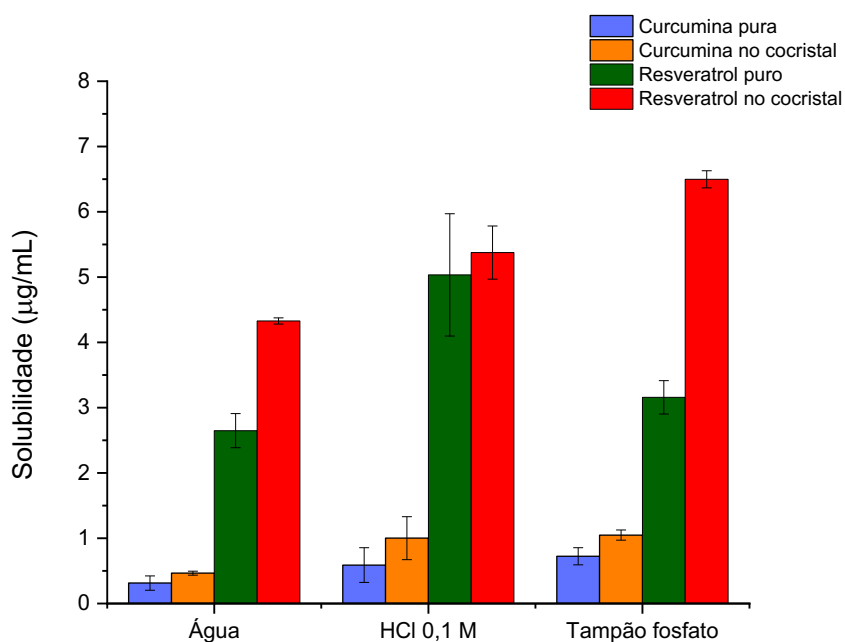
A amostra produzida pela técnica CSS com acetona, por sua vez, apresentou EC₅₀ com valor aproximadamente a metade do encontrado para a mistura física, e significativamente inferior ao próprio BHT, o que pode ser atribuído às mudanças ocorridas na estrutura cristalina e nas interações intermoleculares do cocrystal, que promoveram uma maior disponibilidade para reduzir o radical DPPH e resultaram em um grande aumento da atividade antioxidante. A atividade antioxidante de compostos bioativos é frequentemente associada a seu potencial farmacológico, uma vez que processos como a redução de doenças crônicas, danos ao DNA, mutagênese e

carcinogênese costumam estar relacionados com a terminação da propagação de radicais livres em sistemas biológicos (ZHU et al., 2002).

4.6 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE

A solubilidade dos compostos bioativos é de grande importância, uma vez que esta propriedade, juntamente com a permeabilidade, está correlacionada com a biodisponibilidade dos compostos (SRIMAL; DHAWAN, 1973). Curcumina, resveratrol e o cocrystal obtido por CSS com acetona como cossolvente foram avaliados quanto a sua solubilidade em água deionizada, solução salina tampão fosfato e solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M, sendo os resultados apresentados na Figura 15. Para o cálculo da solubilidade do cocrystal, considerou-se o percentual de cada componente no mesmo, determinado por sua solubilização completa em etanol, análise espectrofotométrica no ultravioleta visível e quantificação por meio de curva de calibração.

Figura 15 – Solubilidades da curcumina e resveratrol puros e do cocrystal CUR-RES, em relação a cada componente, em diferentes solventes.



Fonte: elaborado pelo autor.

Considerando-se a solubilidade da curcumina nos diferentes meios analisados, a solubilidade do cocrystal foi maior que a da curcumina pura em água e na solução tampão fosfato. Em meio ácido, a solubilidade das duas amostras foi estatisticamente equivalente. Ambas as amostras apresentaram solubilidade crescente nos seguintes meios: água < solução HCl 0,1 M < solução tampão fosfato, assim como reportado na literatura (PANTWALAWALKAR et al., 2021). A solubilidade da curcumina em água foi aumentada aproximadamente 1,5 vezes, passando de $0,31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (curcumina pura) para $0,47 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após o processo de cocrystalização.

Da mesma forma, a solubilidade do resveratrol, também apresentada na Figura 15, em água e na solução tampão aumentou após a cocrystalização. Assim como a curcumina, o resveratrol presente no cocrystal apresentou solubilidade crescente em água, HCl 0,1 M e então solução tampão fosfato. Por sua vez, o resveratrol puro apresentou maior solubilidade em solução ácida do que em meio neutro, o que foi relatado previamente por outros autores (AGARWAL; KHARB; SAHARAN, 2014). A solubilidade aquosa do resveratrol aumentou aproximadamente 2 vezes para o cocrystal ($6,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) comparado ao composto puro ($3,16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A solubilidade e o perfil de dissolução de um sólido estão relacionados às interações a nível molecular presentes em sua estrutura cristalina, assim como no solvente. Ainda, estas propriedades podem ser influenciadas pelo tamanho e forma das partículas, sendo favorecidas por formas que possibilitem uma maior superfície de contato entre sólido e solvente.

De acordo com Babu e Nangia (2011), cocrystalis formados por meio de ligações de hidrogênio resultam em compostos ativos com elevada solubilidade. Conforme ocorre a dissociação do cocrystal, o componente mais solúvel no meio é extraído da matriz cristalina para o meio de dissolução. A outra molécula, mais hidrofóbica, torna-se supersaturada no meio e imediatamente precipita formando *clusters* fracamente agregados, orientados aleatoriamente devido à precipitação instantânea. Esses aglomerados moleculares de tamanho micrométrico assemelham-se à fase amorfa do componente, comportando-se como o composto amorfo disperso em uma matriz polimérica, por exemplo. Aos poucos, a solução rica em “fase amorfa” se transforma em um polimorfo metaestável do composto e, por fim, no polimorfo

cristalino, menos solúvel, porém, neste ponto, a maior parte do composto já terá sido absorvida devido à rápida dissolução do estado metaestável.

Tal comportamento, associado a um grau de cristalinidade menor conferido aos compostos pela cocristalização em meio supercrítico, comparado à cristalinidade dos componentes puros, podem estar relacionados com o aumento da solubilidade da curcumina e do resveratrol nos meios analisados.

4.7 PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O perfil de dissolução cumulativa em água da curcumina, resveratrol, mistura física dos compostos e do cocristal CUR-RES produzido por CSS com acetona como cossolvente foi analisado, quantificando-se os componentes por meio de análise espectrofotométrica das alíquotas coletadas ao longo do tempo.

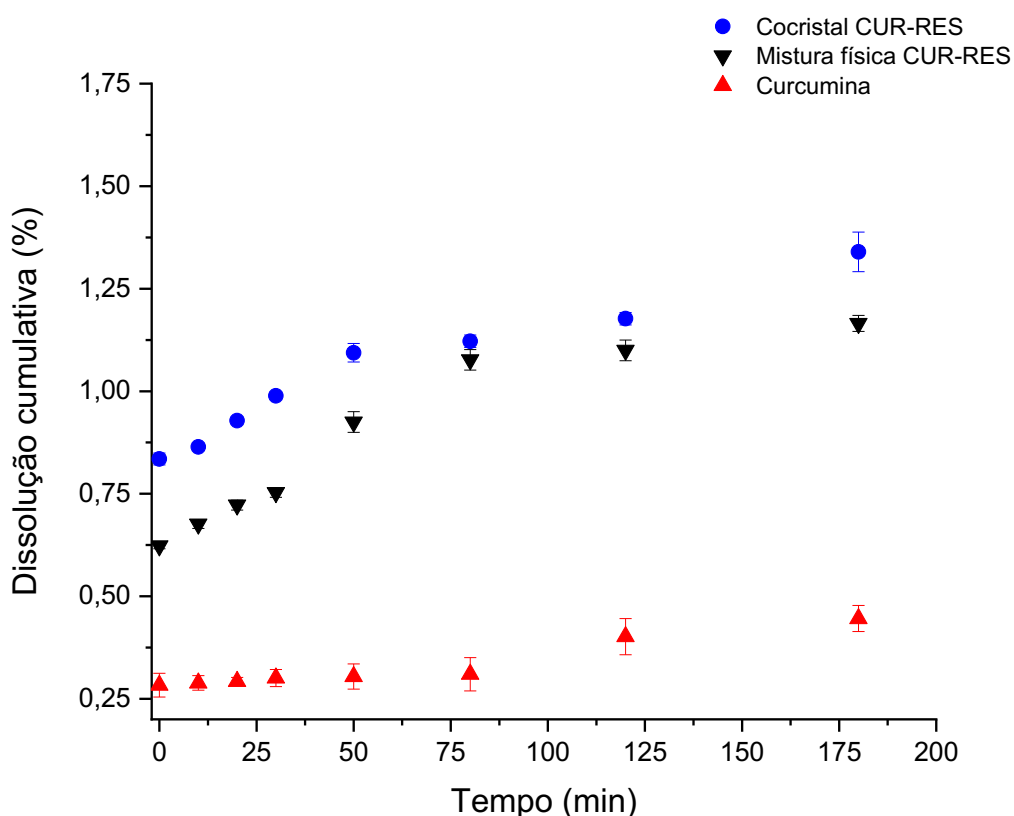
Os resultados obtidos para a dissolução da curcumina em sua forma pura, na mistura física com resveratrol e no cocristal são apresentados na Figura 16.

Imediatamente após a adição de água, a curcumina pura apresentou 0,28% de dissolução, comparado a 0,62% para a mistura física e 0,83% para o cocristal. Nos primeiros 50 min de análise, a dissolução da curcumina manteve-se aproximadamente constante, enquanto a mistura física e o cocristal apresentaram aumento gradativo na dissolução até atingir 0,92% e 1,1%, respectivamente. A dissolução da mistura física continuou a aumentar de forma mais expressiva até os 80 min de análise, quando atingiu o valor de 1,07%, mantendo-se próxima a este até o final da análise. Já a dissolução do cocristal manteve um aumento menos expressivo entre 30 e 80 min de análise, então voltando a aumentar mais expressivamente e atingindo o valor final de 1,34% em comparação a 1,16% da mistura física e 0,45% da curcumina pura.

Embora a análise permita observar que a presença de resveratrol influenciou o aumento da dissolução da curcumina, em todo o intervalo analisado a dissolução do cocristal manteve-se superior à da mistura física, o que indica melhora resultante do processo de cocristalização. O mesmo comportamento foi observado por Ribas et al. (2019) para a dissolução de cocristal de curcumina-nicotinamida também obtido por meio da técnica CSS, embora o valor total de dissolução cumulativa encontrado pelos autores seja maior que o obtido neste trabalho, possivelmente devido à elevada

solubilidade aquosa da nicotinamida, uma vez que a solubilidade dos cocristais é fortemente influenciada pela solubilidade de seus coformadores.

Figura 16 – Perfil de dissolução da curcumina (\blacktriangle), do cocrystal CUR-RES (\bullet) e da mistura física CUR-RES (\blacktriangledown) em água deionizada, 37 °C. Os valores referem-se às médias e as barras de erro representam o desvio padrão, n=3.

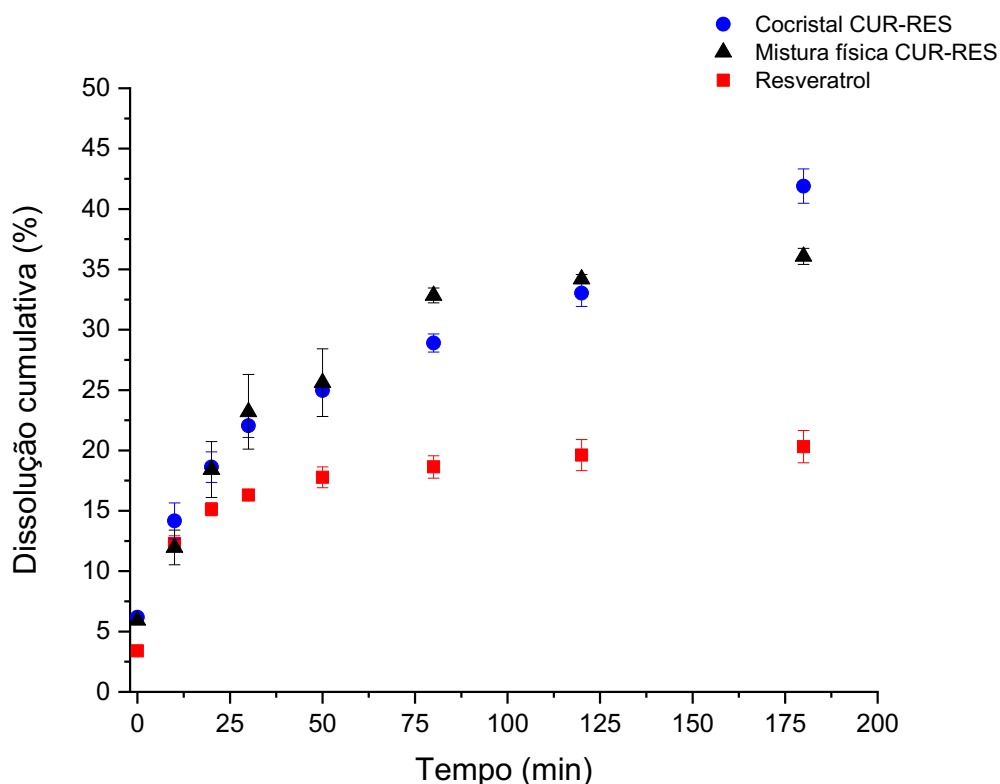


Fonte: elaborado pelo autor.

Quanto à dissolução cumulativa do resveratrol, apresentada na Figura 17, já no tempo inicial o cocrystal apresentou dissolução de 6,18%, quase o dobro da dissolução apresentada pelo resveratrol puro (3,39%), embora equivalente à dissolução apresentada pela mistura física (5,9%). As três curvas apresentaram um comportamento semelhante até o tempo de 50 min, quando a dissolução apresentada pelo resveratrol foi de 17,77%, 25,6% para a mistura física e 24,97% para o cocrystal. Após, os valores de dissolução do resveratrol puro continuaram aumentando lentamente até atingir 20,31% após os 180 min de experimento. Apesar deste

percentual de dissolução ter sido obtido para o cocrystal em menos de 30 min, o mesmo foi notado para a mistura física, cujos valores de dissolução passaram a se diferenciar significativamente dos obtidos para o cocrystal apenas no ponto final. Neste momento, a dissolução cumulativa do cocrystal atingiu 41,89%, enquanto a mistura física apresentou dissolução de 36,1% e o resveratrol 20,31%.

Figura 17 – Perfil de dissolução do resveratrol (■), do cocrystal CUR-RES (●) e da mistura física CUR-RES (▲) em água deionizada, 37 °C. Os valores referem-se às médias e as barras de erro representam o desvio padrão, n=3.



Fonte: elaborado pelo autor.

Um aumento expressivo na velocidade de dissolução do resveratrol após a cocrystalização foi também observado na utilização do coformador nicotinamida via método tradicional de evaporação (HE et al., 2017a) e por meio da técnica GAS (PESSOA et al., 2019), em meios de dissolução com diferentes pH, entretanto, em ambos os trabalhos a mistura física dos coformadores não foi avaliada.

Neste trabalho, ao avaliar a dissolução do cocrystal em termos do teor de resveratrol, o aumento na dissolução do composto possivelmente está atrelado à presença de curcumina. Ainda assim, os resultados encontrados são animadores, visto que a cocrystalização parece ter influenciado mais significativamente a dissolução da curcumina do que apenas a presença de seu coformador, o que foi refletido na avaliação da atividade biológica *in vitro*, avaliada por meio da capacidade de inibição do radical DPPH.

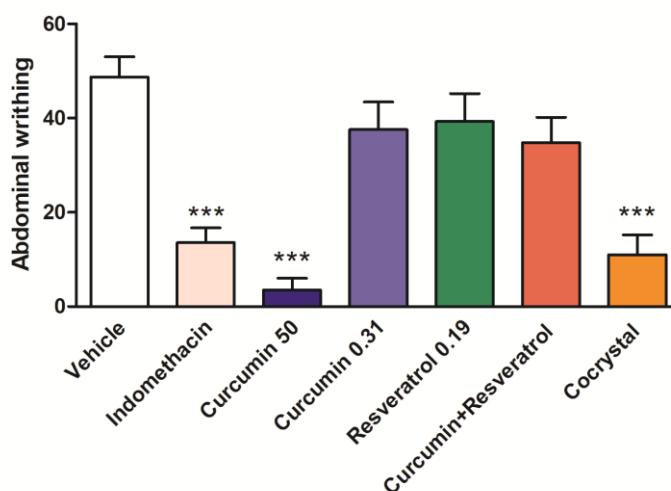
4.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

A atividade antinociceptiva/anti-inflamatória do cocrystal CUR-RES obtido por meio da técnica CSS com acetona como cossolvente ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) foi observado por meio do teste de contorções abdominais em camundongos induzidas por ácido acético, conforme apresentado na Figura 18.

Os resultados demonstraram que o cocrystal, em relação ao grupo veículo (água destilada, $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), reduziu significativamente as contorções abdominais no teste ($P < 0,001$), assim como no grupo controle positivo, representado pela indometacina, o qual também reduziu significativamente as contorções abdominais. Da mesma forma, a curcumina pura ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) também apresentou resultados significativos ao teste ($P < 0,001$). No entanto, foi necessária uma dose 100 vezes maior para a curcumina pura apresentar o mesmo efeito, comparado à dose do cocrystal, o que pode ser relacionado à maior solubilidade, taxa de dissolução do cocrystal e conseqüentemente biodisponibilidade.

Da mesma forma, a atividade antinociceptiva/anti-inflamatória do cocrystal pode ser relacionada à potencialização da atividade antioxidante dos componentes em função da cocrystalização, uma vez que se entende que as espécies reativas de oxigênio exercem um papel importante no dano celular, estando envolvidas em muitos processos inflamatórios (GERONIKAKI; GAVALAS, 2006; MIGUEL, 2010).

Figura 18 – Efeito antinociceptivo do cocrystal CUR-RES em camundongos. Os animais foram tratados oralmente com veículo (água destilada, 10 mL·kg⁻¹), indometacina (10 mg·kg⁻¹), curcumina (50 mg·kg⁻¹ ou 0,31 mg·kg⁻¹), resveratrol (0,19 mg·kg⁻¹), mistura física de curcumina (0,31 mg·kg⁻¹) + resveratrol (0,19 mg·kg⁻¹) ou cocrystal CUR-RES (0,5 mg·kg⁻¹). Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Análise de variância simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, *** P < 0,001 diferente do grupo controle.



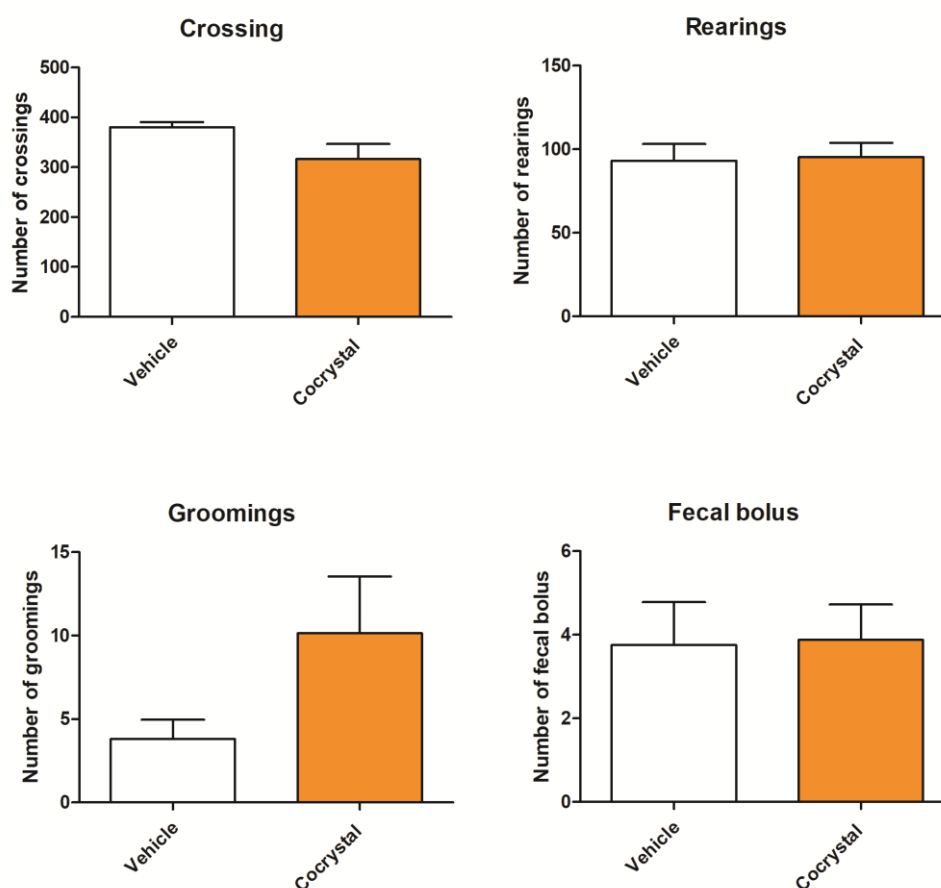
Fonte: elaborado pelo autor.

Sabe-se que diversos fármacos apresentam respostas falso-positivas no teste de nocicepção devido à sedação e comprometimento da atividade locomotora (TREVISAN et al., 2013). Portanto, a atividade locomotora dos camundongos tratados com o cocrystal CUR-RES (0,5 mg·kg⁻¹) foi observada por meio do teste de campo aberto, cujos resultados são apresentados na Figura 19.

O grupo tratado com o cocrystal CUR-RES não apresentou diferença significativa nos *crossings* (cruzamentos entre os quadrantes do aparato), *rearings* (exploração vertical do aparato) e *groomings* (comportamento de auto-limpeza) quando comparado ao grupo tratado com veículo. Dessa forma, os resultados encontrados demonstram que o cocrystal (0,5 mg·kg⁻¹) não interferiu na atividade locomotora dos camundongos, o que significa que ele não induz efeitos motores adversos. Da mesma maneira, a ocorrência de bolos fecais observada no teste não

diferiu entre os grupos, indicando que a administração do cocrystal não induz a ocorrência de efeitos gastrointestinais adversos.

Figura 19 – Efeito antinociceptivo do cocrystal CUR-RES em camundongos no teste de campo aberto. Os animais foram tratados oralmente com veículo (água destilada, $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) ou cocrystal ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste-t não pareado (Mann-Whitney).



Fonte: elaborado pelo autor.

A partir dos resultados observados por meio dos testes comportamentais, conclui-se que o cocrystal ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), assim como a curcumina pura ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e a indometacina, apresentam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. A cocrystalização da curcumina possibilitou uma significativa redução em sua dose mínima efetiva (100 vezes). Considerando que a solubilidade dos fármacos influencia sua biodisponibilidade (PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017), sugere-se que

o aumento no potencial da curcumina após a cocrystalização é provavelmente devido à melhora em sua solubilidade em pH neutro e ácido, o que favorece uma maior absorção no sistema gastrointestinal e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade (PLEUVRY, 2005) o que está relacionado com dados de solubilidade obtidos nos teste *in vitro*, bem como à potencialização da atividade antioxidante dos compostos.

Analisados conjuntamente, os resultados demonstram que o processo de cocrystalização leva a um aumento no potencial antinociceptivo/anti-inflamatório da curcumina. Considerando que a cocrystalização é apontada como um processo efetivo para melhorar a biodisponibilidade de substâncias sem alterar sua estrutura molecular, pode-se inferir que o potencial da curcumina foi elevado após o processo de cocrystalização devido a alterações em sua biodisponibilidade.

4.9 CONCLUSÃO

A obtenção de cocrystal CUR-RES foi realizada com sucesso por meio da técnica CSS utilizando acetona como cossolvente. As análises de DSC, DRXP e FTIR foram utilizadas para confirmar as diferenças entre as estruturas cristalinas do cocrystal em relação aos compostos puros. Enquanto o grau de cristalinidade da nova estrutura mostrou-se menor após o processamento, as partículas produzidas apresentaram morfologia irregular e a distribuição normal de tamanho de partícula mostrou-se intermediária entre o comportamento observado para os compostos puros.

Observou-se uma maior taxa de dissolução do cocrystal em comparação aos compostos puros, porém, em relação ao resveratrol, o mesmo efeito foi observado para a mistura física dos compostos formadores. Ao avaliar a atividade biológica do cocrystal produzido por CSS-acetona em comparação à curcumina e resveratrol não processados, observou-se a potencialização da capacidade antioxidante dos compostos. Testes comportamentais com camundongos também demonstraram atividade anti-inflamatória maior após a cocrystalização, sugerindo grande potencial de aplicação do cocrystal como um novo agente anti-inflamatório natural, frente aos resultados satisfatórios observados tanto *in vitro* como *in vivo*.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS II

Produção e caracterização de cocrystal de resveratrol e L-prolina pelo método gás antissolvente

O presente capítulo apresenta os resultados de obtenção e caracterização de cocrystal de resveratrol e L-prolina por meio do método gás antissolvente. Resveratrol e L-prolina foram utilizados na razão molar 1:2, baseado no estudo de He et al. (2017a), que obteve cocrystal de resveratrol-L-prolina pelo método de recristalização, nesta mesma razão molar, alcançando certa melhora no perfil de dissolução do resveratrol com a utilização de surfactante. A produção de cocrystal de resveratrol e L-prolina também foi relatada por Lou et al. (2021) utilizando o mesmo método convencional, mas na proporção 1:1. No entanto, o cocrystal obtido por estes demonstrou capacidade de dissolução inferior ao resveratrol puro, razão pela qual optou-se por seguir a razão molar utilizada no primeiro estudo citado. No método GAS utilizado, etanol foi selecionado como solvente, diante da solubilidade relativamente próxima dos coformadores no solvente, e CO₂ utilizado como antissolvente. Os demais parâmetros de processo foram executados conforme descrito no Capítulo 3.

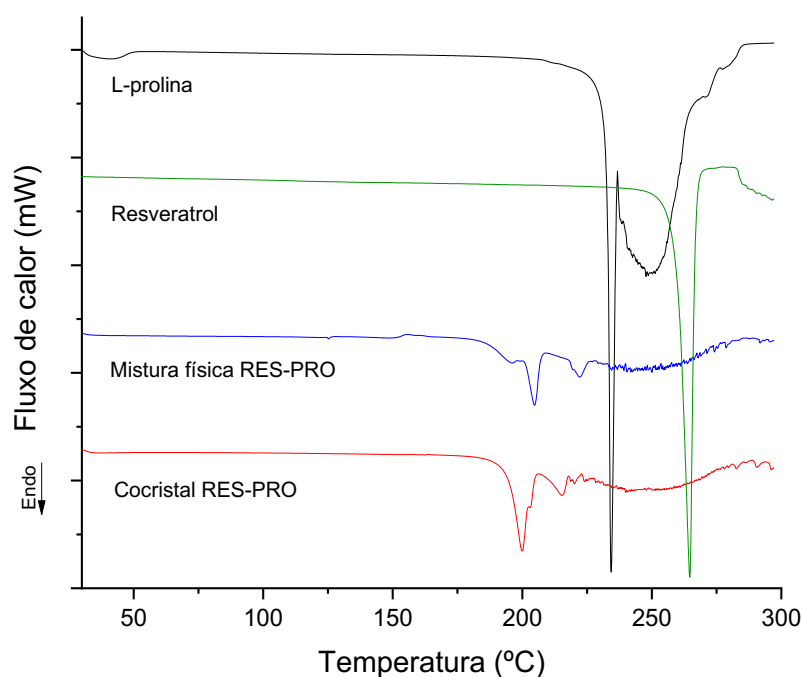
5.1 ANÁLISE TÉRMICA

Os componentes puros resveratrol e L-prolina, sua mistura física nas mesmas proporções utilizadas para obtenção de cocrystal, e a amostra produzida por GAS foram analisados por calorimetria diferencial de varredura, uma vez que o comportamento térmico dos componentes costuma ser afetado pela cocrystalização. Conforme apresentado na Figura 20, o resveratrol apresentou um evento endotérmico em 264,7 °C e a L-prolina em 234,4 °C, que condizem com os pontos de fusão dos componentes puros (LIU et al., 2016).

Por sua vez, a mistura física dos compostos apresentou um evento endotérmico em 204,7 °C, enquanto a amostra RES-PRO produzida por GAS apresentou fusão em 200 °C. Apesar da amostra GAS e da mistura física apresentarem eventos próximos, o comportamento térmico da amostra processada é idêntico ao observado por He et al. (2017a) e Lou et al. (2021) na obtenção de

cocristais de resveratrol-L-prolina produzidos por métodos convencionais. Diante da evidência observada, a análise de DRXP foi utilizada para confirmar a formação de cocrystal.

Figura 20 – DSC do resveratrol, L-prolina, mistura física dos compostos e da amostra RES-PRO produzida por GAS.

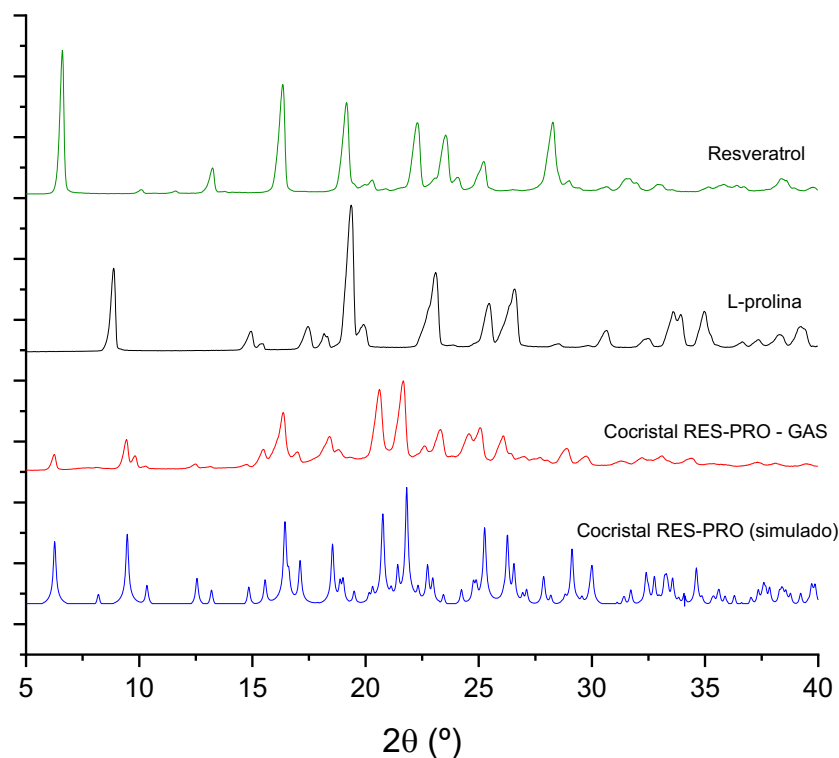


Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 DIFRAÇÃO DE RAIO-X DE PÓ (DRXP)

Considerando que diferentes padrões de difração correspondem a diferentes estruturas cristalinas, a análise de DRXP foi utilizada para verificar a obtenção de cocrystal. Os padrões de difração do resveratrol e L-prolina puros, da amostra RES-PRO obtida por GAS e do padrão de DRXP simulado a partir de dados de raio-X de monocristal de He et al. (2017a) são apresentados na Figura 21.

Figura 21 – DRXP do resveratrol, L-prolina, amostra RES-PRO obtida por GAS e padrão de DRXP simulado a partir de dados de raio-X de monocristal.



Fonte: elaborado pelo autor.

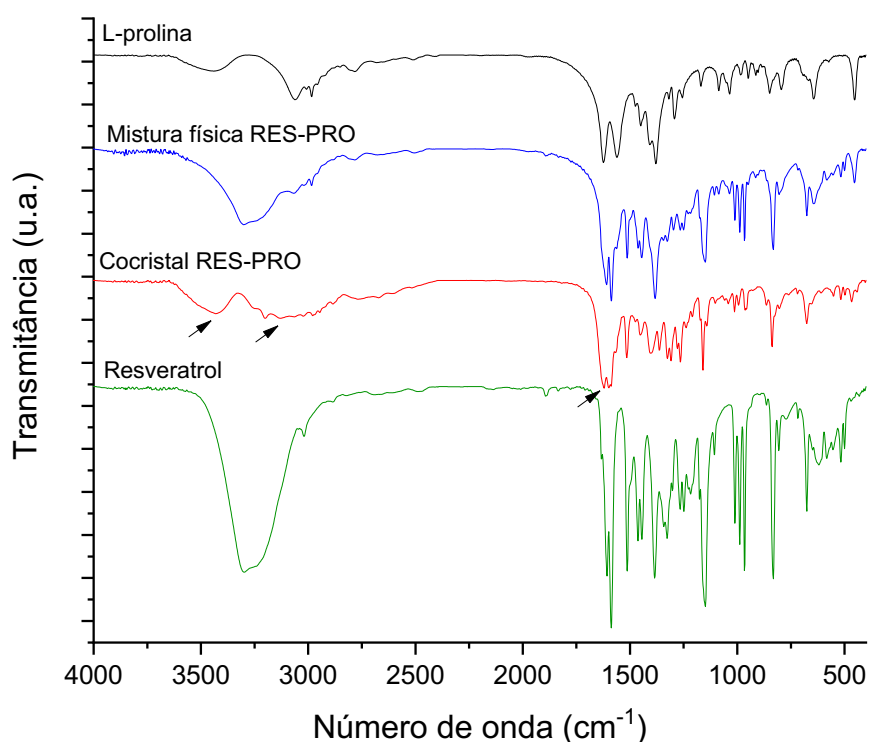
O padrão de difração do resveratrol apresentou reflexões características em 6,6; 13,2; 16,3; 19,1; 20,3; 22,3; 23,5; 25,2 e 28,3 2θ , que corresponde ao padrão observado na literatura. As reflexões características da L-prolina foram observadas em 8,8; 14,9; 17,4; 18,1; 19,3; 19,9; 23,1; 25,4; 26,6; 30,6; 32,4; 33,6; 33,9 e 34,9 2θ . Por sua vez, o padrão de difração da amostra RES-PRO produzida por GAS mostrou diferenças significativas em relação ao padrão dos compostos puros, exibindo reflexões em 6,2; 9,4; 9,8; 12,4; 15,4; 16,3; 17; 18,4; 20,6; 21,7; 22,6; 23,3; 24,6; 25; 26,1; 28,9 e 29,7. Estas reflexões condizem com as observadas por He et al. (2017a) para cocristais de resveratrol e L-prolina, e com padrões de difração simulados gerados a partir de dados de difração de monocristal pelos mesmos autores. A existência de um padrão de difração gerado a partir de um monocristal permite uma

análise mais consistente sobre a estrutura cristalina em questão, confirmando a formação de cocrystal e a presença de fases de elevada pureza.

5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Como apresentado na Figura 22, os espectros de FTIR do cocrystal produzido por GAS, resveratrol e L-prolina puros, e da mistura física dos compostos foram analisados de modo a investigar interações químicas entre os coformadores.

Figura 22 – FTIR do resveratrol, L-prolina, cocrystal RES-PRO produzido por GAS e mistura física dos compostos.



Fonte: elaborado pelo autor.

Observa-se que o resveratrol apresentou bandas características intensas correspondendo ao estiramento do grupamento O–H em 3297 cm⁻¹, alongamento do

C=C aromático em 1606 cm^{-1} , estiramento da ligação C=C olefínica em 1587 cm^{-1} e a banda característica da forma *trans* em 966 cm^{-1} . L-prolina exibiu uma banda intensa em 1623 cm^{-1} correspondendo ao alongamento do COO⁻ assimétrico, 1407 cm^{-1} relacionada ao COO⁻ simétrico, 3060 cm^{-1} correspondendo ao estiramento do O–H carboxílico e em 3380 cm^{-1} relacionada ao estiramento do –NH– (SHIMPI et al., 2014). O espectro de FTIR do cocrystal RES-PRO apresentou algumas diferenças em relação aos espectros dos componentes puros. Observou-se uma alteração na banda associada ao estiramento do –NH– para 3430 cm^{-1} , deslocamento para 3127 cm^{-1} em relação ao estiramento O–H e para 1619 cm^{-1} devido ao estiramento do COO⁻. Tais alterações observadas para o cocrystal não foram evidentes para a mistura física, indicando que os grupos O–H e –NH– encontram-se envolvidos na formação do cocrystal.

5.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL

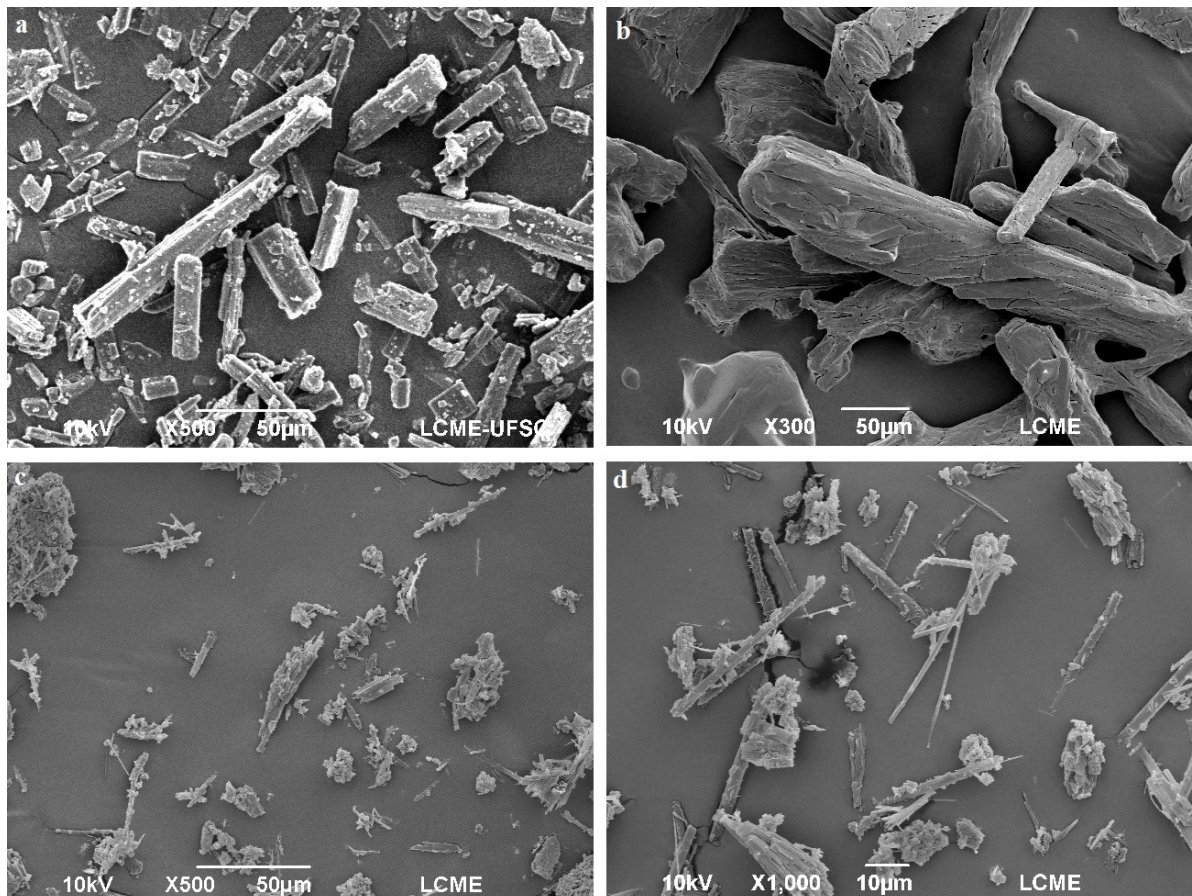
O teor de solvente residual nas partículas de cocrystal RES-PRO produzidas por GAS, determinado por GC-FID, foi de 153,56 ppm. Etanol, o solvente orgânico utilizado no processo de cocrystalização, é caracterizado como solvente de Classe 3, considerado menos tóxico e de menor risco à saúde humana que os solventes de Classe 1 e Classe 2. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Farmacopeia da República Popular da China, Farmacopeia Europeia e Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos para Registro de Produtos Farmacêuticos, documento Q3C(R8) de 2021, a concentração máxima aceitável dos solventes de Classe 3 é de 5000 ppm. Portanto, as partículas produzidas pelo método GAS estão em consonância com a legislação vigente, sendo consideradas seguras para o consumo humano (BRASIL, 2009).

5.5 MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com o intuito de observar a morfologia do resveratrol, L-prolina e do cocrystal RES-PRO obtido por GAS, cujas

imagens são apresentadas na Figura 23. Optou-se por apresentar uma imagem do cocrystal obtida com magnitude de 500x (Fig. 23.c), similar ao utilizado para resveratrol e L-prolina, de modo a evidenciar as diferenças de tamanho entre as amostras, e uma imagem do cocrystal com magnitude de 1000x (Fig. 23.d), para possibilitar uma melhor observação da morfologia, visto que as partículas são menores. Tanto o resveratrol como a L-prolina apresentaram morfologia irregular semelhante a estruturas de blocos, o que também foi observado na amostra do cocrystal, juntamente com algumas estruturas em forma de agulhas.

Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura do (a) resveratrol, (b) L-prolina, (c) cocrystal RES-PRO com magnitude de 500x e (d) com magnitude de 1000x.

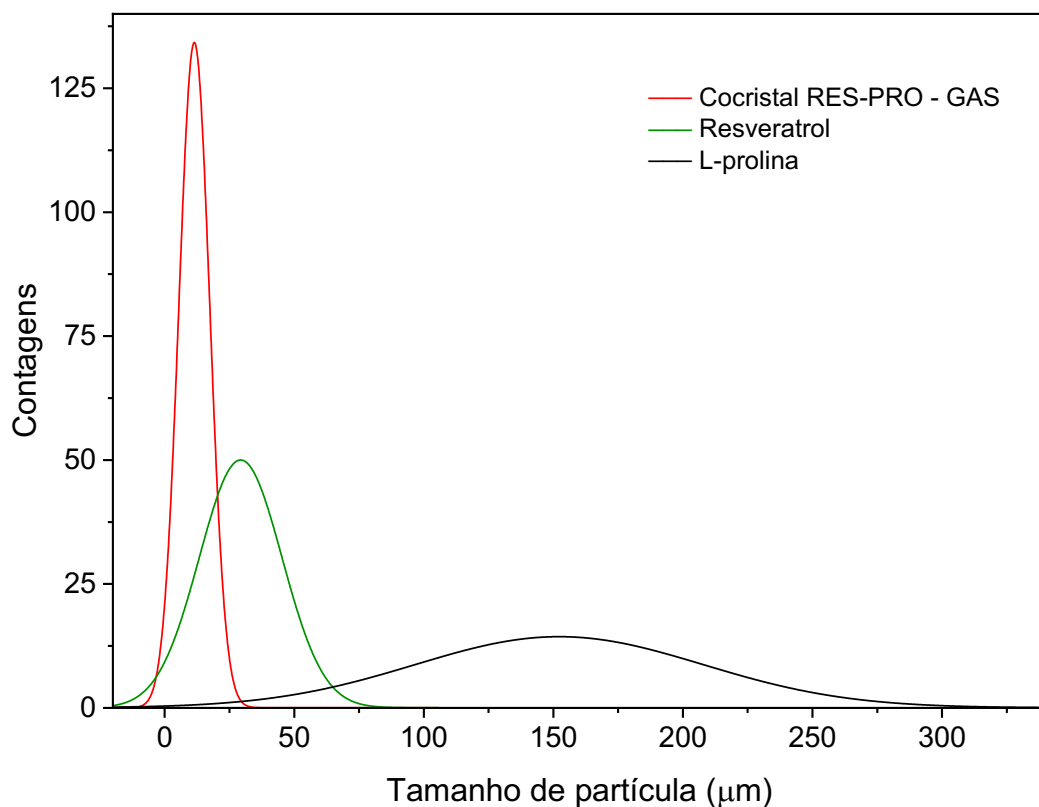


Fonte: elaborado pelo autor.

As micrografias obtidas foram também utilizadas para determinação da distribuição de tamanho de partícula, apresentada na Figura 24. A partir da curva de distribuição normal, observa-se para o resveratrol um tamanho médio de partícula de

29,3 μm e para a L-prolina, tamanho médio de 152,3 μm , com uma distribuição de tamanho muito ampla. O processo GAS resultou na redução do tamanho de partícula, tendo o cocrystal apresentado tamanho médio de 11,5 μm e uma distribuição de tamanho mais estreita, comparada às curvas dos compostos puros, indicando uma amostra de tamanho mais homogêneo. Embora a redução do tamanho e da distribuição de tamanho de partícula não sejam o foco da cocrystalização, este é um resultado interessante do ponto de vista industrial, uma vez que costuma estar relacionado a propriedades físico-químicas e atividades biológicas de interesse.

Figura 24 – Distribuição normal de tamanho de partícula do resveratrol (verde), L-prolina (preto) e cocrystal RES-PRO (vermelho).



Fonte: elaborado pelo autor.

5.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH

O teste de capacidade de inibição do radical DPPH foi utilizado para estimar a capacidade antioxidante do cocristal RES-PRO em comparação ao resveratrol, L-prolina, e a mistura física dos compostos. Os resultados expressos como EC_{50} , a concentração mínima necessária para inibir 50% do radical DPPH livre, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de EC_{50} do resveratrol, cocristal RES-PRO e mistura física (média \pm desvio padrão).

Amostra	EC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Resveratrol	$32 \pm 0,3^b$
Cocristal RES-PRO	$28,2 \pm 0,8^c$
Mistura física	$38,4 \pm 0,9^a$

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), ANOVA seguido pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

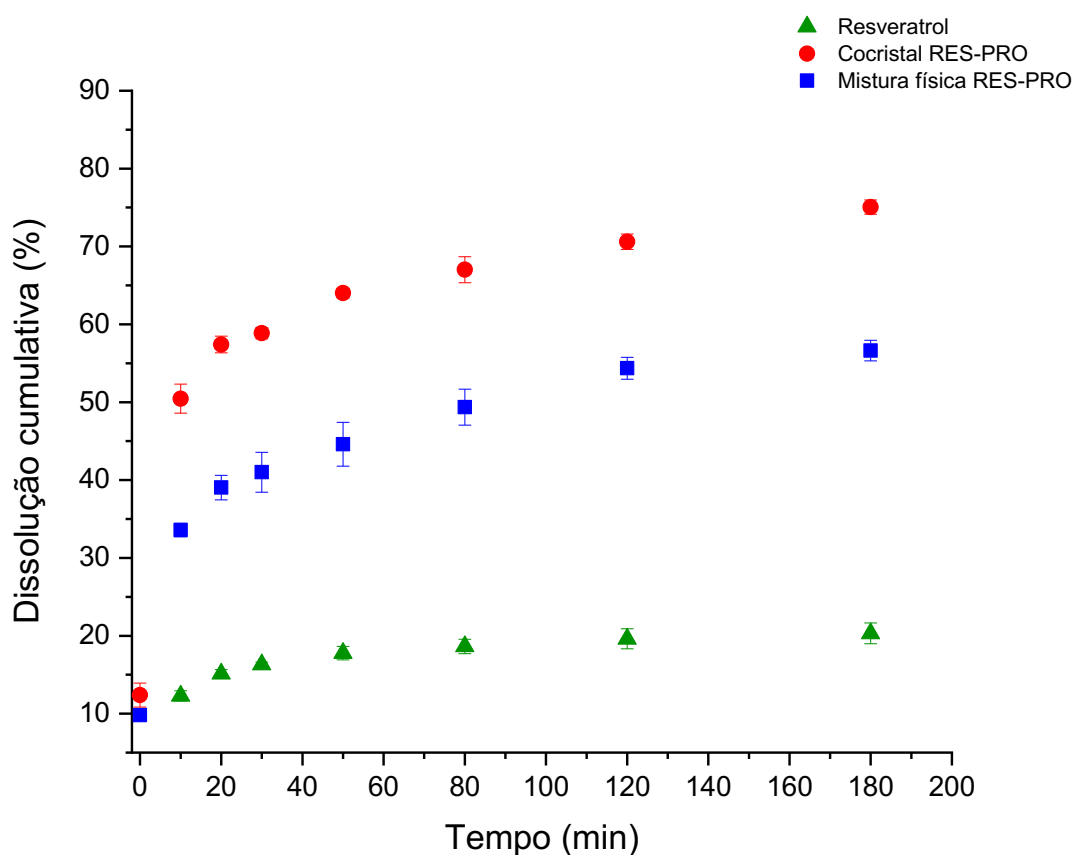
Fonte: elaborado pelo autor.

Dentro da faixa de concentração analisada, L-prolina não apresentou atividade antioxidante, enquanto o resveratrol apresentou valor de EC_{50} igual a $32 \pm 0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, correspondendo aos resultados encontrados por Dal Magro et al. (2021) e Sakata et al. (2021). Por sua vez, a mistura física de resveratrol e L-prolina apresentou EC_{50} de $38,4 \pm 0,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O aumento no valor de EC_{50} , que representa diminuição na atividade antioxidante em relação ao resveratrol puro, explica-se pela menor quantidade de composto analisado (aproximadamente 50% em massa da amostra é composta por resveratrol), considerando que o coformador L-prolina não apresentou atividade antioxidante. Por outro lado, o EC_{50} encontrado para o cocristal RES-PRO foi de $28,2 \pm 0,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que sugere a potencialização da capacidade antioxidante, possivelmente atribuída a modificações na estrutura cristalina do composto que resultaram em maior disponibilidade para reagir reduzindo o radical DPPH.

5.7 PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O perfil de dissolução *in vitro* do resveratrol puro, do cocrystal RES-PRO produzido por GAS e da mistura física de resveratrol e L-prolina nas mesmas proporções existentes no cocrystal foi estudado em água destilada a 37 °C, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Perfil de dissolução *in vitro* do (▲) resveratrol, (●) cocrystal RES-PRO e (■) mistura física em água destilada a 37 °C. Os valores representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão, n=3.



Fonte: elaborado pelo autor.

Imediatamente após a adição de água, uma alíquota de cada amostra foi analisada, para a qual o resveratrol puro apresentou dissolução de 3,4%, enquanto a dissolução da mistura física foi de 9,8% e do cocrystal de 12,4%. Após 10 min, a

dissolução do cocrystal atingiu 50,5%, valor obtido para a mistura física apenas após 80 min de análise e aproximadamente 2,5 vezes o valor de dissolução cumulativa apresentado pelo resveratrol puro ao final do experimento. Ao longo de todos os pontos experimentais, a dissolução do cocrystal manteve-se cerca de 1,4 vezes o valor de dissolução da mistura física e aproximadamente 3,6 vezes a dissolução do resveratrol puro. Ao final do experimento (180 min), a dissolução cumulativa do cocrystal atingiu o valor de 75%, enquanto a dissolução cumulativa da mistura física permaneceu em 56,6%, e do resveratrol puro em 20,3%.

A influência da seleção do coformador é evidente neste experimento, onde a mistura física apresentou uma melhor dissolução em comparação ao princípio ativo puro ao longo de todo o experimento, uma vez que a L-prolina é um composto muito solúvel em água. No entanto, a dissolução apresentada pelo cocrystal mostrou-se ainda maior, o que se relaciona a uma diferente estrutura cristalina, compreendendo diferentes interações no estado sólido que influenciam o processo de dissolução. Da mesma forma, o menor tamanho de partícula e distribuição de tamanho de partícula mais estreita influenciam positivamente para uma melhor dissolução aquosa.

5.8 CONCLUSÃO

O método GAS mostrou-se efetivo para a obtenção de cocrystalis de resveratrol e L-prolina pela primeira vez utilizando tecnologia supercrítica. As partículas produzidas foram caracterizadas por DSC, DRXP e FTIR, apresentando uma estrutura cristalina diferente dos coformadores puros e semelhante a cocrystalis RES-PRO reportados na literatura, obtidos a partir de técnicas convencionais de cocrystalização.

Os cocrystalis produzidos são livres de solvente residual e, neste sentido, seguros para o consumo humano. A cocrystalização por GAS melhorou significativamente o perfil de dissolução e capacidade antioxidante do resveratrol, comparado ao composto puro e à mistura física dos coformadores. As mudanças observadas podem ser atribuídas às diferenças na estrutura cristalina e à redução no tamanho e distribuição de tamanho de partícula, consequência do processo GAS.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES

O uso de tecnologia supercrítica por meio de duas diferentes abordagens resultou na produção satisfatória de cocristsais de curcumina e resveratrol. A técnica CSS, que utilizou o fluido supercrítico na condição de solvente com adição do cossolvente acetona possibilitou a obtenção de cocrystal princípio ativo-princípio ativo de curcumina e resveratrol pela primeira vez. Por sua vez, o emprego do fluido supercrítico como antissolvente no método GAS gerou cocrystal de resveratrol e L-prolina, até então obtido apenas por vias convencionais.

As análises de DSC, DRXP e FTIR foram utilizadas para confirmar as diferenças entre as estruturas cristalinas dos cocristsais obtidos, em relação aos compostos puros e a sua mistura física. No caso do cocrystal RES-PRO produzido por GAS, a estrutura cristalina do cocrystal foi também comparada a um padrão de DRXP simulado a partir de dados de difração de raio-X de monocristal reportado na literatura, confirmando a semelhança das estruturas.

Em relação à técnica CSS, os cocristsais produzidos apresentaram morfologia irregular e distribuição normal de tamanho de partícula intermediária entre o comportamento observado para os compostos puros. Já o método GAS resultou na obtenção de partículas com menor tamanho e distribuição normal de tamanho mais estreita. Os cocristsais produzidos por esta técnica se mostraram livres de solvente residual, assim, seguros para o consumo humano.

Em ambos os casos, a cocrystalização possibilitou a potencialização das atividades biológicas avaliadas em comparação aos compostos não processados e a sua mistura física. Esta melhora foi observada em análises *in vitro*, para ambos os cocristsais, e *in vivo*, para o cocrystal CUR-RES. Tais mudanças podem ser atribuídas às diferenças na estrutura cristalina dos compostos, aumentando as possibilidades de aplicação dos compostos tanto na área alimentícia como farmacêutica.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas algumas sugestões e ideias para continuidade deste trabalho:

- Estudar o processo de cocristalização por GAS para o sistema CUR-RES utilizando etanol como solvente, substituindo o filtro localizado na saída da câmara de precipitação por um de menor porosidade, capaz de reter partículas de menor tamanho;
- Avaliar as propriedades biológicas do cocristal RES-PRO produzido por GAS em comparação ao resveratrol puro e à mistura física de resveratrol e L-prolina por meio de análises *in vivo*;
- Estudar a produção de cocristais princípio ativo-princípio ativo a partir de outros compostos bioativos com potencial para utilização nas indústrias alimentícia e/ou farmacêutica;
- Investigar a influência de cada parâmetro de processo separadamente na produção dos cocristais pelos métodos CSS e GAS;
- Estudar o processo de produção de cocristais ternários de curcumina + resveratrol + outro coformador, visando um aumento mais expressivo na dissolução e biodisponibilidade dos compostos, caracterizando-os e avaliando suas atividades biológicas;
- Investigar a possibilidade de aplicação dos cocristais produzidos em alimentos, avaliando a estabilidade dos princípios ativos e efeito de sua adição nas propriedades sensoriais e nutricionais do alimento.

CAPÍTULO 7 – PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO

O presente capítulo apresenta a produção técnico-científica decorrente (direta ou indiretamente) da execução do trabalho, sendo relacionados artigos publicados e submetidos, bem como trabalhos publicados em anais de eventos científicos. Alguns dos trabalhos aqui mencionados não fazem parte do corpo do documento de tese, porém, foram desenvolvidos concomitantemente e apresentam grande relevância no desenvolvimento do trabalho.

7.1 TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICO

1. DAL MAGRO, C.; SANTOS, A.E.; DIAS, J.L.; AGUIAR, G.P.S.; BORTOLUZZI, A.J.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J.V. Production and characterization of resveratrol and L-proline cocrystal by gas antisolvent cocrystallization. *The Journal of Supercritical Fluids*, submetido, 2022.

2. SANTOS, A.E.; DAL MAGRO, C.; DE BRITTO, L.S.; AGUIAR, G.P.S.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M. Micronization of luteolin using supercritical carbon dioxide: Characterization of particles and biological activity in vitro. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.181, p.105471, 2022.

3. DAL MAGRO, C.; SANTOS, A.E.; RIBAS, M.M.; AGUIAR, G.P.S.; VOLFE, C.R.B.; LOPES, M.L.L.C.; SIEBEL, A.M.; MÜLLER, L.G.; BORTOLUZZI, A.J.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J.V. Production of curcumin-resveratrol cocrystal using cocrystallization with supercritical solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.171, p. 105190, 2021.

4. SAKATA, G.S.B.; RIBAS, M.M.; DAL MAGRO, C.; SANTOS, A.E.; AGUIAR, G.P.S.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M. Encapsulation of trans-resveratrol in poly(ϵ -caprolactone) by GAS antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.171, p.105164, 2021.

5. AGUIAR, G.P.S.; DAL MAGRO, C.; CARVALHO, G.O.; SANTOS, A.E.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J.V. Co-precipitation of anthocyanin in PHBV by the SEDS technique. **Journal Of Food Science And Technology-Mysore**, v. 58(11), p. 4217 - 4224, 2021.

6. RIBAS, M.M.; SAKATA, G.S.B.; SANTOS, A.E.; DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G.P.S.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J.V. Curcumin cocrystals using supercritical fluid technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.152, p.104564, 2019.

7. SCAPINELLO, J.; AGUIAR, G.P.S.; DAL MAGRO, C.; CAPELEZZO, A.P.; NIERO, R.; DAL MAGRO, J.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Extraction of bioactive compounds from *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v.125, p.65 - 71, 2018.

8. AGUIAR, G. P. S.; DAL MAGRO, C.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) micronization by solution enhanced dispersion by supercritical fluids technique. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.35, p.1275 - 1282, 2018.

7.2 TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

Completo

1. DAL MAGRO, C.; SANTOS, A.E.; GIRARDI, D.G.L.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M.; AGUIAR, G.P.S. Obtenção de cocrystalis de curcumina e trans-resveratrol utilizando tecnologia supercrítica. **X CBTermo – Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada**, Nova Friburgo, 2019.

Resumo

1. VOLFE, C.R.B.; DAL MAGRO, C.; LOPES, M.L.L.C.; SANTOS, A.E.; RIBAS, M.M.; AGUIAR, G.P.; BORTOLUZZI, A.J.; SIEBEL, A.M.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M.; MÜLLER, L.G. Potencialização da atividade anti-inflamatória de curcumina através da cocrystalização com resveratrol. **VII Simpósio Regional de Ciências Farmacêuticas**, Chapecó, 2020.

2. LOPES, M.L.L.C.; DAL MAGRO, C.; VOLFE, C.R.B.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M.; MÜLLER, L.G. Investigação do efeito antinociceptivo do cocrystal de curcumina-resveratrol em camundongos. **Congresso de Anestesiologia USP 2020**, online, 2020.

3. VOLFE, C.R.B.; DAL MAGRO, C.; SANTOS, A.E.; RIBAS, M.M.; AGUIAR, G.P.; LOPES, M.L.L.C.; SIEBEL, A.M.; BORTOLUZZI, A.J.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J.V.; MÜLLER, L.G. Cocrystal de curcumina e resveratrol: síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica. **10º Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa, Extensão e Inovação da UnoChapecó**, Chapecó, 2021.

REFERÊNCIAS

- AFTAB, N.; VIEIRA, A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. **Phytotherapy research: PTR**, v. 24, n. 4, p. 500–502, abr. 2010.
- AGARWAL, A.; KHARB, V.; SAHARAN, V. A. Process optimisation, characterisation and evaluation of resveratrol-phospholipid complexes using Box-Behnken statistical design. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 3, n. 7, p. 301–308, 7 jun. 2014.
- AGGARWAL, B. B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5A, p. 2783–2840, out. 2004.
- AGUIAR, G. P. S. et al. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 1–5, 1 fev. 2018.
- AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 5, p. 2147–2152, 2 maio 2012.
- AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 1, p. 27–37, 10 jul. 2008.
- ALMEIDA, E. R. et al. Micronized Resveratrol Shows Anticonvulsant Properties in Pentylentetrazole-Induced Seizure Model in Adult Zebrafish. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 2, p. 241–251, fev. 2021.
- ALXNEIT, I. Particle Size Distributions from Electron Microscopy Images: Avoiding Pitfalls. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 124, n. 48, p. 10075–10081, 3 dez. 2020.
- ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, dez. 2007.
- ANCEREWICZ, J. et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 1, p. 113–120, 1 jul. 1998.
- BABU, N. J.; NANGIA, A. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 7, p. 2662–2679, 6 jul. 2011.
- BACH, T. M. H.; TAKAGI, H. Properties, metabolisms, and applications of L-proline analogues. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6623–6634, 1 ago. 2013.

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, jun. 2006.

BAVISHI, D. D.; BORKHATARIA, C. H. Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 62, n. 3, p. 1–8, 1 set. 2016.

BERNA, A.; CHÁFER, A.; MONTÓN, J. B. High-pressure solubility data of the system resveratrol (3)+ethanol (2)+CO₂ (1). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, n. 2, p. 133–139, 1 fev. 2001.

BERTONCELLO, K. T. et al. Micronization potentiates curcumin's anti-seizure effect and brings an important advance in epilepsy treatment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2645, 8 fev. 2018.

BOLLA, G.; NANGIA, A. Pharmaceutical cocrystals: walking the talk. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, v. 52, n. 54, p. 8342–8360, 28 jun. 2016.

BONILLA-LANDA, I. et al. L-Proline as a Valuable Scaffold for the Synthesis of Novel Enantiopure Neonicotinoids Analogs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 26 jan. 2021.

BRUNI, G. et al. Enhancing the Pharmaceutical Behavior of Nateglinide by Cocrystallization: Physicochemical Assessment of Cocrystal Formation and Informed Use of Differential Scanning Calorimetry for Its Quantitative Characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1529–1539, abr. 2019.

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. [s.l.] Steinkopff, 1994.

CAESAR, I. et al. Curcumin promotes A-beta fibrillation and reduces neurotoxicity in transgenic Drosophila. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e31424, 2012.

CASSANO, R. et al. Preparation and Study of Solid Lipid Nanoparticles Based on Curcumin, Resveratrol and Capsaicin Containing Linolenic Acid. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 1593, ago. 2022.

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

CHAVA, S.; GORANTLA, S. R. A.; MUPPIDI, V. K. **Solid forms of curcumin and derivatives thereof**, 16 abr. 2015. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/WO2015052568A2/no>>. Acesso em: 8 abr. 2021

CHEN, S. et al. Fabrication, characterization, physicochemical stability of zein-chitosan nanocomplex for co-encapsulating curcumin and resveratrol. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116090, 15 maio 2020.

CHEN, Y. et al. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. **Surgery**, v. 136, n. 1, p. 57–66, jul. 2004.

CHOW, S. F. et al. Kinetic Entrapment of a Hidden Curcumin Cocrystal with Phloroglucinol. **Crystal Growth & Design**, v. 14, n. 10, p. 5079–5089, 1 out. 2014.

CRUZ-CORREA, M. et al. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association**, v. 4, n. 8, p. 1035–1038, ago. 2006.

CUADRA, I. A. et al. Polymorphism in the co-crystallization of the anticonvulsant drug carbamazepine and saccharin using supercritical CO₂ as an anti-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 136, p. 60–69, 1 jun. 2018.

CUNICO, L. P.; ACOSTA, M. C.; TURNER, C. Experimental measurements and modeling of curcumin solubility in CO₂-expanded ethanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, p. 381–388, 1 dez. 2017.

DAL MAGRO, C. et al. Production of curcumin-resveratrol cocrystal using cocrystallization with supercritical solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 171, p. 105190, 1 maio 2021.

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

DE FREITAS SILVA, M. et al. Synthetic resveratrol-curcumin hybrid derivative inhibits mitosis progression in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 50, p. 75–85, ago. 2018.

DECUI, L. et al. Micronized resveratrol shows promising effects in a seizure model in zebrafish and signalizes an important advance in epilepsy treatment. **Epilepsy Research**, v. 159, p. 106243, jan. 2020.

DIMAURO, T. M. **Curcumin-Resveratrol hybrid molecule**. , 29 jun. 2010. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US7745670B2/en>>. Acesso em: 10 abr. 2021

ETHEMOGLU, M. S. et al. Anticonvulsant activity of resveratrol-loaded liposomes in vivo. **Neuroscience**, v. 357, p. 12–19, 15 ago. 2017.

FADUS, M. C. et al. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 3, p. 339–346, 9 set. 2016.

GATELY, S. T.; TRIEZENBERG, S. J.; WANG, T. **Solid forms of curcumin.** , 20 set. 2016. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US9447050B2/en>>. Acesso em: 8 abr. 2021

GERONIKAKI, A. A.; GAVALAS, A. M. Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 9, n. 6, p. 425–442, 1 jul. 2006.

GUMIREDDY, A. et al. Preparation, Characterization, and In vitro Evaluation of Curcumin- and Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 4, p. 145, 18 mar. 2019.

HE, H. et al. Modulating the Dissolution and Mechanical Properties of Resveratrol by Cocrystallization. **Crystal Growth & Design**, v. 17, n. 7, p. 3989–3996, 5 jul. 2017a.

HE, H. et al. Structure, physicochemical properties and pharmacokinetics of resveratrol and piperine cocrystals. **CrystEngComm**, v. 19, n. 41, p. 6154–6163, 23 out. 2017b.

HWANG, D.; LIM, Y.-H. Resveratrol antibacterial activity against Escherichia coli is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10029, 5 maio 2015.

JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B. R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 2, p. 97–111, 2004.

KANG, Q.; CHEN, A. Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 8, p. 1354–1367, ago. 2009.

KARA, D. D.; RATHNANAND, M. Cocrystals and Drug–Drug Cocrystals of Anticancer Drugs: A Perception towards Screening Techniques, Preparation, and Enhancement of Drug Properties. **Crystals**, v. 12, n. 10, p. 1337, out. 2022.

KATHERINE; NUGROHO, D.; SUGIH, A. K. Determination of process parameters for curcumin – dextrose cocrystallization. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 299, p. 012038, jan. 2018.

KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 304–316, 1 dez. 2014.

KHAN, M. A. et al. Comparative investigation of the free radical scavenging potential and anticancer property of Diospyros blancoi (Ebenaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 410–417, maio 2016.

KRISHNAN, N.; DICKMAN, M. B.; BECKER, D. F. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 4, p. 671–681, 15 fev. 2008.

INAM, M. et al. Enhancing the Physiochemical Properties of Puerarin via L-Proline Co-Crystallization: Synthesis, Characterization, and Dissolution Studies of Two Phases of Pharmaceutical Co-Crystals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 928, jan. 2021.

LAGOUGE, M. et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109–1122, 15 dez. 2006.

LI, H. et al. L-Proline Alleviates Kidney Injury Caused by AFB1 and AFM1 through Regulating Excessive Apoptosis of Kidney Cells. **Toxins**, v. 11, n. 4, p. 226, abr. 2019.

LI, Y.; ZHANG, T. Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications. **Cancer Letters**, v. 346, n. 2, p. 197–205, 1 maio 2014.

LIU, M. et al. Development of a pharmaceutical cocrystal with solution crystallization technology: Preparation, characterization, and evaluation of myricetin-proline cocrystals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 151–159, out. 2016.

LODI, A. et al. Combinatorial treatment with natural compounds in prostate cancer inhibits prostate tumor growth and leads to key modulations of cancer cell metabolism. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 18, 5 jun. 2017.

LOU, Y. et al. Co-Crystals of Resveratrol and Polydatin with L-Proline: Crystal Structures, Dissolution Properties, and In Vitro Cytotoxicities. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 18, p. 5722, 21 set. 2021.

MACEACHERN, L.; KERMANSHAHI-POUR, A.; MIRMEHRABI, M. Supercritical Carbon Dioxide for Pharmaceutical Co-Crystal Production. **Crystal Growth & Design**, v. 20, n. 9, p. 6226–6244, 2 set. 2020.

MAJUMDAR, A. P. N. et al. Curcumin synergizes with resveratrol to inhibit colon cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 61, n. 4, p. 544–553, 2009.

MALHOTRA, A.; NAIR, P.; DHAWAN, D. K. Study to evaluate molecular mechanics behind synergistic chemo-preventive effects of curcumin and resveratrol during lung carcinogenesis. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e93820, 2014.

MARAMBAUD, P.; ZHAO, H.; DAVIES, P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37377–37382, 11 nov. 2005.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, dez. 2010.

MOHAPATRA, P. et al. Resveratrol and curcumin synergistically induces apoptosis in cigarette smoke condensate transformed breast epithelial cells through a

p21Waf1/Cip1 mediated inhibition of Hh-Gli signaling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 66, p. 75–84, 1 set. 2015.

MORADI, M. et al. Beneficial effect of L-Proline supplementation on the quality of human spermatozoa. **Andrologia**, v. 54, n. 8, p. e14486, 2022.

MÜLLER, L. G. et al. Antidepressant-like effect of Valeriana glechomifolia Meyer (Valerianaceae) in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 101–109, 10 jan. 2012.

NEUROHR, C. et al. Naproxen–nicotinamide cocrystals produced by CO₂ antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 78–85, 1 nov. 2013.

NUGRAHANI, I. et al. Composing Novel Diclofenac Potassium and L-Proline Salt Cocrystal as a Strategy to Increase Solubility and Dissolution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 11, p. 3423–3438, 1 nov. 2020.

OBBER, C. A.; GUPTA, R. B. Formation of Itraconazole–Succinic Acid Cocrystals by Gas Antisolvent Cocrystallization. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1396–1406, 1 dez. 2012.

OBBER, 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, fev. 2013.

OLAS, B. et al. The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. **Microbios**, v. 105, n. 410, p. 7–13, 2001.

OPIPARI, A. W. et al. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 2, p. 696–703, 15 jan. 2004.

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

PANDO, C.; CABAÑAS, A.; CUADRA, I. A. Preparation of pharmaceutical co-crystals through sustainable processes using supercritical carbon dioxide: a review. **RSC Advances**, v. 6, n. 75, p. 71134–71150, 26 jul. 2016.

PANTWALAWALKAR, J. et al. Novel curcumin ascorbic acid cocrystal for improved solubility. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102233, 1 fev. 2021.

PAULAZZI, A. R. et al. Curcumin and n-acetylcysteine cocrystal produced with supercritical solvent: characterization, solubility, and preclinical evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities. **Inflammopharmacology**, 10 jan. 2022.

- PESSOA, A. S. et al. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 93–102, 1 mar. 2019.
- PHANG, J. M.; LIU, W. Proline metabolism and cancer. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, v. 17, n. 5, p. 1835–1845, 1 jan. 2012.
- PINDELSKA, E.; SOKAL, A.; KOLODZIEJSKI, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 111–146, 1 ago. 2017.
- PLEUVRY, B. J. Factors affecting drug absorption and distribution. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 6, n. 4, p. 135–138, 1 abr. 2005.
- QIU, J. et al. Solubility Behavior and Data Modeling of L-Proline in Different Neat and Binary Solvent Systems. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 64, n. 12, p. 5920–5928, 12 dez. 2019.
- RAMIREZ, C. N. et al. In Vitro-In Vivo Dose Response of Ursolic Acid, Sulforaphane, PEITC, and Curcumin in Cancer Prevention. **The AAPS Journal**, v. 20, n. 1, p. 19, 20 dez. 2017.
- RAMPOGU, S. et al. **Pharmacotherapeutics and Molecular Mechanism of Phytochemicals in Alleviating Hormone-Responsive Breast Cancer**. Research Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/5189490/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- RATHI, N.; PARADKAR, A.; GAIKAR, V. G. Polymorphs of Curcumin and Its Cocrystals With Cinnamic Acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 8, p. 2505–2516, ago. 2019.
- REVELLI, A.-L. et al. High-pressure solubility of naproxen, nicotinamide and their mixture in acetone with supercritical CO₂ as an anti-solvent. **Fluid Phase Equilibria**, v. 373, p. 29–33, 15 jul. 2014.
- RIBAS, M. M. et al. Curcumin cocrystals using supercritical fluid technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, p. 104564, 1 out. 2019a.
- RIBAS, M. M. et al. Curcumin-nicotinamide cocrystallization with supercritical solvent (CSS): Synthesis, characterization and in vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111537, 1 nov. 2019b.
- ROSA, J. et al. Isoniazid-Resveratrol Cocrystal: A Novel Alternative for Topical Treatment of Cutaneous Tuberculosis. **Crystal Growth & Design**, v. 19, n. 9, p. 5029–5036, 4 set. 2019.
- SAKATA, G. S. B. et al. Encapsulation of trans-resveratrol in poly(ϵ -caprolactone) by GAS antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 171, p. 105164, 1 maio 2021.

SANPHUI, P. et al. Fast Dissolving Curcumin Cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 9, p. 4135–4145, 7 set. 2011.

SANPHUI, P.; BOLLA, G. Curcumin, a Biological Wonder Molecule: A Crystal Engineering Point of View. **Crystal Growth & Design**, v. 18, n. 9, p. 5690–5711, 5 set. 2018.

SANTOS, A. E. DOS et al. Micronization of luteolin using supercritical carbon dioxide: Characterization of particles and biological activity in vitro. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 181, p. 105471, 1 fev. 2022.

SATHISARAN, I.; DALVI, S. V. Crystal Engineering of Curcumin with Salicylic Acid and Hydroxyquinol as Coformers. **Crystal Growth & Design**, v. 17, n. 7, p. 3974–3988, 5 jul. 2017.

SCAPINELLO, J. et al. Extraction of bioactive compounds from *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 65–71, 1 dez. 2018.

SEKHON, B. S. Drug-drug co-crystals. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1–2, 1 dez. 2012.

SHARMA, S.; SETHI, G. S.; NAURA, A. S. Curcumin Ameliorates Ovalbumin-Induced Atopic Dermatitis and Blocks the Progression of Atopic March in Mice. **Inflammation**, v. 43, n. 1, p. 358–369, fev. 2020.

SHEMCHUK, O. et al. Natural Antimicrobials Meet a Synthetic Antibiotic: Carvacrol/Thymol and Ciprofloxacin Cocrystals as a Promising Solid-State Route to Activity Enhancement. **Crystal Growth & Design**, v. 20, n. 10, p. 6796–6803, 7 out. 2020.

SHIMPI, M. R. et al. New cocrystals of ezetimibe with L-proline and imidazole. **CrystEngComm**, v. 16, n. 38, p. 8984–8993, 9 set. 2014.

SIMÃO, F. et al. Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following global cerebral ischemia. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 5, p. 659–665, 1 out. 2012.

SONG, Y. et al. Simultaneously enhancing the in vitro/in vivo performances of acetazolamide using proline as a zwitterionic coformer for cocrystallization. **CrystEngComm**, v. 21, n. 19, p. 3064–3073, 14 maio 2019.

SZABELAK, A. et al. Effects of L-proline on cellular responses of hen erythrocytes subjected to thermal stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 96, p. 102855, 1 fev. 2021.

THAKARE, V. N.; OSAMA, M. M.; NAIK, S. R. Therapeutic potential of curcumin in experimentally induced allergic rhinitis in guinea pigs. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 18–25, set. 2013. SRIMAL, R. C.; DHAWAN, B.

N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 447–452, jun. 1973.

THIPPARABOINA, R. et al. Multidrug co-crystals: towards the development of effective therapeutic hybrids. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 3, p. 481–490, mar. 2016.

TØNNESEN, H. H.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1–2, p. 127–135, 5 set. 2002.

TREVISAN, G. et al. A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 261–273, 1 out. 2013.

TRUZZI, F. et al. An Overview on Dietary Polyphenols and Their Biopharmaceutical Classification System (BCS). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5514, 24 maio 2021.

WALKER, C. I. B. et al. Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 169–175, 20 nov. 2008.

WANG, P. et al. Curcumin inhibits adverse psychological stress-induced proliferation and invasion of glioma cells via down-regulating the ERK/MAPK pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 15, p. 7190–7203, ago. 2021.

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, 25 jun. 2018.

WÜNSCHE, S. et al. A Contribution to the Solid State Forms of Bis(demethoxy)curcumin: Co-Crystal Screening and Characterization. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 3, 30 jan. 2021.

YAMASHITA, H. et al. Detection of cocrystal formation based on binary phase diagrams using thermal analysis. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 1, p. 70–80, jan. 2013.

YU, H.; HUANG, Q. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 669–674, 15 mar. 2010.

YU, Z. Q.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Operating Regions in Cooling Cocrystallization of Caffeine and Glutaric Acid in Acetonitrile. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 5, p. 2382–2387, 5 maio 2010.

ZHANG, L. et al. L-proline: a highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26326, 14 jul. 2016.

ZHAO, Z. et al. Formation of curcumin nanoparticles via solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3171–3181, 29 abr. 2015.

ZHENG, L.-F. et al. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 12, p. 1807–1816, 15 dez. 2006.

ZHOU, Y. et al. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. E515, 22 ago. 2016a.

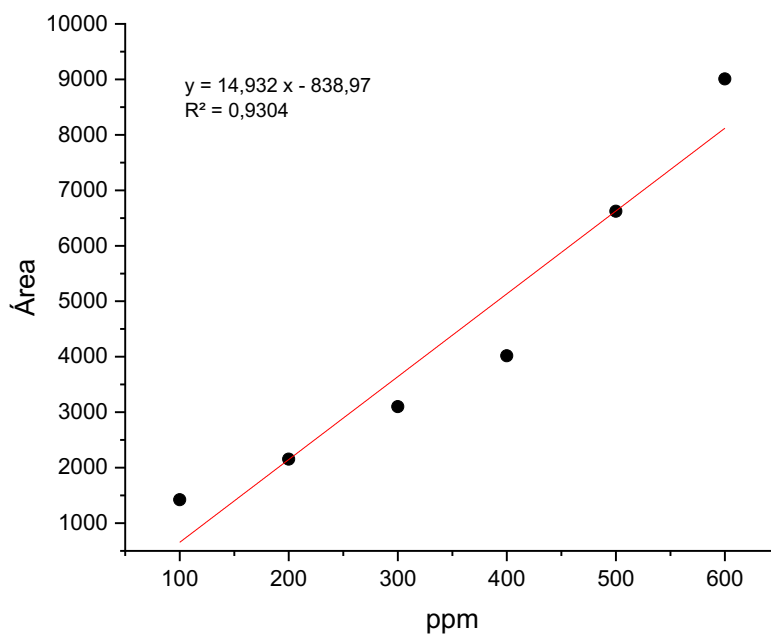
ZHOU, Z. et al. Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tableability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509, n. 1–2, p. 391–399, 25 jul. 2016b.

ZHU, Q. Y. et al. Antioxidative Activities of Oolong Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6929–6934, 1 nov. 2002.

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: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 93, p. 196–204, jun. 2015.

APÊNDICE A – Curva de calibração construída por CG-FID para determinação de solvente residual

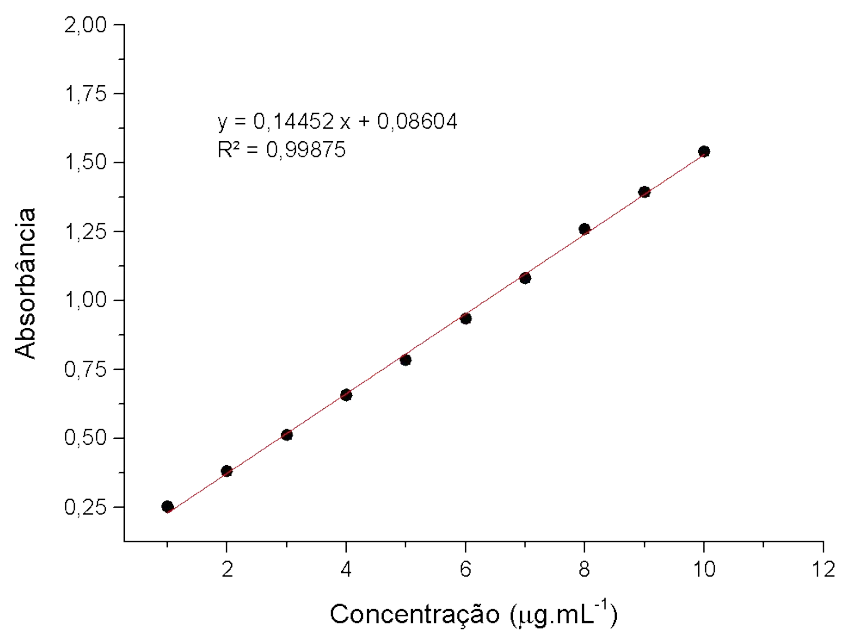
Figura 26 – Curva de calibração para quantificação de ppm residual de etanol.



Fonte: elaborado pelo autor.

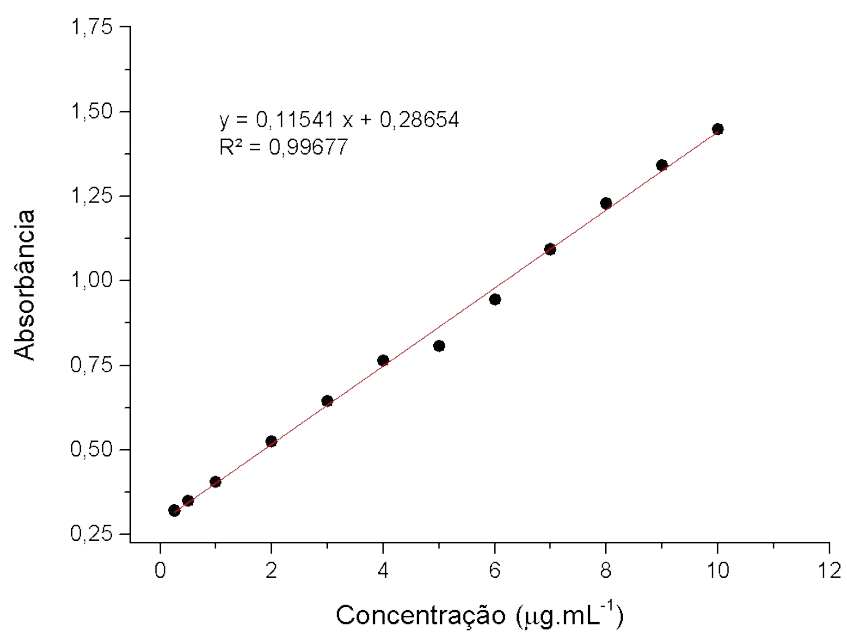
APÊNDICE B – Curvas de calibração para determinação da concentração de curcumina e resveratrol

Figura 27 – Curva de calibração média da curcumina obtida por espectrofotometria UV em 423 nm.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 28 – Curva de calibração média do resveratrol obtida por espectrofotometria UV em 306 nm.



Fonte: elaborado pelo autor.

**ANEXO A – Especificação técnica e laudo de análise da curcumina emitidos
pelo fornecedor Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda**



**Especificação Técnica do
Produto**

Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda
CNPJ: 00.327.149/0003-41 I.E.: 672.313.766.110
Rua Ernesto Joaquim de Souza, 575
CEP: 08655-805 - Chácara Primavera, Suzano-SP
Tel: (11) 2219-9999 Fax: (11) 2219-9999

Nro. CAS	458-37-7	Fórmula Molecular	[HOC ₆ H ₇ (OCH ₃)CH=CHCO] ₂ CH ₂	Peso Molecular	368,38
----------	----------	-------------------	---	----------------	--------

Nome	Curcumina	Versão	0	Validade	5 Anos
Ref. Bibliográfica					
Elaborado por	Natalia Moraes	Data	16/06/2008		
Revisado por	Fabiano Teixeira de Oliveira	Data	16/06/2008		
Aprovado por	Carlos Alberto Santos Cappelletto	Data	17/06/2008		
Observações					

Determinação	Especificação
Teor	>= 95,0 %
Aparência	= Pó fino amarelo a laranja
Ponto de fusão	entre 175,00°C e 180,00°C

Observações Gerais

NEON**LAUDO DO PRODUTO**

Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda
 CNPJ: 00.327.149/0003-41 I.E.: 672.313.766.110
 Rua Ernesto Joaquim de Souza, 575
 CEP: 08555-805 - Chácara Primavera, Suzano-SP
 Tel: (11) 2219-9999 Fax: (11) 2219-9999

Nome: Curcumina P.A. (C.I. 75300) 10 g Lote: 48969

Nome	Curcumina	Número CAS	458-37-7
		Nro. de Lote	48969
Fórmula Molecular	$[\text{HO}\text{C}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCO}]_2\text{CH}_2$	Fabricação	01/11/2018
Peso Molecular	368,38	Validade	31/10/2023

Determinação	Especificação	Resultado
Teor	$\geq 95,0 \%$	96,21 %
Aparência	= Pó fino amarelo a laranja	Pó fino amarelo a laranja
Ponto de fusão	entre 175,00°C e 180,00°C	175,00 °C

Obs: * Produto classificado como reagente analítico, uso para laboratório de controle de qualidade e fins industriais.
 * Proibida a venda para menores de 18 anos.


Alexandre Oliveira (CRQ 04264809-IV Reg.)

Responsável Técnico

Observações Gerais

**ANEXO B – Certificado de análise do resveratrol emitido pelo fornecedor SM
Empreendimentos – São Paulo, Brasil**




CERTIFICADO DE ANÁLISE


INSUMO:	RESVERATROL	Pag 1	
ORIGEM/PROCEDENCIA:	CHINA/CHINA	DATA DE ANALISE:	04/08/2015
LOTE INTERNO:	1509957	LOTE FABRICANTE:	CHZ20150504
DATA DE FABRICAÇÃO:	Maior2015	DATA DE VALIDADE:	Maior2018
CAS:	501-36-0		
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:	00/00/0000	INF:	000.000
ORDEN FRACIONAMENTO:	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
Arsênico	≤ 2,0 mg/Kg	< 0,01 mg/Kg	Fabricante
Cádmio	≤ 1,0 mg/Kg	< 0,01 mg/Kg	Fabricante
Mercurio	≤ 0,1 mg/Kg	0,0279 mg/Kg	Fabricante
Solvente residual*	Etanol = 5000 ppm Metanol = 3000 ppm	2034,92 ppm 345,07 ppm	Fabricante
Pestícida 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 (Farmacopéia 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 () Retrovado


Responsável Técnico Substituto
Olivia Neiva Mesquita Mendes - CRF-GO Nº 5227


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


Laila Caroline de Oliveira Costa
Farmacêutica
CRF: 74.121

ANEXO C – Certificado de análise do resveratrol emitido pelo fornecedor Active Pharmaceutica



Active Pharmaceutica
FABRILHORA E DISTRIBUIDORA DE FARMACIA FARMACIA

CERTIFICADO DE ANÁLISES 12/21

RESVERATROL 99/

INSUMO: trans-RESVERATROL (POLYGONUM CUSPIDATUM)

NOME QUÍMICO: (E)-5-(4-Hydroxystyryl)benzene-1,3-diol

FÓRMULA MOLECULAR: C₁₄H₁₂O₃ PESO MOLECULAR: 228,24 g/mol

DCB: 11392 CAS: 501-36-0 NOME BOTÂNICO: *Polygonum cuspidatum*

PARTE UTILIZADA: Raiz e Caule Solvente: Etanol e água

ORIGEM: China FABRICANTE: Changsha Huir Biological Tech

LOTE FABRICANTE: 20081401-1 LOTE PRODUÇÃO: 0040/0421

FABRICAÇÃO: 14/08/2020 VALIDADE: 13/08/2022

ANÁLISE	MÉTODO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS	REFERÊNCIA
Descrição	Visual	Pó bege a <i>off-white</i>	Conforme*	Fabricante
Identificação	IV	Espectro conforme padrão de referência	Conforme*	-
Teor	HPLC	≥ 98,0 %	98,30 %**	Fabricante
Solubilidade	FB 6 <Solubilidade>	Facilmente solúvel em metanol	Conforme*	Fabricante
Densidade aparente	Densímetro	Informativo	0,37 g/cm ³ *	-
Perda por dessecação	1 g/105 °C/peso constante	≤ 5,0 %	0,22 %*	Fabricante
Cinzas sulfatadas	1 g/800 °C/peso constante	≤ 1,0 %	0,08 %*	Fabricante
Tamanho de partícula	Tamis	Passa em malha 80	Conforme**	Fabricante
Metais pesados	Colorimetria	≤ 10 ppm	Conforme**	Fabricante
Arsênio	Abs. atômica	≤ 2 ppm	Conforme**	Fabricante
Chumbo	Abs. atômica	≤ 3 ppm	Conforme**	Fabricante
Cádmio	Abs. atômica	≤ 1 ppm	Conforme**	Fabricante
Merúrio	Abs. atômica	≤ 0,1 ppm	Conforme**	Fabricante
Aflatoxinas	CP 2015	≤ 4 ppb	Conforme**	Fabricante
Pesticidas	CP 2015	Conforme	Conforme**	Fabricante
Contagem total de bactérias aeróbias	FB 6 <5.5.3.1.2>	≤ 10 ² UFC/g	Conforme*	FB 6
Contagem total de fungos	FB 6 <5.5.3.1.2>	≤ 10 ¹ UFC/g	Conforme*	FB 6
Bactérias gram negativas bile tolerantes	FB 6 <5.5.3.1.3>	≤ 10 ² NMP/g	Conforme*	FB 6
<i>Salmonella</i>	FB 6 <5.5.3.1.3>	Ausente	Conforme*	FB 6
<i>E. coli</i>	FB 6 <5.5.3.1.3>	Ausente	Conforme*	FB 6
<i>S. aureus</i>	FB 6 <5.5.3.1.3>	Ausente	Conforme*	FB 6
<i>P. aeruginosa</i>	FB 6 <5.5.3.1.3>	Ausente	Conforme*	FB 6
<i>Clostridium</i>	FB 6 <5.5.3.1.3>	Ausente	Conforme*	FB 6

*Resultado obtido no Laboratório de Controle de Qualidade Active Pharmaceutica.

**Resultado transcrito conforme laudo original do fabricante

Avenida das Universidades, 453 - Pedra Branca - Palhoça - SC | CEP 88137-315
Tel. 0800 001 1313 | (48) 2132-2699 | Whatsapp: (48) 98835-2603
www.activepharmaceutica.com.br | CNPJ 09.026.759/0001-18



Active Pharmaceutica
 IMPORTADORA E DISTRIBUIDORA DE REMÉDIOS FARMACÉUTICOS

Conclusão

- (X) Aprovado
 () Reprovado

Armazenamento: Conservar em recipientes bem fechados ao abrigo de luz, calor e umidade.

Luis G. Ferreira
 Diretor Técnico
 CRF SC 5378

Aline Buttchevitz
 CRF SC 13616

Marina A. Sperandio
 CRF SC 9644

Camila F. Konell
 CRF/SC 11435

Palhoça, 18 de Janeiro de 2

1x 500g
Vita Essencia
 LAUDO CQ
 Características: Pó Bege
 PH: - / -
 Solubilidade: Facilmente solúvel em álcool
 Densidade: 0,365
 PF: - / -
 Realizado por/ Data: Giandoma 31/05/21
ma

ANEXO D – Certificado de aprovação dos estudos *in vivo* pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE COCRISTAIS DE CURCUMINA PRODUZIDOS POR TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA.” protocolo nº007/17, sob a responsabilidade de Liz Girardi Müller, que envolve a produção/manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrada (exceto homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de oito de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ).

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica.
Vigência da Autorização	01/2017 à 12/2020.
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos linhagem Swiss (Mus musculus) Especie: Táxon.
Nº de animais	400.
Peso/Idade	25-35g/ 8 semanas.
Sexo	Macho.
Origem	Biotério.

Prof. Ronei Baldissera

Coordenador da CEUA – Unochapecó