

Marcela Mattus Ribas

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE
CURCUMINA POR TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA**

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

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de
Oliveira

Coorientador: Dr. Gean Pablo S.
Aguiar

Florianópolis
2019

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

Ribas, Marcela Mattus

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE
CURCUMINA POR TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA / Marcela
Mattus Ribas ; orientador, José Vladimir de
Oliveira, coorientador, Gean Pablo Silva Aguiar,
2019.

124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Cocrystalização.
3. Curcumina. 4. Fluido supercrítico. 5.
Antinociceptivo. I. Oliveira, José Vladimir de. II.
Aguiar, Gean Pablo Silva. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE CURCUMINA POR TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA”

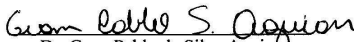
Por

Marcela Mattus Ribas

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



Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira
Orientador

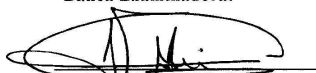


Dr. Gean Pablo da Silva Aguiar
Coorientador




Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Coordenadora

Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Vladimir de
Oliveira



Profa. Dra. Páulia Maria Cardoso Lima
Reis



Dr. Evertan Antônio Rebelatto

Florianópolis, 08 de março de 2019.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Edna e Silvio e aos meus irmãos, Andressa e Thiago por todo apoio e incentivo à educação, à persistência e à conquista dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e me dar força para seguir com meus objetivos e propósitos.

Aos meus Pais, Edna e Silvio e irmãos, Andressa e Thiago por todo apoio e dedicação para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Ao professor Dr. José Vladimir de Oliveira e pela orientação do projeto, ensinamentos, correções, motivação e apoio.

Ao Dr. Gean Pablo Silva Aguiar pela coorientação, dedicação, treinamentos, orientações, correções e apoio concedidos ao longo ao longo da realização deste projeto.

Ao professor Marcelo Lanza por todas as contribuições e observações que proporcionaram a estruturação e andamento do trabalho.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATTESC) que tornaram os dias de trabalho agradáveis e alegres. Em especial aos amigos Aline E. Santos, Guilherme Sakata e Camila Dal Magro pela amizade, apoio, orientação, colaboração e parceria durante a realização das análises.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, e à todos do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Em especial ao Fernando Curbani e os professores pelas orientações e ensinamentos.

Ao Dr. Leandro Guarezi Nandi pelas análises realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC pela realização das análises de microscopia.

À banca examinadora, pela atenção e valorosas contribuições.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A ciência pode até nos dar o conhecimento do mundo, mas é em Deus que obtemos o significado.”

(Michael Heller)

RESUMO

A cocristalização é um método emergente que permite melhorar as propriedades físico-químicas como solubilidade, biodisponibilidade, taxa de dissolução e estabilidade. A curcumina é um ingrediente bioativo conhecido por sua ampla variedade de benefícios medicinais, como atividade anti-inflamatória, anticancerígena, antimalárica e antioxidante, porém sua baixa solubilidade em meio aquoso e, portanto, baixa biodisponibilidade representa uma barreira na sua utilização em alimentos e indústria farmacêutica. A cocristalização pode ser realizada por métodos a pressão ambiente ou alta pressão. Alguns exemplos de métodos a pressão ambiente são: evaporação de solvente, moagem, moagem assistida por líquido, líquido antissolvente e fusão. Cocristalização a alta pressão pode ser obtida através do uso de dióxido de carbono supercrítico, por diversas metodologias. As principais vantagens do uso de fluido supercrítico para cocristalização são: obtenção de cocristais de alta pureza, processos de etapa única, controle de polimorfismo, processamento de moléculas termolábeis, reduzido uso de solventes orgânicos e por se tratar de uma técnica verde, não agride o meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo produzir cocristais de curcumina por Cocristalização com Solvente Supercrítico (CSS) e Gás Antissolvente (GAS) visando melhorar a taxa de dissolução da curcumina em água. A N-acetilcisteína (NAC) e nicotinamida (NIC) foram escolhidas como coformadores por triagem prévia usando a técnica Moagem Assistida por Líquido (LAG) e Líquido Antissolvente (LAS). A formação dos cocristais foi confirmada por meio de caracterizações por Calorimetria Diferencial de Varredura, Difração de Raios X em Pó, Espectroscopia de Transformada de Fourier-Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura. A taxa de dissolução dos cocristais foi cerca de 2 vezes maior que a dissolução de curcumina pura em meio aquoso. No teste *in vivo* foi possível analisar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do cocristal de curcumina e nicotinamida. A aplicação *in vivo* mostrou que a cocristalização reduziu a dose terapêutica em 100 vezes, quando comparado à curcumina pura. A cocristalização pode, assim, aumentar a eficiência de dissolução, a biodisponibilidade e potencializar o efeito terapêutico de ingredientes ativos, abrindo novas possibilidades de uso para esses cocristais nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Palavras-chave: Cocrystalização. Dióxido de carbono supercrítico. Biodisponibilidade. Antinociceptivo. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

Cocrystallization is an emerging method that enables an improvement in physicochemical properties such as solubility, bioavailability, dissolution rate and stability. Curcumin is bioactive ingredient known for its wide variety of medicinal benefits, such as anti-inflammatory, anti-carcinogenic, antimalarial and antioxidant activity, however its low solubility in water medium and hence low bioavailability represents a barrier in its use in food and pharmaceutical industry. The cocrystallization may be carried out by atmospheric pressure or high pressure methods. Some examples of methods at atmospheric pressure are: solvent evaporation, milling, liquid-assisted grinding, liquid antisolvent and melting. High pressure cocrystallization can be obtained through the use of supercritical carbon dioxide, by various methodologies. The main advantages of the use of supercritical fluid for cocrystallization are: obtaining high purity cocrystals, single-stage processes, polymorphism control, thermolabile molecule processing, reduced use of organic solvents and is a green technique. This work aims to produce curcumin cocrystals by Cocrystallization with Supercritical Solvent (CSS) and Gas Antisolvent (GAS) technique in order to improve curcumin water dissolution rate. N-acetylcysteine (NAC) and nicotinamide (NIC) were chose as cofomers by previous screening using Liquid Assisted Grinding (LAG) and Liquid Antisolvent (LAS) technique. The cocrystals formations were confirmed through characterizations by Differential Scanning Calorimetry, Powder X-Ray Diffraction, Fourier Transform-Infrared Spectroscopy and Scanning Electron Microscopy. Cocrystals dissolution rate were about 2 times greater than pure curcumin dissolution in water medium. In the *in vivo* test it was possible to analyze the antinociceptive and anti-inflammatory effect of the curcumin and nicotinamide cocrystal. *In vivo* application showed that cocrystallization allows to reduce by 100 times the therapeutic dose when compared to pure curcumin. The cocrystallization can thus increase dissolution efficiency, bioavailability and potentiate the therapeutic effect of active ingredients, opening up new possibilities of use for these cocrystals in pharmaceutical and food industries.

Keywords: Cocrystallization. Supercritical Carbon Dioxide. Bioavailability. Antinociceptive. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais propriedades biológicas da curcumina.	30
Figura 2 - Representação da molécula de curcumina apresentando as formas ceto e enol, as regiões de possibilidade de ligação de hidrogênio e as regiões hidrofóbicas da molécula.	31
Figura 3 - Esquema dos arranjos mais comuns do estado sólido e seus respectivos componentes.	34
Figura 4 - Diagrama de pressão-temperatura para um componente puro.....	37
Figura 5 - Diagrama esquemático simplificado da técnica CSS.	38
Figura 6 - Diagrama esquemático simplificado da técnica GAS.	40
Figura 7 - Aparato experimental para utilização de dióxido de carbono supercrítico.	49
Figura 8 - Parte interna da câmara de precipitação com suporte de filtros.	51
Figura 9 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAG com acetato de etila.	60
Figura 10 - Difrátogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAG com acetato de etila.	61
Figura 11 - DSC da nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por LAG com acetato de etila.	62
Figura 12 - Difrátogramas da nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por LAG com acetato de etila.	63
Figura 13 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAS com acetato de etila.	65
Figura 14 - Difrátogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAS com acetato de etila.....	66
Figura 15 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.	69
Figura 16 - Difrátogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.	71
Figura 17 - Espectros FTIR da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.	72
Figura 18 - Imagens do MEV da curcumina, N-acetilcisteína e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.	74
Figura 19 - DSC da Nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.	75
Figura 20 - Difrátogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.	77
Figura 21 - Espectros FTIR da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente e com acetona.	79

Figura 22 - Imagens do MEV da curcumina, nicotinamida e das amostras CUR-NIC produzida por CSS sem cossolvente e com acetona.	81
Figura 23 - DSC da piperina, curcumina e da amostra CUR-PIP produzida por CSS sem cossolvente.	82
Figura 24 - Difratoogramas da piperina curcumina e da amostra CUR-PIP produzida por CSS sem cossolvente.	83
Figura 25 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e da amostra CUR-NAC produzida por GAS com acetona.	85
Figura 26 - Difratoogramas da N-acetilcisteína, curcumina e da amostra CUR-NAC produzida por GAS com acetona.	86
Figura 27 - Espectros FTIR da N-acetilcisteína, curcumina e da amostra CUR-NAC produzida por GAS com acetona.	87
Figura 28 - Imagens do MEV da curcumina, nicotinamida e das amostras CUR-NAC produzida por GAS com acetona.	89
Figura 29 - DSC da Nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por GAS com acetona.	90
Figura 30 - Difratoograma da nicotinamida, curcumina e da amostra CUR-NIC produzida por GAS com acetona.	91
Figura 31 - Espectros FTIR da nicotinamida, curcumina e da amostra CUR-NIC produzida por GAS com acetona.	92
Figura 32 - Imagens do MEV da curcumina, nicotinamida e da amostra CUR-NIC produzida por GAS com acetona.	93
Figura 33 - Perfil de dissolução de cocristais de curcumina e N-acetilcisteína produzidos por CSS e GAS.	97
Figura 34 - Perfil de dissolução de cocristais de curcumina e nicotinamida produzidos por CSS e GAS.	99
Figura 35 - Eficiência de dissolução em 180 min da curcumina pura (CUR) e dos cocristais de curcumina com N-acetilcisteína (CUR-NAC) e nicotinamida (CUR-NIC) obtidos por CSS e GAS.	100
Figura 36 - Efeitos do comportamento nociceptivo do cocrystal CUR-NIC em camundongos avaliados na primeira fase (painel A, 0-5 min) e na segunda fase (painel B, 15-30 min) do comportamento nociceptivo induzido pela formalina.	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Publicações encontradas sobre cocristais de curcumina.	32
Quadro 2 - Classificação da biodisponibilidade de acordo com a BCS.	43
Quadro 3 - Propriedades da curcumina e coformadores.	45
Quadro 4 - Características das amostras produzidas a pressão ambiente.....	47
Quadro 5 - Características das amostras produzidas por CSS.....	52
Quadro 6 - Características das amostras produzidas por GAS.....	53
Quadro 7 - Conclusões obtidas após análise dos resultados das amostras produzidas por evaporação lenta (EL).	58
Quadro 8 - Conclusões obtidas após análise dos resultados das amostras produzidas por LAS e LAG.	67
Quadro 9 - Conclusões obtidas após análise dos resultados das amostras produzidas por CSS e GAS.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais propriedades de líquidos, gases e fluidos supercríticos.....	37
Tabela 2 - Propriedades dos solventes orgânicos utilizados.	46
Tabela 3 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, N-acetilcisteína e dos cocristais formados por CSS.	73
Tabela 4 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, N-acetilcisteína e dos cocristais formados por CSS.	74
Tabela 5 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, nicotinamida dos cocristais formados por CSS.	80
Tabela 6 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, nicotinamida e dos cocristais formados por CSS.	81
Tabela 7 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, N-acetilcisteína e do cocristal formado por GAS.	88
Tabela 8 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, nicotinamida e dos cocristais formados por CSS.	89
Tabela 9 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, nicotinamida dos cocristais formados por GAS.	93
Tabela 10 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, nicotinamida e dos cocristais formados por GAS.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- API – *Active pharmaceutical ingredient* (Ingrediente farmacêutico ativo)
- CO₂sc – Dióxido de carbono supercrítico
- CSS – *Cocrystallization with supercritical solvent* (Cocrystalização com solvente supercrítico)
- CUR – Curcumina
- DRXP – Difração de raio-X de pó
- DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria diferencial de varredura)
- ED – Eficiência de dissolução
- EL – Evaporação lenta
- FTIR – *Fourier Transformed Infra-red Spectroscopy* (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier)
- GAS – *Gas antisolvent* (Gás antissolvente)
- LAG – *Liquid assisted grinding* (Moagem assistida por líquido)
- LAS – *Liquid antisolvent* (Líquido antissolvente)
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- NAC – *N*-acetilcisteína
- NIC – Nicotinamida
- Pc – Pressão crítica
- PIP – Piperina
- SAS – *Supercritical Antisolvent* (Antissolvente supercrítico)
- SEA – *Supercritical fluid Enhanced Atomization* (Atomização Reforçada por Fluido Supercrítico)
- SEDS – *Solution Enhanced Dispersion of Supercritical Fluids* (Dispersão em solução melhorada por fluidos supercríticos)
- SGF – *Simulated Gastric Fluid* (Fluido gástrico simulado)
- SIF – *Simulated Intestinal Fluid* (Fluido intestinal simulado)
- Tc – Temperatura crítica

SUMÁRIO

<u>ESTRUTURA DO DOCUMENTO</u>	51
<u>CAPÍTULO 1</u>	25
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	27
1.1.1 Objetivo Geral.....	27
1.1.2 Objetivos Específicos.....	27
<u>CAPÍTULO 2</u>	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 CURCUMINA	29
2.2 COCRISTAIS	33
2.2.1 Definição.....	33
2.2.2 Formação do cocristal	33
2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE COCRISTAIS	35
2.3.1 Técnicas a pressão ambiente	35
2.3.2 Técnicas com uso de fluido supercrítico	35
2.4 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	36
2.4.1 Dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ sc).....	38
2.4.1.1 CO ₂ supercrítico como solvente	38
2.4.1.2 CO ₂ supercrítico como antissolvente	39
2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS COCRISTAIS	40
2.5.1 Análise térmica.....	40
2.5.2 Difração de raio-X de pó.....	41
2.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier ..	41
2.5.4 Microscopia eletrônica de varredura	41
2.6 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COCRISTAIS	42
2.6.1 Ponto de fusão	42
2.6.2 Solubilidade.....	42
2.6.3 Biodisponibilidade	43
<u>CAPÍTULO 3</u>	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 MATERIAIS	45

3.1.1 Princípio ativo e coformadores	45
3.1.2 Solventes	46
3.1.3 Animais	46
3.2 MÉTODOS	47
3.2.1 Produção de cocristais a pressão ambiente	47
3.2.1.1 Evaporação lenta de solvente (EL)	48
3.2.1.2 Moagem assistida por líquido (LAG)	48
3.2.1.3 Líquido antissolvente (LAS)	48
3.2.2 Produção de cocristais com fluido supercrítico.....	49
3.2.2.1 Unidade experimental	49
3.2.2.2 Cocristalização com solvente supercrítico (CSS)	51
3.2.2.3 Gás antissolvente (GAS).....	52
3.2.3 Metodologias de caracterização dos cocristais.....	53
3.2.3.1 Análise térmica	54
3.2.3.2 Difração de raio-X de pó.....	54
3.2.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	54
3.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	55
3.2.3.5 Perfil e eficiência de dissolução.....	55
3.2.4 Teste de nocicepção induzida por formalina (<i>in vivo</i>)	56
<u>CAPÍTULO 4</u>	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 ESCOLHA DOS COFORMADORES	57
4.1.1 EVAPORAÇÃO LENTA (EL).....	57
4.1.2 MOAGEM ASSISTIDA POR LÍQUIDO (LAG).....	59
4.1.2.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC).....	59
4.1.2.2 Curcumina e nicotinamida (CUR-NIC)	62
4.1.3 LÍQUIDO ANTISSOLVENTE (LAS)	64
4.1.3.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC).....	64
4.1.4 CONCLUSÃO	67
4.2 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS DE CURCUMINA EM MEIO SUPERCRÍTICO	68
4.2.1 COCRISTALIZAÇÃO COM SOLVENTE SUPERCRÍTICO ...	68
4.2.1.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC).....	68

4.2.1.2 Curcumina e nicotinamida (CUR-NIC).....	75
4.2.1.3 Curcumina e piperina (CUR-PIP)	82
4.2.2 GÁS ANTISSOLVENTE	84
4.2.2.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC).....	84
4.2.2.2 CUR-NIC	90
4.2.3 CONCLUSÃO	94
4.3 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO	96
4.3.1 PERFIL DE DISSOLUÇÃO	96
4.3.1.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC).....	96
4.3.1.2 Curcumina e nicotinamida (CUR-NIC).....	98
4.3.2 EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO	100
4.3.3 CONCLUSÃO	101
4.4 TESTE <i>IN VIVO</i>	102
4.4.1 TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA .	102
4.4.2 CONCLUSÃO	104
<u>CAPÍTULO 5</u>	105
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
5.1 CONCLUSÕES.....	105
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	106
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A – Curva de calibração da curcumina e varredura da N-acetilcisteína, nicotinamida e piperina.	119

ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Este documento foi organizado em 5 capítulos:

Capítulo 1 – Introdução.

Breve descrição dos tópicos abordados no presente trabalho e apresentação dos objetivos.

Capítulo 2 – Revisão bibliográfica.

Apresentação da revisão da literatura sobre a curcumina, os coformadores utilizados, cocristais e tecnologia supercrítica.

Capítulo 3 – Materiais e métodos.

Descrição dos materiais utilizados e das metodologias empregadas ao longo do desenvolvimento deste estudo. Este capítulo também incluiu a descrição do equipamento utilizado nos processos com dióxido de carbono supercrítico, bem como os procedimentos e condições de operação para cada técnica.

Capítulo 4 – Resultados e discussões.

4.1 Escolha dos coformadores.

Avaliação da formação de cocristais com diferentes coformadores a partir das técnicas de antissolvente líquido (LAS, do inglês “*liquid antisolvent*”) e moagem assistida por líquido (LAG, do inglês “*liquid assisted grinding*”). Escolha de coformadores a partir da análise dos resultados obtidos por calorimetria diferencial de varredura (DSC).

4.2 Cocristais obtidos por CSS e GAS.

Avaliação da formação de cocristais de curcumina a partir das técnicas de cocristalização com solvente supercrítico (CSS) e gás antissolvente (GAS). Os cocristais produzidos por cada uma das técnicas foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raio-X de pó (DRXP), Espectroscopia na região do

infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), e dissolução.

4.3 Estudos de dissolução dos cocristais.

Os cocristais produzidos por CSS e GAS foram analisados quanto ao seu potencial de dissolução durante 180 minutos em água destilada a 37 °C e 100 rpm. Leitura espectrofotométrica foi realizada em tempos previamente determinados e os resultados obtidos foram correlacionados com uma curva padrão de curcumina. O principal objetivo foi comparar a dissolução dos cocristais com a curcumina pura, visando verificar possíveis melhoras nessa propriedade.

4.4 Teste *in vivo* de formalina

O cocrystal produzido com curcumina e nicotinamida por CSS sem adição de cossolvente foi utilizado em um teste de nocicepção induzida por formalina. O principal objetivo foi comparar o efeito da curcumina pura com o cocrystal e o controle positivo (diclofenaco).

Capítulo 5 – Considerações finais.

Conclusão geral sobre o trabalho e sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A biodisponibilidade é um dos aspectos mais importantes quando o objetivo é obter os efeitos benéficos de compostos bioativos. Essa propriedade depende principalmente da solubilidade e do potencial de dissolução dos compostos sólidos. Técnicas como microencapsulação, micronização, produção de polimorfos e cocristalização vêm sendo empregadas com o objetivo de aumentar a solubilidade e, como consequência, aumentar a biodisponibilidade de compostos bioativos pouco solúveis em água (SANPHUI *et al.*, 2011; KHO; NUGROHO; SUGIH; 2018; CHOW *et al.*, 2014).

A cocristalização é uma metodologia emergente que tem como objetivo principal melhorar propriedades físico-químicas de um ingrediente ativo, como solubilidade, biodisponibilidade, potencial de dissolução, ponto de fusão e estabilidade (SU *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; THAKURIA *et al.*, 2013). Cocristais são formados por um ingrediente ativo e um ou mais coformadores em um razão estequiométrica definida por interações não covalentes como ligação de hidrogênio e forças atrativas de Van der Waals (THAKURIA *et al.*, 2013; BLAGDEN *et al.*, 2007).

A cocristalização pode ser realizada por métodos a pressão ambiente ou alta pressão. Alguns exemplos de métodos a pressão ambiente são: evaporação de solvente, moagem, moagem assistida por líquido, líquido antissolvente e fusão. Cocristalização a alta pressão pode ser obtida por meio do uso de dióxido de carbono supercrítico (WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRAKOOOL, 2018). As principais vantagens do uso de fluido supercrítico para cocristalização são: obtenção de cocristais de alta pureza, processos de etapa única, controle de polimorfismo, processamento de moléculas termolábeis, reduzido uso de solventes orgânicos e, por se tratar de uma técnica verde não agride o meio ambiente (FAGES *et al.*, 2004). As principais técnicas de cocristalização em meio supercrítico são Gás antissolvente (GAS) (WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRAKOOOL, 2018; ERRIGUIBLE *et al.*, 2015; NEUROHR *et al.*, 2016), Cocristalização com Solvente Supercrítico (CSS) (PADRELA *et al.*, 2009, 2015, 2018), Antissolvente Supercrítico (SAS) (PADRELA *et al.*, 2009, 2018; CUADRA *et al.*, 2016, 2018) e Atomização Reforçada por Fluido Supercrítico (SEA) (PADRELA *et al.*, 2010, 2014).

O dióxido de carbono supercrítico (CO_{2sc}) é um solvente “verde” atóxico e não inflamável que apresenta temperatura e pressão crítica moderadas (31°C e 7,4 MPa). Pequenas mudanças na pressão e temperatura resultam em modificações na densidade e no poder de solvatação do CO_{2sc} (CUADRA *et al.*, 2016). Na cocristalização com solvente supercrítico (CSS), o CO_{2sc} age como um solvente, facilitando interações moleculares, nucleação e crescimento do cocristal. As principais vantagens do CSS são: reduzido ou nenhum uso de solvente orgânico, rápida remoção do CO₂ sem etapa de secagem, técnica “verde”, alta pureza dos cocristais, bom controle de solubilidade com pequenas modificações na temperatura e pressão e um alto rendimento (PADRELA *et al.*, 2018).

A curcumina é um polifenol hidrofóbico tendo como nome químico 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona e nome comum diferuloilmetano (SANPHUI *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2015). Esse composto bioativo é extraído do rizoma do tubérculo *Curcuma longa*, tipicamente usado na culinária indiana. Alguns estudos concluíram que a curcumina possui propriedades antibacterianas (BALAN *et al.*, 2016), antimaláricas (CUI; MIAO; CUI, 2007), antitumorais (RUBY *et al.*, 1995; THANGAPAZHAM, SHARMA & MAHESHWARI, 2006), anti-inflamatória, anti-HIV, antioxidante, entre outros (Figura 1) (AGGARWAL; SUNG, 2009; SALEM; ROHANI; GILLIES, 2014). Contudo, os benefícios de suas propriedades não são completamente aproveitados devido à sua baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade (SATHISARAN; DALVI, 2017). Observa-se que há escassez de publicações sobre o tema, principalmente com enfoque na avaliação de propriedades biológicas de cocristais em testes *in vivo*. Além disso, até o momento não foram publicados trabalhos sobre a cocristalização da curcumina com o uso de dióxido de carbono supercrítico.

Este trabalho tem por objetivo produzir cocristais de curcumina com coformadores através de cocristalização com solvente supercrítico (CSS) e gás antissolvente (GAS), visando aumentar o potencial de dissolução da curcumina em água e melhorar o potencial terapêutico deste ingrediente ativo *in vivo*. Os coformadores foram previamente escolhidos com base na sua solubilidade em água e, em seguida, testados por metodologias a pressão ambiente quanto ao seu potencial de cocristalização. Após produção, os cocristais foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raio-X de pó (DRXP), Espectroscopia na região do infravermelho com transformada

de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e dissolução.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo produzir cocristais de curcumina com coformadores a partir da aplicação de dióxido de carbono supercrítico como solvente (CSS) e antissolvente (GAS), visando aumentar o potencial de dissolução da curcumina em água e melhorar o potencial terapêutico deste ingrediente ativo *in vivo*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar coformadores a partir de métodos a pressão ambiente;
- Produzir cocristais de curcumina com coformadores a partir da técnica de Cocrystalização com Solvente Supercrítico (CSS) e Gás Antissolvente (GAS);
- Verificar a formação ou não de cocristais através da caracterização dos compostos por calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raio-X de pó (DRXP) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR);
- Analisar a morfologia e tamanho de partícula dos cocristais a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar o perfil de dissolução dos cocristais, através de quantificação por espectroscopia no ultravioleta visível, comparando-os à curcumina pura.
- Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do cocrystal, a partir da aplicação *in vivo*, em comparação à curcumina pura.

CAPÍTULO 2

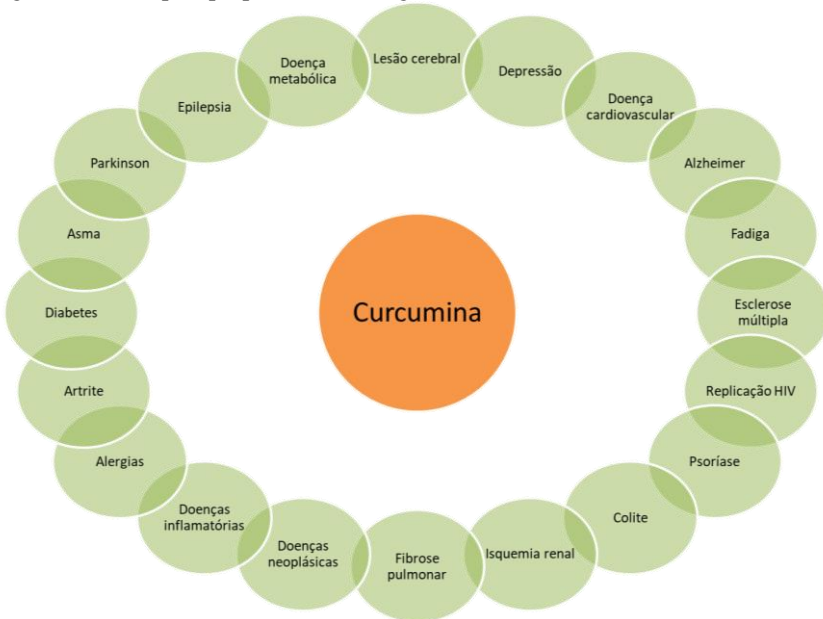
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CURCUMINA

A curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) é um polifenol hidrofóbico tendo como nome químico 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona e nome comum diferuloilmetano (SANPHUI *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2015). Este composto bioativo é extraído do rizoma do tubérculo *Curcuma longa*, tipicamente usado na culinária indiana. Alguns estudos concluíram que a curcumina possui propriedades antibacterianas (BALAN *et al.*, 2016), antimaláricas (CUI; MIAO; CUI, 2007), antitumorais (RUBY *et al.*, 1995; THANGAPAZHAM, SHARMA & MAHESHWARI., 2006), anti-inflamatória, anti-HIV, antioxidante, entre outros (Figura 1) (AGGARWAL; SUNG, 2009; SALEM; ROHANI; GILLIES, 2014).

O efeito anti-inflamatório da curcumina advém de seu potencial de redução de fatores de transcrição inflamatória (como fator nuclear κB), enzimas (como a cicloxigenase 2 e lipoxigenase 5) e citocinas (como fator de necrose tumoral, interleucina 1 e interleucina 6) (AGGARWAL; SUNG, 2009). Estudos relataram que a curcumina pura, bem como nanopartículas de curcumina inibem a ativação do fator de transcrição $NF\kappa B$ e reduzem os níveis estacionários de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas e $TNF-\alpha$. No entanto, os autores não determinaram o efeito *in vivo* da nanocurcumina em camundongos para mostrar qualquer aumento potencial terapêutico comparado à curcumina pura (KARIKAR *et al.*, 2007; AGGARWALL; SUNG, 2009). Estudos indicam que a β -dicetona bi- α,β -insaturada, os dois grupos metóxi, os dois grupos hidróxi fenólicos e as duas duplas ligações da curcumina desempenham papel essencial nas atividades antiproliferativa e anti-inflamatória desse ingrediente (SANDUR *et al.*, 2007). O efeito anti-inflamatório, antiproliferativo e antioxidante indicam que a curcumina é altamente pleiotrópica, apresentando inúmeros alvos celulares e mecanismos de ação, podendo atuar na prevenção de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, metabólicas, autoimunes e neoplásicas (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2008). Devido à ação anti-inflamatória, a curcumina pode reverter quadros inflamatórios e desregulações metabólicas associadas à obesidade, além de melhorar o controle glicêmico em modelos animais com diabetes tipo 2 (WEISBERG *et al.*, 2008).

Figura 1 – Principais propriedades biológicas da curcumina.

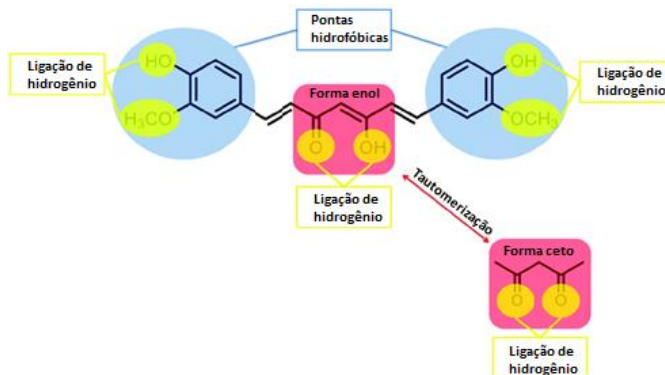


Fonte: Adaptado de Aggarwal e Harikumar (2008).

Os benefícios da ingestão de curcumina não são completamente aproveitados devido à sua baixa biodisponibilidade, sendo essa característica consequente de seu baixo potencial de dissolução, baixa absorção, rápido metabolismo e rápida eliminação pelo sistema biológico (SATHISARAN; DALVI, 2017; KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018; ANAND *et al.*, 2007). A solubilidade da curcumina em água é abaixo de 0,6 µg/mL (KAURIEN *et al.*, 2007).

A molécula da curcumina existe como tautômeros ceto-enol (Figura 2), predominando a forma ceto em soluções ácidas e neutras e enol em soluções alcalinas. Os tautômeros ceto-enólicos da curcumina oferecem pontos de acesso para a formação de novas pontes de hidrogênio a partir da modificação das interações moleculares entre a curcumina e os coformadores (SATHISARAN; DALVI, 2017). A curcumina se decompõe rapidamente em meios alcalinos e neutros, sendo que em apenas 30 minutos mais de 90% da curcumina é decomposta em tampão a pH 7,4 (WANG *et al.*, 1997).

Figura 2 - Representação da molécula de curcumina apresentando as formas ceto e enol, as regiões de possibilidade de ligação de hidrogênio e as regiões hidrofóbicas da molécula.



Fonte: Adaptado de Salem; Rohani; Gillies (2014).

A formação de sais é um dos métodos mais utilizados para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de um ingrediente farmacêutico ativo (API) pouco solúvel em água, porém para moléculas como a curcumina, que não possuem grupos ionizáveis, não ocorre a formação de sal (SATHISARAN; DALVI, 2017). Diversas outras técnicas visando o aumento da estabilidade e biodisponibilidade da curcumina vêm sendo empregadas, são elas: adição de adjuvantes como piperina, com o objetivo de bloquear vias metabólicas da curcumina; produção de nanopartículas, lipossomas, micelas e complexos fosfolipídicos e; administração concomitante com lecitina, quercitina, genistina, eugenol, terpinol, etc (ANAND *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 1997; ANTONY *et al.*, 2008). A cocristalização é uma técnica mais simples e barata comparada com outras técnicas como produção de nanopartículas e uso de *spray drying* (KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018).

A instabilidade da curcumina em solução neutra e alcalina pode ser atribuída ao ligante de β -dicetona na cadeia de sete carbonos da molécula. A reatividade do grupo ceto-enol pode ser modificada através da ligação de hidrogênio com compostos fenólicos em cocristais, podendo acarretar em formas sólidas de curcumina mais estáveis e solúveis (SANPHUI *et al.*, 2011). Sanphui *et al.* (2011) reportaram cocristalização de curcumina com resolcinol e pirogalol a partir de moagem assistida por líquido, o que acarretou em uma maior dissolução e solubilidade. Esse aumento na dissolução e estabilidade ocorreu

devido a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo fenol do resorcinol e pirogalol e o grupo ceto-enol da curcumina (SANPHUI *et al.*, 2011). No entanto, o uso frequente de resorcinol e pirogalol não é recomendado devido a sua toxicidade, necessitando de estudos mais aprofundados (KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018).

Outro estudo reportou a produção de cocristais de curcumina com floroglucinol através de evaporação de solvente, porém não houve melhora nas taxas de dissolução devido à separação instantânea da curcumina e do coformador quando colocados em contato com o meio de dissolução (CHOW *et al.*, 2014). Cocristais de curcumina e dextrose foram produzidos por Kho, Nugroho e Sugih (2018), estes cocristais apresentaram um aumento na solubilidade e estabilidade em meio ácido. Outros estudos feitos até o momento reportaram a formação de cocristais entre curcumina e nicotinamida (GATELY; TRIEZEMBERG, 2012), 4,4'-bipiridina-N,N'-dióxido (SU *et al.*, 2015), ácido salicílico e hidroxiquinol (SATHISARAN; DALVI, 2017). Goud *et al.* (2012) relataram que coformadores como nicotinamida, ácido ferúlico, hidroxiquinona, ácido p-hidroxibenzóico e ácido L-tartárico formam somente sólidos cristalinos eutéticos com a curcumina. O Quadro 1 apresenta trabalhos publicados sobre cocristais de curcumina. Nenhum estudo foi realizado até o momento sobre a cocristalização de curcumina com o uso de fluido supercrítico.

Quadro 1 - Publicações encontradas sobre cocristais de curcumina.

Coformador	Método	Referência
Resorcinol e pyrogallol	Moagem auxiliada por líquido	SANPHUI <i>et al.</i> 2011
Nicotinamida	Evaporação lenta	GATELY; TRIEZEMBERG, 2012
Phloroglucinol	Evaporação rápida de solvente	CHOW <i>et al.</i> , 2014
4,4'-bipiridina-N,N'-dióxido	Evaporação lenta	SU <i>et al.</i> , 2015
Ácido salicílico e hidroxiquinol	Fusão seguida de dissolução e evaporação lenta	SATHISARAN; DALVI, 2017
Dextrose	Solubilização a quente e cristalização a frio	KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018

2.2 COCRISTAIS

2.2.1 Definição

Segundo um guia publicado em dezembro de 2011 pela *Food and Drug Administration* (FDA), cocristais farmacêuticos são materiais sólidos cristalinos compostos de duas ou mais moléculas na mesma rede cristalina. Contudo, segundo a literatura, ainda não há uma definição exata para cocristais. Upadhyay *et al.* (2011) definiram cocristais como complexos supramoleculares não-iônicos que podem ser usados com o objetivo de alterar algumas propriedades físicas como solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade sem afetar a composição química do ingrediente farmacêutico ativo (API). Jayasankar *et al.* (2006) definiram como complexos cristalinos constituídos de duas ou mais moléculas neutras unidas na rede cristalina a partir de ligações não covalentes. Cocristais também foram definidos como materiais monofásicos cristalinos compostos por duas ou mais moléculas ou compostos iônicos diferentes, geralmente em proporção estequiométrica e que, isolados, são sólidos em condições ambientes (25 °C, 1 atm) (AITIPAMULA *et al.*, 2012). Podemos observar que, de certa forma, a definição dada pela FDA abrange todas as definições citadas acima.

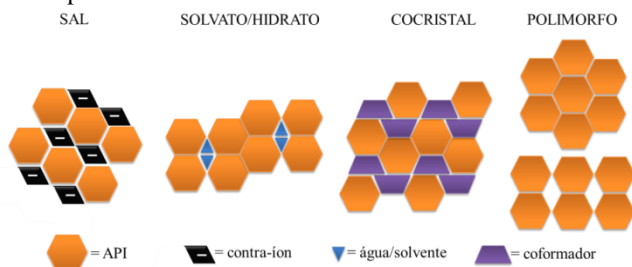
2.2.2 Formação do cocristal

A formação de um cocristal envolve a incorporação de um ingrediente ativo e um coformador (molécula inócua) na mesma rede cristalina. A seleção do coformador é geralmente feita com base nas regiões de complementaridade molecular entre ele e o fármaco. O principal aspecto observado é a presença de grupos funcionais capazes de formar ligações de hidrogênio entre as moléculas do fármaco e do coformador (ETTER, 1991).

As propriedades físicas fundamentais dos materiais cristalinos provêm do arranjo molecular do sólido. Portanto, a alteração da localização e das interações entre as moléculas causa um impacto direto nas propriedades do sólido. Atualmente existem diversas estratégias para alterar as propriedades químicas e físicas dos APIs, como a formação de sais, polimorfos, hidratos, solvatos e cocristais como ilustrado na Figura 3. A forma mais comum de modificar as propriedades físicas de um API é a partir da formação de um sal, porém é necessário que o API possua grupos ionizáveis (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009). A particularidade e interesse dos cocristais estão

principalmente ligados à capacidade de obtenção de novas espécies cristalinas a partir de qualquer molécula, independente de ser ácido, básico, com grupos ionizáveis ou não. (UPADHYAY *et al.*, 2011; SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009).

Figura 3 - Esquema dos arranjos mais comuns do estado sólido e seus respectivos componentes.



Fonte: Adaptado de Schultheiss; Newman, 2009.

Os cocristais podem ser formados por diferentes interações como pontes de hidrogênio, interações π - π e força de Van der Waals (UPADHAY *et al.*, 2011). A formação do cocristal pode ser predita a partir do valor do pKa do ácido e da base. Para formar um cocristal, devemos ter uma diferença menor que 2,7 entre o pKa da base e o pKa do ácido ($\text{pKa}_{\text{base}} - \text{pKa}_{\text{ácido}} < 2,7$), enquanto para formar um sal essa diferença deve ser maior que 2,7 (SEKHON, 2009).

Para a escolha do API é necessário avaliar o número e arranjo de doadores e receptores de hidrogênio (AAKERROY; SALMON, 2005; STEINER, 2002), habilidade de formar sal (pKa) (CHILDS; STAHLY; PARK, 2007), flexibilidade conformacional e a solubilidade (HORST *et al.*, 2008). Existe uma grande variedade de métodos para a formação de cocristais, porém ainda não há como prever se a reação de cocristalização entre um determinado API e um coformador será bem sucedida ou não. Assim, as reações devem ser realizadas experimentalmente em condições variadas e a partir de diferentes técnicas para encontrar possíveis cocristais (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009).

2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE COCRISTAIS

2.3.1 Técnicas a pressão ambiente

Diversas metodologias vêm sendo empregadas na obtenção de cocristais, sendo que os métodos mais comuns se baseiam na cocrystalização por solvente e através de moagem (HE *et al.*, 2008). Os métodos que envolvem a utilização de solvente incluem evaporação lenta, cristalização por reação, líquido antissolvente, cristalização por resfriamento, dentre outros. Já os métodos de moagem podem ser realizados a seco ou com a adição de gotas de solvente, através da utilização de gral e pistilo ou ainda moinho de bolas.

A moagem assistida por líquido (LAG, do inglês “liquid assisted grinding”) é baseada na formação de cocristais através da força mecânica com ajuda de um solvente, que deve imperativamente dissolver ao menos um dos compostos iniciais. No entanto essa metodologia apresenta grandes desvantagens como baixa pureza dos cocristais, baixo rendimento devido à perda significativa de composto durante o procedimento e é um processo demorado, pois necessita de ao menos 60 min de moagem. As vantagens são a praticidade da metodologia e o baixo custo (BRAGA; GREPIONI, 2005; TRASK *et al.*, 2004).

A utilização da técnica de líquido antissolvente (LAS, do inglês “liquid antisolvent”) também é amplamente utilizada, devido principalmente ao sua rápida observação da formação de precipitado, sendo este um indicativo da possível formação de cocrystal. No entanto a elevada utilização de solventes orgânicos para solubilização dos compostos e para precipitação dos mesmos aumenta o custo do processo, a poluição ambiental, pode formar solvatos indesejados, além de necessitar de etapa de centrifugação e secagem (DELORI *et al.*, 2012).

2.3.2 Técnicas com uso de fluido supercrítico

Além das técnicas tradicionais a pressão ambiente, métodos emergentes vêm sendo empregados, como é o caso da utilização de fluido supercrítico (PADRELA *et al.* 2009; PADRELA *et al.* 2010). As principais vantagens do uso de fluido supercrítico para cocrystalização são: obtenção de cocristais de alta pureza, processos de etapa única, controle de polimorfismo, processamento de moléculas termolábeis, reduzido uso de solventes orgânicos e se trata de uma técnica verde, ou

seja, não agride o meio ambiente (FAGES *et al.*, 2004). As principais técnicas de cocristalização em meio supercrítico são Gás antissolvente (GAS) (WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRAKOOL, 2018; ERRIGUIBLE *et al.*, 2015; NEUROHR *et al.*, 2016), Cocristalização com Solvente Supercrítico (CSS) (PADRELA *et al.*, 2009, 2015, 2018), Antissolvente Supercrítico (SAS) (PADRELA *et al.*, 2009, 2018; CUADRA *et al.*, 2016, 2018) e Atomização Reforçada por Fluido Supercrítico (SEA) (PADRELA *et al.*, 2010, 2014).

O dióxido de carbono é um solvente “verde” atóxico, não inflamável, apresenta temperatura e pressão crítica moderadas (31°C e 7,4 MPa). Pequenas mudanças na pressão e temperatura resultam em modificações na densidade e no poder de solvatação do CO_{2sc} (CUADRA *et al.*, 2016). Na cocristalização com solvente supercrítico (CSS), o CO_{2sc} age como um solvente, facilitando interações moleculares, nucleação e crescimento do cocristal. O CSS se assemelha à maceração, porém a altas pressões. As principais vantagens do CSS são: reduzido ou nenhum uso de solvente orgânico, rápida remoção do CO₂ sem etapa de secagem, técnica “verde”, alta pureza dos cocristais, bom controle de solubilidade com pequenas modificações na temperatura e pressão e um alto rendimento pode ser obtido (PADRELA *et al.*, 2018).

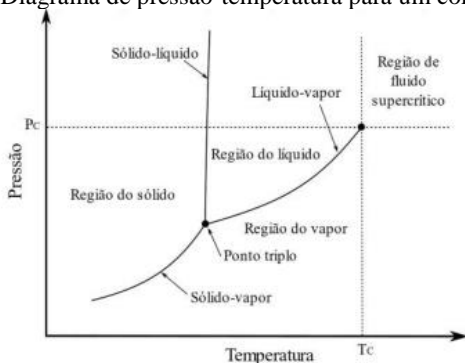
A técnica de gás antissolvente (GAS) consiste na solubilização do ingrediente ativo e do coformador em um solvente orgânico que ambos tenham solubilidade similar, seguida de precipitação através da aplicação de CO_{2sc} como antissolvente e posterior secagem do solvente. O solvente presente na câmara de precipitação expande devido à dissolução do CO_{2sc}, acarretando em uma força menor do que o solvente puro, o que ocasiona a supersaturação da mistura e precipitação do composto (JUNG; PERRUT, 2001).

2.4 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Um fluido supercrítico é caracterizado por estar acima da temperatura (T_c) e pressão crítica (P_c). Pequenas mudanças na temperatura e pressão críticas acarretam mudanças nas propriedades termofísicas dos fluidos supercríticos, como por exemplo, a densidade. Esses fluidos são altamente compressíveis, com densidades próximas à de líquidos e propriedades de transporte semelhantes à de um gás, não havendo mais distinção entre essas duas fases do composto (BRUNNER, 1994; RANDOLPH, 1990; CARRILHO *et al.*, 2001).

A Figura 4 apresenta o diagrama de fases para um componente puro. Neste diagrama é possível distinguir três fases de uma substância pura, sendo que as regiões de fases simples são separadas pelas curvas de equilíbrio sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor. Na intersecção das três curvas encontra-se o ponto triplo, onde a substância se encontra nos estados sólido, líquido e gasoso. Acima da curva líquido-vapor temos a região do fluido supercrítico, na qual as propriedades de líquido saturado e vapor saturado são iguais (PESSOA, 2018).

Figura 4 - Diagrama de pressão-temperatura para um componente puro.



A Tabela 1 apresenta as principais propriedades dos fluidos supercríticos comparadas às propriedades das fases líquida e gasosa. O fluido supercrítico apresenta baixa viscosidade e alta difusividade como um gás e massa específica semelhante à de um líquido (RODOLPH, 1990).

Tabela 1 - Principais propriedades de líquidos, gases e fluidos supercríticos.

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

Fonte: Adaptado de Starmans; Nijhuis (1996)

O poder de solvatação de um fluido supercrítico é dependente da massa específica, que por sua vez pode ser facilmente ajustada a partir de pequenas variações nos valores de temperatura e pressão críticas. Dessa forma o poder de solvatação de um fluido supercrítico

pode ser mais facilmente controlado do que um solvente líquido (RANDOLPH, 1990).

2.4.1 Dióxido de carbono supercrítico (CO₂sc)

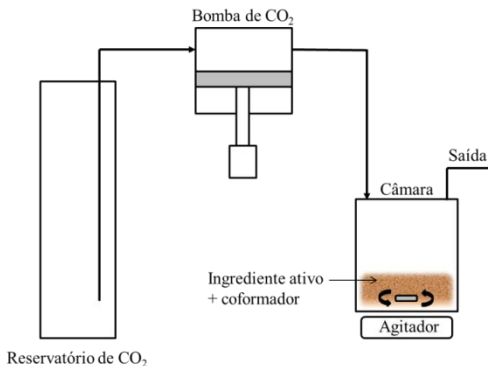
O dióxido de carbono é o fluido no estado supercrítico mais empregado em diversas metodologias, pois apresenta vantagens como: alta pureza, baixo custo, pressão e temperatura críticas moderadas, permitindo o processamento de compostos termolábeis (BRUNNER, 1994). Além disso, a maioria dos solventes orgânicos apresenta alta solubilidade em fluidos supercríticos, permitindo sua completa remoção e obtenção de produtos isentos de solvente (COCERO *et al.*, 2009).

A temperatura e pressão críticas do CO₂sc (T_c = 31,1 °C, P_c = 73,8 bar) são facilmente atingidas e o dióxido de carbono pode ser facilmente removido mediante despressurização simples do sistema (NALAWADE; PICCHIONI; JANSSEN, 2006; COCERO *et al.*, 2009). O emprego do dióxido de carbono supercrítico possibilita o emprego de técnicas que requerem pouco ou nenhum solvente orgânico (AGUIAR, 2017).

2.4.1.1 CO₂ supercrítico como solvente

O método de cocristalização que utiliza o dióxido de carbono supercrítico como solvente é a Cocristalização com Solvente Supercrítico (CSS). Um diagrama esquemático da técnica CSS é apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Diagrama esquemático simplificado da técnica CSS.



Fonte: Adaptado de Aguiar (2017).

Para a técnica CSS o ingrediente ativo e o coformador devem apresentar solubilidade suficiente no CO₂sc para que a cocristalização ocorra, além disso a câmara de cocristalização deve ser pequena (PADRELA *et al.*, 2009). No método CSS, o fluido age como solvente facilitando as interações moleculares e, assim, a nucleação e o crescimento dos cocristais, apesar da baixa solubilidade de alguns compostos em CO₂sc. Uma solução para essa baixa solubilidade em dióxido de carbono supercrítico é a utilização de pequenas quantidades de cossolvente durante o processamento. A cocristalização com CO₂ supercrítico é facilitada quando a densidade do dióxido de carbono aumenta. Outro aspecto determinante para que ocorra cocristalização é manter o sistema sob agitação magnética, o que permite a homogeneização do meio de cocristalização e consequentemente o aumento de interações moleculares entre o ingrediente ativo e o coformador (PANDO; CABANAS; CUADRA, 2016).

2.4.1.2 CO₂ supercrítico como antissolvente

Diversas são as técnicas que utilizam o CO₂sc como antissolvente, as principais são: SAS, SEDS e GAS. O princípio de todas essas técnicas é que o soluto seja completamente miscível no solvente orgânico utilizado e pouco ou completamente insolúvel no dióxido de carbono supercrítico. Além disso, é necessário que o solvente possua maior afinidade pelo antissolvente do que pelo soluto. Dessa forma, quando a solução (soluto e solvente) entra em contato com o antissolvente (fluido supercrítico) ocorre um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico levando à precipitação do soluto em forma de cocristais (FRANCESCHI, 2009).

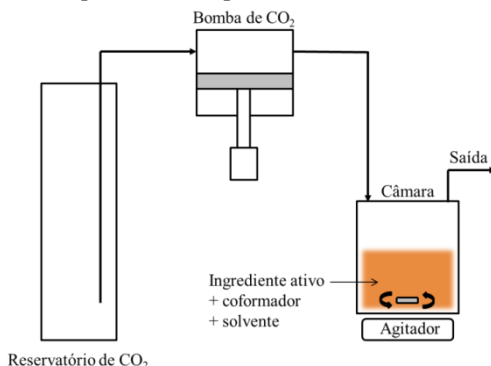
A técnica de antissolvente supercrítico (SAS) é caracterizada pela pulverização da solução líquida (solvente, ingrediente ativo e coformador) para a câmara onde o fluido supercrítico já está presente, levando à precipitação do composto (YEO; KIRAN, 2005).

A técnica de dispersão em solução melhorada por fluidos supercríticos (SEDS) é caracterizada pela pulverização simultânea da solução líquida (solvente, ingrediente ativo e coformador) e do fluido supercrítico. Neste caso o CO₂sc é utilizado tanto quanto meio de dispersão, quanto antissolvente, acarretando a precipitação imediata das partículas (YEO; KIRAN, 2005).

O método de cocristalização com Gás Antissolvente (GAS) foi desenvolvido com o objetivo de recrystalizar compostos sólidos que são

insolúveis em fluidos supercríticos (GALLAGHER *et al.*, 1989). Nessa técnica o ingrediente ativo e o coformador são solubilizados previamente em um solvente orgânico e em seguida são inseridos na câmara de precipitação. O gás comprimido é dissolvido no solvente, fazendo com que este expanda, levando à uma supersaturação da mistura e conseqüentemente precipitação do soluto em micropartículas (JUNG; PERRUT, 2001). Um diagrama esquemático da técnica GAS é apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Diagrama esquemático simplificado da técnica GAS.



Fonte: Adaptado de Aguiar (2017).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS COCRISTAIS

2.5.1 Análise térmica

A técnica mais informativa para verificar a formação de um cocrystal é a calorimetria diferencial de varredura (DSC) que registra o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura. A partir da análise de DSC se pode observar que o ponto de fusão do cocrystal é diferente dos compostos iniciais (GOUD *et al.*, 2012). Eventos endotérmicos correspondem à fusão, dessorção ou redução enquanto eventos exotérmicos correspondem à cristalização, polimerização, oxidação e adsorção. Para se obter a energia necessária para essa transição de fase, a área do pico obtida deve ser integrada (CHIU; PRENNER, 2011).

2.5.2 Difração de raio-X de pó

Outra técnica muito utilizada para a determinação da formação de um cocrystal é a difração de raio-X de pó (DRXP) por ser uma técnica não destrutiva da amostra, revelando informações detalhadas sobre a estrutura cristalográfica dos materiais analisados. O DRXP é baseado na propriedade única de cada composto de desviar, em um ângulo específico, na direção dos raios-X, provocando um padrão de difração único (TREMAYNE, 2004). Os compostos analisados são identificados a partir da comparação de seu padrão de difração com os difratogramas dos compostos puros (SHAH; KAKUMANU; BANSAL, 2006).

2.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) também é frequentemente utilizada na caracterização de cocrystal. Esta técnica é baseada na medida da absorção de radiação de diferentes frequências das ligações químicas e grupos funcionais da molécula. Esta análise é realizada a partir da colocação da amostra no caminho de um feixe de radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético. O FTIR tem como principal objetivo identificar os diferentes grupos funcionais de cada amostra (BARBOSA, 2007). Desvios de bandas associadas às vibrações dos grupos doador e receptor de ligações de hidrogênio, localizados na região entre 4000-1000 cm^{-1} , indicam a formação de um cocrystal (TREMAYNE, 2004).

2.5.4 Microscopia eletrônica de varredura

Na microscopia eletrônica de varredura a superfície da amostra é varrida por um feixe de elétrons energéticos, que geram elétrons secundários espalhados como sinal. Esses sinais são então captados por um software específico e convertido em imagens em tons de cinza (SKOOG. HOLLER; NIEMAN, 2002).

O MEV é utilizado para estudar a morfologia dos cocrystal, bem como obter micrografias para medição do tamanho de partícula. A morfologia e o tamanho de partícula são propriedades que influenciam diretamente na taxa de dissolução, compressibilidade e fluxo dos pós (STEELE, 2009).

2.6 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COCRISTAIS

As propriedades físico-químicas dos cocristais geralmente são uma combinação das propriedades dos compostos iniciais puros. Dessa forma é de grande importância analisar e comparar essas propriedades com a dos compostos puros. As principais propriedades analisadas na formação de um cocrystal são: ponto de fusão, dissolução e biodisponibilidade.

2.6.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão é uma propriedade física fundamental na caracterização de cocristais, sendo determinada pela temperatura na qual a fase sólida está em equilíbrio com a fase líquida. O ponto de fusão é um processo termodinâmico no qual a energia livre de transição é zero, portanto esse valor é determinado pela relação entre mudança na entalpia de fusão e a mudança na entropia de fusão (JAIN; YANG; YALKOWSKY, 2004). Schultheiss e Newman (2009) relataram que 51% dos cocristais apresentam ponto de fusão entre o dos compostos puros, 39% abaixo do ponto de fusão dos compostos puros, 6% acima e 4% apresentaram o mesmo ponto de fusão que o ingrediente ativo ou coformador.

2.6.2 Solubilidade

Uma das principais razões para se produzir cocristais é o aumento da solubilidade de compostos pouco solúveis em água. A utilização de coformadores altamente solúveis permite atingir o objetivo, uma vez que a propriedade do cocrystal é a junção das propriedades dos compostos puros (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009). A solubilidade de uma molécula depende da sua energia de rede cristalina e capacidade de solvatação, sendo que a formação de cocristais influencia ambas as características (SERAJUDDIN, 2007).

Várias considerações devem ser feitas a partir do estudo da solubilidade. A consideração mais importante a ser feita é a medida do equilíbrio *versus* solubilidade aparente. A solubilidade aparente é obtida através de valores aproximados de uma medida obtida em um tempo determinado. O equilíbrio da solubilidade é alcançado a partir da obtenção de vários valores ao longo do tempo até que este valor não varie mais, atingindo um platô. O tempo requerido para atingir o equilíbrio pode ser um fator para o desenvolvimento de um cocrystal

baseado no tempo de permanência no estômago e intestino, sendo desejável que o produto se dissolva enquanto passa pelo sistema gastrointestinal. A taxa de dissolução de pó pode ser relacionada ao tamanho de partícula (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009).

A solubilidade de cocristais tem sido estudadas em diversos meios de dissolução, como água, tampão fosfato 0,1 M HCl, fluido gástrico simulado (SGF) e fluido intestinal simulado (SIF). A maioria dos estudos reporta dados de dissolução de pó em diversos tempos de análise. Em alguns trabalhos, o tamanho de partícula é controlado a partir do peneiramento da amostra, em outros não há esse controle (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009).

Em um estudo, a solubilidade em meio aquoso de um cocrystal de norfloxacin com isonicotinamida foi medida após 72 h e a solução foi analisada por espectrofotômetro UV-vis. Nesse estudo o cocrystal apresentou o triplo da solubilidade do ingrediente ativo (BASSAVOJ. BOSTROM; VELAGA, 2006).

2.6.3 Biodisponibilidade

Os fatores chave da biodisponibilidade são a solubilidade do composto nos fluidos gástricos e intestinais e a sua permeabilidade nas membranas celulares. O sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) estabelece classes para os compostos, baseadas em sua solubilidade e permeabilidade (Quadro 2). A curcumina pertence à classe II, tendo baixa solubilidade e alta permeabilidade. Esta é a classe ideal para um composto ativo o qual se deseja realizar a cocrystalização visando aumentar a solubilidade (AMIDON *et al.*, 1995).

Quadro 2 - Classificação da biodisponibilidade de acordo com a BCS.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Descrição
I	Alta	Alta	Alta absorção
II	Baixa	Alta	Dissolução e absorção limitadas
III	Alta	Baixa	Permeabilidade e absorção limitadas
IV	Baixa	Baixa	Pouca ou nenhuma absorção

Fonte: Adaptado de Custodio; Wu; Benet (2008).

CAPÍTULO 3

3 MATERIAIS E MÉTODOS

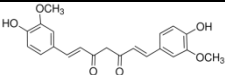
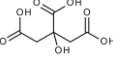

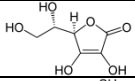
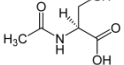

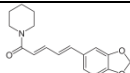
Nesta seção serão apresentados os materiais e os métodos utilizados na escolha de coformadores, produção de cocristais por tecnologia supercrítica, caracterizações e teste *in vivo*.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Princípio ativo e coformadores

Curcumina com pureza de 80,0%, ácido cítrico (99,5%), ácido salicílico (99,0%), ácido ascórbico (99,0%), N-acetilcisteína (99,0%), nicotinamida (99,0%) e piperina (98,0%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O Quadro 3 apresenta algumas propriedades desses compostos.

Quadro 3 - Propriedades da curcumina e coformadores.

Substância	Fórmula molecular	M ^a (g/mol)	S ^b (mg/L)	T.F. ^c (°C)
Curcumina		368,38	3,12	179-182°C
Ácido cítrico		192,12	5920000	153
Ácido salicílico		138,12	2240	159
Ácido ascórbico		176.12	400000	191
N-acetilcisteína		163.19	200000	109
Nicotinamida		122.12	500000	130
Piperina		285.34	40	129

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

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

3.1.2 Solventes

Acetato de etila, acetona, etanol e diclorometano com pureza de 99,5% foram adquiridos da Neon comercial LTDA/SP. Dióxido de carbono (99% em fase líquida) foi adquirido da White Martins S.A. A tabela 2 apresenta algumas propriedades dos solventes utilizados para a cocristalização. Para o teste *in vivo*, o formaldeído foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Tabela 2 - Propriedades dos solventes orgânicos utilizados.

<i>Sovente</i>	π^a	$\Sigma\alpha^b$	$\Sigma\beta^c$	μ^d	ε^e	τ^f	<i>Classe ICH</i> ^g
Acetato de etila	0,55	0,00	0,45	1,78	5,99	0,42	3
Acetona	0,71	0,04	0,49	2,88	20,49	0,31	3
Etanol	0,54	0,37	0,48	1,69	24,85	1,07	3
Diclorometano	0,82	0,10	0,05	1,60	8,93	0,41	2

Legenda: (a) polaridade/dipolaridade; (b) propensão como doador de ligação de hidrogênio; (c) propensão como acceptor de ligação de hidrogênio; (d) momento dipolar; (e) constante dielétrica em Debye; (f) viscosidade em mPa.s (25°C); (g) classificação ICH na qual 1 corresponde a “solventes a serem evitados”, 2 “solventes de uso limitado” e 3 “solventes de baixo potencial tóxico”.

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

3.1.3 Animais

Camundongos *Swiss* machos (21-27 g) criados internamente na Universidade Regional de Chapecó (UNOCHAPECO) foram usados em todos os experimentos comportamentais. Os animais foram mantidos em ambiente controlado com temperatura de 22 ± 2 ° C e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 da manhã até às 18:00). Os camundongos foram 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, aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Comunitária Regional de Chapecó (número de aprovação 007-17), de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2016, 2008) e a Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias de 24 de Novembro de 1986 (86/609 / CEE). Todas as experiências foram realizadas entre às 9:00 e às 17:00 da tarde. Experimentadores não foram informados das condições do tratamento.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Produção de cocristais a pressão ambiente

Nesta seção serão apresentadas as metodologias utilizadas para a produção dos cocristais para posterior caracterização e escolha dos coformadores. O Quadro 4 apresenta todas as características das amostras produzidas por metodologias a pressão ambiente durante a fase de escolha dos coformadores.

Quadro 4 - Características das amostras produzidas a pressão ambiente

Amostra	Método	Coformador	Fração molar (curcumina: coformador)	Solvente orgânico
1	EL	N-acetilcisteína	1:1	Acetona ^a
2	EL	N-acetilcisteína	1:1	Etanol ^b
3	EL	N-acetilcisteína	1:1	Acetato de etila ^a
4	EL	N-acetilcisteína	1:1	Diclorometano ^b
5	EL	N-acetilcisteína	2:1	Acetona ^a
6	EL	N-acetilcisteína	2:1	Etanol ^b
7	EL	N-acetilcisteína	2:1	Acetato de etila ^a
8	EL	N-acetilcisteína	2:1	Diclorometano ^b
9	EL	Ácido cítrico	1:1	Acetona ^a
10	EL	Ácido cítrico	1:1	Etanol ^b
11	EL	Ácido cítrico	1:1	Acetato de etila ^a
12	EL	Ácido cítrico	1:1	Diclorometano ^b
13	EL	Ácido ascórbico	1:1	Acetona ^a
14	EL	Ácido ascórbico	1:1	Etanol ^b
15	EL	Ácido ascórbico	1:1	Acetato de etila ^a
16	EL	Ácido ascórbico	1:1	Diclorometano ^b
17	EL	Ácido salicílico	1:1	Acetona ^a
18	EL	Ácido salicílico	1:1	Etanol ^b
19	EL	Ácido salicílico	1:1	Acetato de etila ^a
20	EL	Ácido salicílico	1:1	Diclorometano ^b
21	EL	Nicotinamida	1:1	Acetato de etila ^a
22	EL	Nicotinamida	1:2	Acetona ^a
23	EL	Nicotinamida	1:2	Acetato de etila ^a
24	EL	Nicotinamida	1:3	Acetona ^a
25	EL	Nicotinamida	1:3	Etanol ^b
26	EL	Nicotinamida	1:3	Acetato de etila ^a
27	EL	Nicotinamida	1:3	Diclorometano ^b
28	EL	Piperina	1:1	Acetona ^a

29	EL	Piperina	1:1	Etanol ^b
30	EL	Piperina	1:1	Acetato de etila ^a
31	EL	Piperina	1:1	Diclorometano ^b
32	LAG	Nicotinamida	1:1	Acetona ^c
33	LAG	Nicotinamida	1:1	Acetato de etila ^a
34	LAG	Nicotinamida	1:3	Acetato de etila ^a
35	LAG	N-acetilcisteína	1:1	Acetato de etila ^c
36	LAS	Nicotinamida	1:3	Acetona ^a
37	LAS	Nicotinamida	1:3	Acetato de etila ^a
38	LAS	N-acetilcisteína	1:1	Acetona ^a
39	LAS	N-acetilcisteína	1:1	Acetato de etila ^a

Legenda: (a) 20 mL; (b) 30 mL; (c) 500µL

3.2.1.1 Evaporação lenta de solvente (EL)

A metodologia de evaporação lenta de solvente foi utilizada conforme descrito por Wichianphog e Charoenchaitrakool (2018). Curcumina e coformadores em concentrações e frações molares pré-determinadas foram adicionados a um frasco âmbar contendo 20 ou 30 mL de solvente orgânico. Em seguida as soluções foram homogeneizadas por ultrassom durante 10 minutos. 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 para posterior caracterização.

3.2.1.2 Moagem assistida por líquido (LAG)

A metodologia utilizada foi adaptada do trabalho de Zhou *et al.* (2016). Curcumina e coformadores em concentrações e frações molares pré-determinadas foram colocados em um gral. Em seguida foram adicionados ou não 500 µL de solvente orgânico e moídos durante 60 min com a ajuda de um pistilo. Ao final da moagem, as amostras foram coletadas e armazenadas em um frasco âmbar para posterior caracterização.

3.2.1.3 Líquido antissolvente (LAS)

A metodologia utilizada foi adaptada do trabalho de Ober e Gupta (2012). Curcumina e coformadores em concentrações e frações molares pré-determinadas foram pesados em um erlenmeyer, dissolvidos em 20 mL de solvente orgânico e homogeneizados com ajuda de um

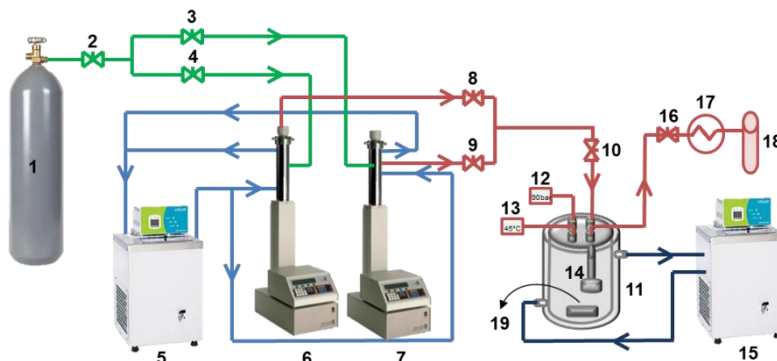
agitador magnético. A solução foi filtrada com filtro VertiClean™ PTFE de 0,45 μm . Em seguida foi adicionado N-hexano gota a gota como antissolvente. Após precipitação o sobrenadante foi retirado, o precipitado foi centrifugado, o restante do sobrenadante foi retirado e a amostra foi seca em estufa à vácuo (Quimis Q319V) a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas. Ao final da secagem a amostra foi coletada e estocada em frascos âmbar para posterior caracterização.

3.2.2 Produção de cocristais com fluido supercrítico

3.2.2.1 Unidade experimental

A Figura 7 apresenta a unidade experimental utilizada na formação dos coprecipitados com uso de dióxido de carbono supercrítico (CO_2sc) pelas técnicas de cocristalização com solvente supercrítico (CSS) e gás antissolvente (GAS).

Figura 7 - Aparato experimental para utilização de dióxido de carbono supercrítico.



Fonte: desenvolvido pelo autor

Conforme a Figura 7, a unidade experimental é composta de:

- (1) Reservatório de dióxido de carbono (CO_2);
- (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 antissolvente 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 $170 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Para CSS é utilizada uma bomba e para GAS duas bombas visando manter o fluxo de CO_2 constante. Por meio das bombas ainda é realizada a pressurização do CO_2 e controle da vazão para dentro da câmara de precipitação;
- (8) e (9) Válvulas de esfera que permitem o fluxo de CO_2 pressurizado das bombas para a câmara de precipitação (Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (10) Válvula métrica tipo agulha utilizada no controle do fluxo e vazão de CO_2 das bombas de alta pressão para a câmara de precipitação (HIP, modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);
- (11) Câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316, encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm). Ela é constituída de cinco entradas na tampa: uma central e quatro periféricas, sendo que uma é mantida fechada;
- (12) Entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão utilizado para monitorar a pressão dentro da câmara de precipitação (Transdutor absoluto – 0 a 250 bar, SMAR, modelo LD301). Ele está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação.
- (13) Entrada periférica onde fica um sensor de temperatura (termopar) ligado à um indicador de temperatura (Universal, NOVUS, modelo N1500);
- (14) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno, disposto na parte interna da câmara de precipitação e ligado à conexão de liberação do CO_2 . Utilizada para a retenção das partículas precipitadas no interior da câmara, permitindo apenas o fluxo do CO_2 e do solvente orgânico. Um dos filtros apresenta porosidade de $1 \mu\text{m}$, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm servindo de base para o segundo filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de porosidade, 8 mm de

diâmetro e 150 μm de espessura. A Figura 8 mostra a parte interna da tampa da câmara de precipitação com o suporte de filtros.

- (15) Banho ultratermostático de recirculação (Nova ética, modelo 512/2D). Utilizado para controlar a temperatura da câmara de precipitação por meio da sua ligação com a camisa da câmara;
- (16) Válvula métrica tipo agulha (HOKE, modelo 1315G2Y) posicionada na saída da câmara de precipitação. Por meio dessa válvula é possível controlar o fluxo de liberação do CO_2 ;
- (17) Fita de aquecimento (FISATON, modelo 5, 200 W de potência). Utilizada devido ao efeito Joule-Tomphson ser pronunciado pela expansão do CO_2 durante a despressurização congelando a linha de liberação. A temperatura utilizada na fita é de 200 $^\circ\text{C}$;
- (18) Filtro de segurança recheado com algodão, sendo possível observar o arraste dos princípios ativos se ocorrer;
- (19) Agitador magnético.

Figura 8 - Parte interna da câmara de precipitação com suporte de filtros.



Fonte: Desenvolvido pelo autor

3.2.2.2 Cocristalização com solvente supercrítico (CSS)

Curcumina e coformadores são pesados visando obter a razão molar desejada e em seguida inseridos na câmara de precipitação com adição ou não de 500 μL de cossolvente. O Quadro 5 apresenta as frações molares das amostras produzidas, bem como os solventes utilizados.

Quadro 5 - Características das amostras produzidas por CSS.

Amostra	Método	Coformador	Fração molar (curcumina: coformador)	Solvente orgânico (cossolvente)
40	CSS	Nicotinamida	1:3	Sem solvente
41	CSS	Nicotinamida	1:3	Acetona ^c
42	CSS	Nicotinamida	1:3	Acetato de etila ^c
43	CSS	N-acetilcisteína	1:1	Sem solvente
44	CSS	N-acetilcisteína	1:1	Acetona ^c
45	CSS	N-acetilcisteína	1:1	Acetato de etila ^c
46	CSS	N-acetilcisteína	2:1	Sem solvente
47	CSS	N-acetilcisteína	2:1	Acetato de etila ^c
48	CSS	N-acetilcisteína	1:2	Sem solvente
49	CSS	Piperina	1:1	Sem solvente

Legenda: (c) 500 µL.

Para iniciar o procedimento de utilização do equipamento o banho ultratermostático (5) é acionado a 5° C visando resfriar as bombas de alta pressão. Em seguida as válvulas 2 e 4 são abertas permitindo encher a bomba 6 de CO₂. Ao final do preenchimento da bomba, esta costuma apresentar um volume de 500 mL de CO₂ e 58 bar. A bomba é então pressurizada a 200 bar. Após montagem da câmara de precipitação e sua conexão com os demais equipamentos, o banho ultratermostático (15) é ligado a 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 utilizada durante o experimento (90 bar). Após atingir a pressão desejada dentro da câmara, as válvulas 8 e 10 são fechadas mantendo o sistema sem vazão de CO₂ durante 60 minutos. 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 ambiente.

Terminada a despressurização, a câmara é aberta e a amostra coletada e armazenada em frasco âmbar para posterior caracterização.

3.2.2.3 Gás antissolvente (GAS)

Curcumina e coformadores foram pesados visando obter a razão molar desejada e em seguida foram dissolvidos em 15 mL de solvente e adicionados na câmara de precipitação. O quadro 6 apresenta as frações molares das amostras produzidas, bem como os solventes orgânicos utilizados.

Quadro 6 - Características das amostras produzidas por GAS.

Amostra	Método	Coformador	Fração molar (curcumina: coformador)	Solvente orgânico
50	GAS	Nicotinamida	1:3	Acetona ^d
51	GAS	Nicotinamida	1:3	Acetato de etila ^d
52	GAS	N-acetilcisteína	1:1	Acetona ^d
53	GAS	N-acetilcisteína	1:1	Acetato de etila ^d
54	GAS	Piperina	1:1	Acetona ^d

Legenda: (d) 15 mL.

O procedimento inicia-se de forma similar ao CSS com o acionamento do banho ultratermostático (5) a 5 °C visando resfriar as bombas de alta pressão. Em seguida as válvulas 2, 3 e 4 são abertas permitindo encher as bombas 6 e 7 de CO₂, que são então pressurizadas a 200 bar. Após montagem da câmara de precipitação e sua conexão com os demais equipamentos, o banho ultratermostático (15) é ligado a 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 utilizada durante o experimento (90 bar). Após atingir a pressão desejada dentro da câmara, a válvula 8 é fechada mantendo o sistema sem vazão de CO₂ durante 10 minutos. Após este período as válvulas 9 e 16 são abertas permitindo um fluxo contínuo de CO₂ através da câmara. Durante este fluxo contínuo, a pressão é mantida a 90 bar dentro da câmara. Este processo é realizado durante 50 minutos e tem por objetivo a ação antissolvente do CO₂ bem como a secagem do solvente orgânico. Em seguida 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 ambiente.

Terminada a despressurização, a câmara é aberta e a amostra coletada e armazenada em frasco âmbar para posterior caracterização.

3.2.3 Metodologias de caracterização dos cocristais

Nesta seção serão apresentadas as metodologias utilizadas na caracterização das amostras produzidas.

3.2.3.1 Análise térmica

Todas as amostras obtidas foram analisadas por DSC. Os termogramas dos ingredientes puros e dos cocristais foram obtidos em equipamento da Perkin Elmer (Jade-DSC) utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. Ciclos únicos de aquecimento foram realizados na faixa de 40 a 200 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹..

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

3.2.3.2 Difração de raio-X de pó

Apenas as amostras que apresentaram um único evento endotérmico, na análise de DSC, foram analisadas por DRXP.

A análise de DRXP foi realizada utilizando um equipamento θ - θ D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre K α ($\lambda=1,5418$ Å), 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.

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

3.2.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As amostras obtidas por GAS e CSS que apresentaram um único evento endotérmico na análise de DSC e padrão de DRXP conclusiva para cocristal, foram analisadas por FTIR.

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 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 de Alimentos da UFSC.

3.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras obtidas por GAS e CSS que apresentaram um único evento endotérmico na análise de DSC e padrão de DRXP conclusiva para cocristal, foram analisadas por MEV.

A morfologia e o tamanho das partículas foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a partir do equipamento JEOL JSM-6390LV. A distribuição de tamanho das partículas foi determinada a partir da análise das imagens com ajuda do software SizeMeter (versão 1.1). Para cada amostra o comprimento médio da linha diagonal de 200 partículas foram medidas.

As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

3.2.3.5 Perfil e eficiência de dissolução

O perfil de dissolução foi realizado de acordo com trabalhos de Dal Magro *et al.* (2017) e Aguiar *et al.* (2018). A curva padrão da curcumina foi produzida por diluições seriadas (Apêndice A Figura 1) e as leituras de absorbância foram realizadas a 435 nm. Os espectros de UV para N-acetilcisteína e nicotinamida não sobrepõem a 435 nm (Apêndice A Figura 2).

Para a análise de dissolução, um excesso de amostra (cocristais e curcumina pura) foi suspensa em água destilada. As análises foram realizadas em shaker orbital (Marconi, modelo MA410 CFT) a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com rotação de 100 rpm no Laboratório Multi Propósito (MULTIALI, UFSC). Após 0, 10, 20, 30, 50, 80, 120 e 180 minutos alíquotas de 1 mL foram coletadas para estabelecer o perfil de dissolução. A cada alíquota retirada, a mesma quantia do meio de dissolução utilizado foi reposta visando manter o volume original. A amostra coletada foi lida em espectrofotômetro UV-Vis (Femto, modelo 800 XI) a 435 nm e as concentrações foram calculadas de acordo com a equação da reta obtida na curva padrão da curcumina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A eficiência de dissolução (ED) foi calculada para cada amostra a partir de curvas médias de porcentagem cumulativa do composto dissolvido versus o tempo de dissolução. Esse parâmetro é obtido por meio da razão entre a área sob a curva de dissolução entre os tempos de 0 a 180 min e a área total do retângulo definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (180 min), de acordo com a equação 1.

$$ED (\%) = \frac{\int_0^t y dt}{y_{100} \cdot t} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde y é a dissolução cumulativa.

3.2.4 Teste de nociceção induzida por formalina (*in vivo*)

Este teste foi realizado em parceria com a Dra. Liz Girardi Müller e o Dr. Gean Pablo Silva Aguiar da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Para este teste foi escolhido o cocristal de curcumina e nicotinamida produzido por CSS sem cossolvente. A atividade anti-inflamatória do cocristal foi investigada utilizando o teste da formalina, que foi realizado de acordo com o método previamente descrito por Santos *et al.* (1999) com pequenas modificações.

Neste teste, os animais (n=6-7/grupo) foram tratados oralmente com veículo (NaCl a 0,9%, 10 mL/kg, grupo de controle), curcumina (50 mg/kg ou 0,5 mg/kg), nicotinamida (0,5 mg/kg) ou o cocristal de curcumina-nicotinamida (0,5 mg/kg), 1 h antes da injeção de formalina a 2% (20 µL/pata) na pata traseira direita. O diclofenaco foi utilizado como controle positivo (50 mg/kg). Todos os fármacos foram dissolvidos em solução salina normal e a curcumina foi suspensa em solução salina com 1% de polissorbato 80 antes da utilização. A dose de curcumina foi escolhida com base em estudo anterior (SRIMAL; DHARWAN, 1973).

Imediatamente após a injeção de formalina, o animal foi observado em comportamento relacionado à dor. O tempo (s) passado lambendo, mordendo ou levantando a pata na qual a formalina foi injetada foi considerado como comportamento nociceptivo e registrado durante a primeira fase (0-5 min, fase neurogênica) e a segunda fase (15-30 min, fase inflamatória) do teste.

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESCOLHA DOS COFORMADORES

Nesta seção serão apresentados os principais resultados obtidos a partir das caracterizações de amostras produzidas por moagem assistida por líquido (LAG) e líquido antissolvente (LAS) visando obter identificar a formação ou não de novas fases cristalinas de sistemas multicomponentes de curcumina e alguns coformadores.

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi utilizada na triagem dos coformadores. Os coformadores que apresentaram um só evento endotérmico diferente daquele dos compostos puros foram selecionados por indicarem a possível formação de uma nova fase cristalina (VASISHT *et al.*, 2016). Em seguida, foi realizada a análise de difração de raio-X de pó (DRXP) para comprovar a formação de uma nova fase cristalina a partir do deslocamento ou mudança nos padrões de difração das amostras (TRASK; JONES, 2005).

A cocristalização visa a modificação de propriedades físico-química de sólidos, sendo capaz de melhorar o poder de dissolução de compostos pouco solúveis. Deste modo, os coformadores testados foram previamente escolhidos a partir de dados da literatura bem como devido à sua alta solubilidade em água.

4.1.1 EVAPORAÇÃO LENTA (EL)

Nenhuma das amostras produzidas por evaporação lenta foi levada em consideração na escolha dos coformadores, pois em alguns casos a amostra aderiu ao frasco, não permitindo sua coleta e em outros as amostras apresentaram termogramas com a aparição de diversos eventos endotérmicos, podendo ser devido à formação mais de um tipo de coprecipitados com diferentes fases cristalinas. Todas as amostras produzidas e as conclusões obtidas são apresentadas no Quadro 7.

Quadro 7 - Conclusões obtidas após análise dos resultados das amostras produzidas por evaporação lenta (EL).

Amostra	Solvente orgânico	Coformador	Fração molar (curcumina: coformador)	Resultado
1	Acetona	NAC	1:1	DSC inconclusivo
2	Etanol	NAC	1:1	Não foi possível coletar
3	Acetato de etila	NAC	1:1	DSC inconclusivo
4	Diclorometano	NAC	1:1	Não foi possível coletar
5	Acetona	NAC	2:1	Não foi possível coletar
6	Etanol	NAC	2:1	Não foi possível coletar
7	Acetato de etila	NAC	2:1	Não foi possível coletar
8	Diclorometano	NAC	2:1	Não foi possível coletar
9	Acetona	AC	1:1	DSC inconclusivo
10	Etanol	AC	1:1	Não foi possível coletar
11	Acetato de etila	AC	1:1	DSC inconclusivo
12	Diclorometano	AC	1:1	Não foi possível coletar
13	Acetona	AA	1:1	DSC inconclusivo
14	Etanol	AA	1:1	Não foi possível coletar
15	Acetato de etila	AA	1:1	DSC inconclusivo
16	Diclorometano	AA	1:1	Não foi possível coletar
17	Acetona	AS	1:1	DSC inconclusivo
18	Etanol	AS	1:1	Não foi possível coletar
19	Acetato de etila	AS	1:1	DSC inconclusivo

20	Diclorometano	AS	1:1	Não foi possível coletar
21	Acetato de etila	NIC	1:1	Não foi possível coletar
22	Acetona	NIC	1:2	Não foi possível coletar
23	Acetato de etila	NIC	1:2	DSC inconclusivo
24	Acetona	NIC	1:3	DSC inconclusivo
25	Etanol	NIC	1:3	DSC inconclusivo
26	Acetato de etila	NIC	1:3	Não foi possível coletar
27	Diclorometano	NIC	1:3	Não foi possível coletar
28	Acetona	PIP	1:1	Não foi possível coletar
29	Etanol	PIP	1:1	Não foi possível coletar
30	Acetato de etila	PIP	1:1	Não foi possível coletar
31	Diclorometano	PIP	1:1	Não foi possível coletar

Legenda: NAC: N-acetilcisteína, AC: ácido cítrico, AA: ácido ascórbico, AS: ácido salicílico, NIC: nicotinamida, PIP: piperina.

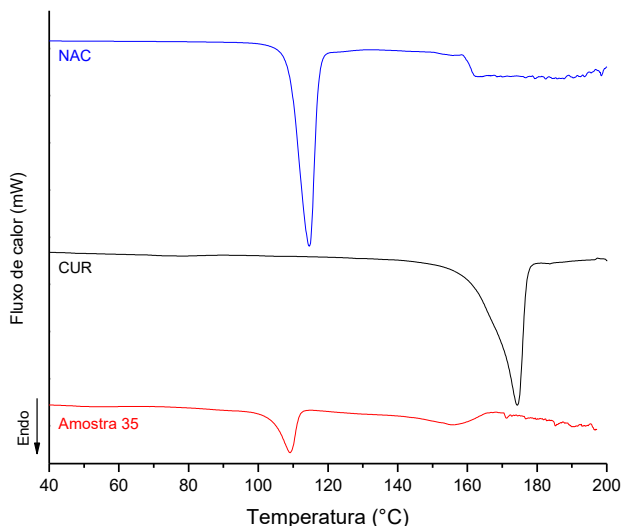
4.1.2 MOAGEM ASSISTIDA POR LÍQUIDO (LAG)

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados referentes às amostras que apresentaram termogramas com um evento endotérmico referente ao ponto de fusão diferente dos pontos de fusão dos compostos puros. Para estas amostras também foi realizada a difração de raio-X de pó (DRXP) visando comprovar a formação de uma nova fase cristalina.

4.1.2.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC)

O comportamento térmico dos compostos puros e da amostra produzida por LAG com acetato de etila e fração molar de 1:1 (amostra 35) foram obtidos por DSC. Os termogramas são apresentados na Figura 9.

Figura 9 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAG com acetato de etila.



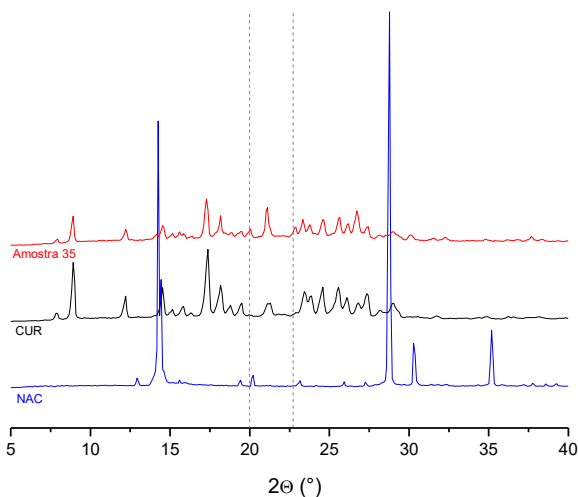
A *N*-acetilcisteína apresenta um único evento endotérmico à 114,3 °C ($\Delta H = 224,3 \text{ J.g}^{-1}$) referente ao seu ponto de fusão, estando de acordo com a literatura (AGUIAR *et al.*, 2017). O termograma da NAC apresenta picos indistintos acima de 160 °C, o que sugere a degradação térmica deste composto. A curcumina apresenta um ponto de fusão de 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J.g}^{-1}$), estando igualmente de acordo com a literatura (KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018; SANPHUI *et al.*, 2011).

A amostra de CUR-NAC obtida por LAG apresenta um ponto de fusão a 108,8 °C ($\Delta H = 174,1 \text{ J.g}^{-1}$) indicando que se trata de uma fase sólida homogênea. Sendo o ponto de fusão da amostra 35 diferente dos pontos de fusão dos compostos puros, temos a indicação de uma interação entre os compostos tendendo à formação de uma nova estrutura cristalina, podendo ser um cocrystal. Como não há nenhum evento aparente registrado antes da fusão, pode-se concluir que o cocrystal já está formado no início da análise térmica (PESSOA, 2018). Este pico endotérmico com valor abaixo dos compostos puros é similar ao reportado para cocrystalis de curcumina-dextrose e curcumina-

floroglucinol respectivamente (KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018; CHOW *et al.*, 2014).

Resultados semelhantes de DSC também foram relatados para compostos eutéticos de curcumina com nicotinamida, ácido felúrico, hidroxiquinona, ácido *p*-hidroxibenzoico e ácido *L*-tartárico, no entanto os padrões obtidos por DRXP eram a soma dos difratogramas dos compostos puros (GOUD *et al.*, 2012). Desta forma, difratogramas de raio-X de pó foram obtidos para os compostos puros e para a amostra produzida por LAG visando confirmar a formação de uma nova fase cristalina, e portanto, um cocristal. Os padrões de DRXP são apresentados na figura 10.

Figura 10 - Difratogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAG com acetato de etila.



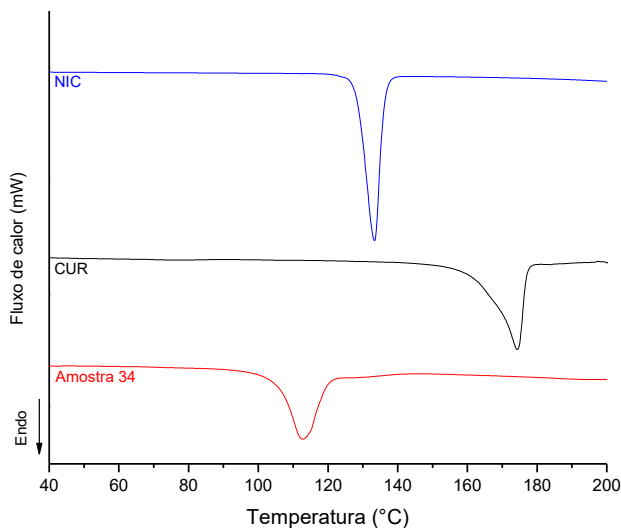
Pode-se observar que o padrão do DRXP da amostra produzida por LAG apresenta as principais reflexões da curcumina. Por outro lado, os picos característicos da NAC não aparecem no difratogramas da amostra CUR-NAC. Além das principais reflexões da curcumina, a amostra CUR-NAC produzida por LAG apresenta duas novas reflexões em valores 2θ de 19,9 e 22,7, indicando a possível formação de uma

nova estrutura cristalina. O aparecimento de reflexões similares foi reportado na literatura para cocristais de curcumina-resorcinol e curcumina-pirogalol (SANPHUI *et al.*, 2011). Podemos observar ainda que o padrão de difração da amostra produzida por LAG possui picos menos acentuados do que os compostos puros, isso se deve a uma diminuição do tamanho de partícula bem como o fato de o cocristal em questão apresentar uma rede cristalina mais fraca do que os compostos iniciais (PESSOA, 2018).

4.1.2.2 Curcumina e nicotinamida (CUR-NIC)

Os termogramas obtidos por DSC de curcumina e nicotinamida pura, bem como da amostra de CUR-NIC produzida por LAG com acetato de etila e fração molar de 1:3 (amostra 34) foram analisados (Figura 11).

Figura 11 - DSC da nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por LAG com acetato de etila.



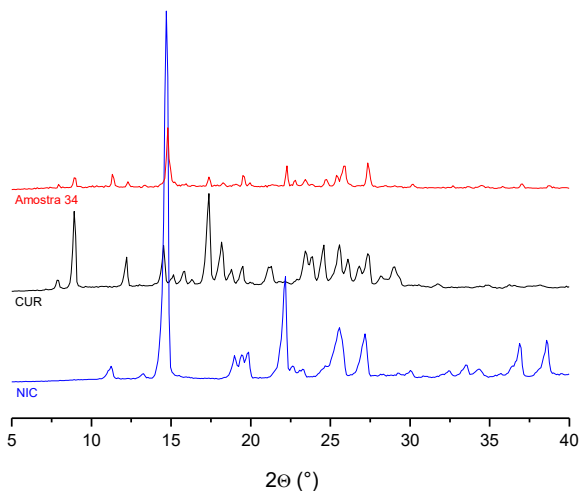
Como já mencionado anteriormente, a curcumina apresenta um ponto de fusão de 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J.g}^{-1}$). A Nicotinamida também

apresenta um só evento endotérmico a 131,9 °C ($\Delta H = 197,7 \text{ J.g}^{-1}$) referente ao seu ponto de fusão, que está de acordo com a literatura (PESSOA, 2018; HINO; FORD; POWELL, 2001).

A amostra de CUR-NIC obtida por LAG apresenta um ponto de fusão a 112,7 °C ($\Delta H = 46,4 \text{ J.g}^{-1}$). O aparecimento de um pico menos pronunciado e mais largo é relacionado ao fato de se tratar de uma estrutura cristalina mais frágil do que os compostos puros (KOTBANTAO; CHAROENCHAITRAKOOL, 2017; PANZADE *et al.*, 2017; EL-GIZAWY *et al.*, 2015). A presença de um só evento endotérmico pode indicar que a amostra é um cocrystal.

Os padrões DRXP das amostras foram analisados visando observar a formação ou não de uma nova fase cristalina (Figura 12).

Figura 12 - Difratomogramas da nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por LAG com acetato de etila.



Podemos observar que os picos característicos do coformador não são evidentes no padrão de DRXP da amostra produzida por LAG. No entanto, a maior parte dos picos característicos da curcumina aparecem no difratograma da amostra, estando ausentes apenas as reflexões $26,0^\circ$ e $26,8^\circ$ 2θ . O difratograma da amostra CUR-NIC

produzida por LAG apresenta picos menos pronunciados do que os compostos puros, isso mais uma vez se deve ao fato de se tratar de uma estrutura cristalina mais frágil do que os compostos puros (KOTBANTAO; CHAROENCHAITRAKOOL, 2017; PANZADE *et al.*, 2017; EL-GIZAWY *et al.*, 2015). Como houve o desaparecimento de dois picos, podemos afirmar que houve certa mudança na rede cristalina, porém não pode se concluir que se trata de um cocrystal.

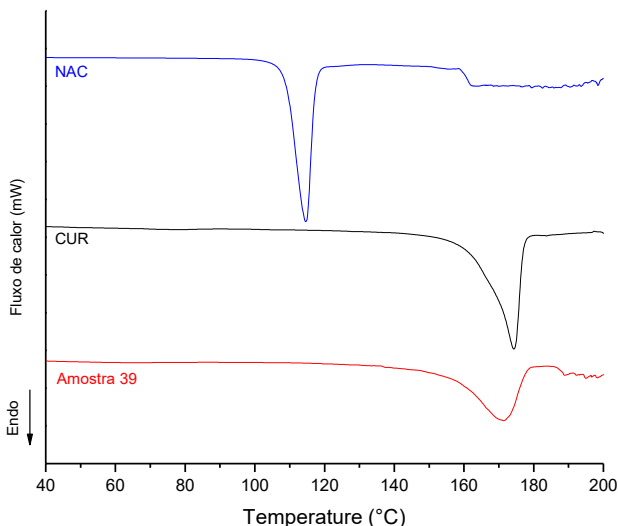
4.1.3 LÍQUIDO ANTISSOLVENTE (LAS)

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados referentes às amostras produzidas por LAS que apresentaram termogramas com um evento endotérmico referente ao ponto de fusão diferente dos pontos de fusão dos compostos puros. Para estas amostras também foi realizada a difração de raio-X de pó (DRXP) visando comprovar a formação de uma nova fase cristalina.

4.1.3.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC)

Os termogramas das amostras de curcumina e *N*-acetilcisteína puras e da amostra CUR-NAC produzida por LAS com acetato de etila e fração molar de 1:1 (amostra 39) são apresentados na Figura 13.

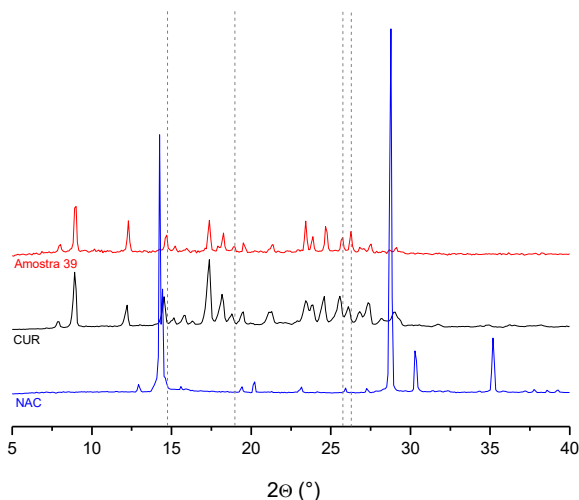
Figura 13 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAS com acetato de etila.



Os pontos de fusão da *N*-acetilcisteína e curcumina são 114,3 °C ($\Delta H = 224,3 \text{ J.g}^{-1}$) e 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J.g}^{-1}$), respectivamente. Estes valores estão de acordo com a literatura (AGUIAR *et al.*, 2017; KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018; SANPHUI *et al.*, 2011).

A amostra CUR-NAC obtida por LAS (amostra 39) apresenta um único evento endotérmico a 171,3 °C ($\Delta H = 532,2 \text{ J.g}^{-1}$) referente ao ponto de fusão da amostra. Por se tratar de um evento endotérmico mais largo e que engloba valor de ponto de fusão da curcumina, não podemos concluir que se trata de uma amostra pura. Desta forma, mais uma vez os difratogramas de raio-X de pó foram obtidos visando confirmar a formação de uma nova fase cristalina. Os padrões de DRXP são apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Difratomogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por LAS com acetato de etila.



A curcumina apresenta reflexões características em $7,8^\circ$, $8,9^\circ$, $12,2^\circ$, $14,4^\circ$, $15,8^\circ$, $17,4^\circ$, $18,2^\circ$, $21,2^\circ$, $23,4^\circ$, $23,9^\circ$, $24,6^\circ$, $25,5^\circ$, $26,0^\circ$, $26,8^\circ$, $27,3^\circ$ e $29,0^\circ$ 2θ . A *N*-acetilcisteína apresenta reflexões em $14,3^\circ$, $28,8^\circ$, $30,3^\circ$ e $35,2^\circ$ 2θ . Podemos observar sutis deslocamentos no padrão de difração da amostra CUR-NAC em relação ao difratogramas da curcumina, enquanto as principais reflexões da NAC estão ausentes. As reflexões foram deslocadas de $14,5^\circ$ para $14,7^\circ$, de $18,2^\circ$ para $18,9^\circ$, de $25,5^\circ$ para $25,7^\circ$ e de $26,0^\circ$ para $26,2^\circ$. Resultados similares com pequenos deslocamentos, aparecimento e desaparecimento de algumas reflexões foram apresentados por Pessoa (2018) e Zhou *et al.* (2016) para cocristais de resveratrol e nicotinamida. Devido ao desaparecimento das principais reflexões da NAC e aos pequenos deslocamentos de algumas reflexões presentes no difratogramas da curcumina, podemos concluir que houve uma pequena mudança na estrutura cristalina, porém não se pode afirmar que se trata de um cocrystal puro.

4.1.4 CONCLUSÃO

O Quadro 8 apresenta as amostras produzidas por LAS e LAG e os resultados obtidos para cada amostra.

Quadro 8 - Conclusões obtidas após análise dos resultados das amostras produzidas por LAS e LAG.

Amostra	Método/ Solvente	Coformador	Fração molar (curcumina: coformador)	Solvente utilizado
32	LAG / Acetona	NIC	1:1	Mistura física
33	LAG / Acetato de etila	NIC	1:1	Mistura física
34	LAG / Acetato de etila	NIC	1:3	Possível cocrystal
35	LAG / Acetato de etila	NAC	1:1	Possível cocrystal
36	LAS / Acetona	NIC	1:3	Não precipitou
37	LAS / Acetato de etila	NIC	1:3	Não precipitou
38	LAS / Acetona	NAC	1:1	Não precipitou
39	LAS / Acetato de etila	NAC	1:1	Possível cocrystal

Legenda: NAC: N-acetilcisteína, NIC: nicotinamida.

Para ambas as técnicas utilizadas para escolha dos cocrystalis a pressão ambiente (LAG e LAS) foram obtidos termogramas com um único evento endotérmico para as amostras produzidas com curcumina e *N*-acetilcisteína na proporção molar de 1:1 (amostras 35 e 39). No caso das amostras de curcumina e nicotinamida na proporção molar de 1:3 não foi possível realizar a técnica LAS, pois não houve precipitação (amostras 36 e 37). Conclusões preliminares a partir das análises de DSC e DRXP sugerem que os compostos formados com *N*-acetilcisteína apresentam uma nova rede cristalina diferente dos compostos iniciais, podendo se tratar então de cocrystalis (amostras 35 e 39). Portanto, a partir deste estudo, foram selecionados como coformadores a *N*-acetilcisteína e nicotinamida para a produção de cocrystalis em meio supercrítico. Ambos os coformadores selecionados apresentam grupo

funcional amino o que facilita a formação do cocrystal devido à formação de pontes de hidrogênio intermolecular (WICHIANPHONG; CHAROENCHAITRAKOOL, 2018).

4.2 OBTENÇÃO DE COCRISTAIS DE CURCUMINA EM MEIO SUPERCRÍTICO

O dióxido de carbono supercrítico (CO_{2sc}) foi utilizado como meio para realização de reações de cocrystalização devido a vantagem de ser uma tecnologia verde, uma técnica rápida quando comparada aos métodos a pressão ambiente, ter um elevado rendimento e propiciar a formação de cocrystal puros. O CO_{2sc} foi utilizado como solvente na técnica de cocrystalização com solvente supercrítico (CSS) e como antissolvente na técnica de gás antissolvente (GAS).

A partir dos resultados analisados na seção anterior, foram selecionados como coformadores a *N*-acetilcisteína e a nicotinamida para cocrystalização em meio supercrítico.

Para as amostras produzidas com NAC foram realizados experimentos na proporção molar de 1:1, já para as amostras produzidas com a NIC a proporção molar utilizada foi de 1:3. Os cocrystal produzidos em cada um dos métodos (CSS e GAS) foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raio-X de pó (DRXP), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfil de dissolução.

4.2.1 COCRISTALIZAÇÃO COM SOLVENTE SUPERCRÍTICO

A cocrystalização com solvente supercrítico tem como maior vantagem o uso reduzido ou não uso de solvente orgânico, chegando a um máximo de 500 µL. Além disso, essa é uma técnica rápida, pois não necessita de etapa de secagem de solvente. O alto rendimento de produção é outro aspecto importante no CSS, pois toda amostra inserida na célula de cocrystalização é coletada ao final do experimento.

Os resultados obtidos da caracterização das amostras serão apresentados e discutidos nas seções a seguir.

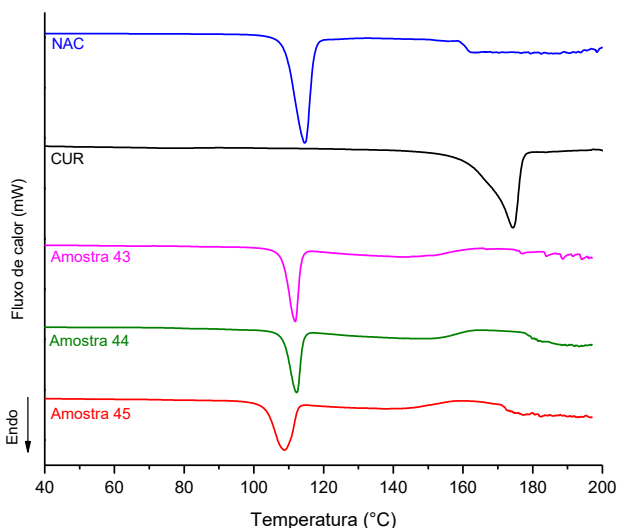
4.2.1.1 Curcumina e *N*-acetilcisteína (CUR-NAC)

A cocrystalização da curcumina e *N*-acetilcisteína com CO_{2sc} como solvente foi realizada sem a adição de cossolvente (amostra 43),

com a adição de 500 μ L de acetona (amostra 44) e com a adição de 500 μ L de acetato de etila (amostra 45). O objetivo principal da adição ou não de cossolventes foi observar o efeito destes na cocristalização por CSS.

As curvas de DSC das amostras produzidas por CSS bem como dos compostos puros são apresentados na Figura 15.

Figura 15 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.



A curcumina pura apresenta um evento endotérmico a 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) e a *N*-acetilcisteína a 114,3 °C ($\Delta H = 224,3 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) referente aos pontos de fusão. O termograma da NAC apresenta picos indistintos acima de 160 °C, o que sugere a degradação térmica deste composto (PESSOA, 2018). Os pontos de fusão dos dois compostos puros estão de acordo com a literatura (AGUIAR *et al.*, 2017; KHO; NUGROHO; SUGIH, 2018; SANPHUI *et al.*, 2011).

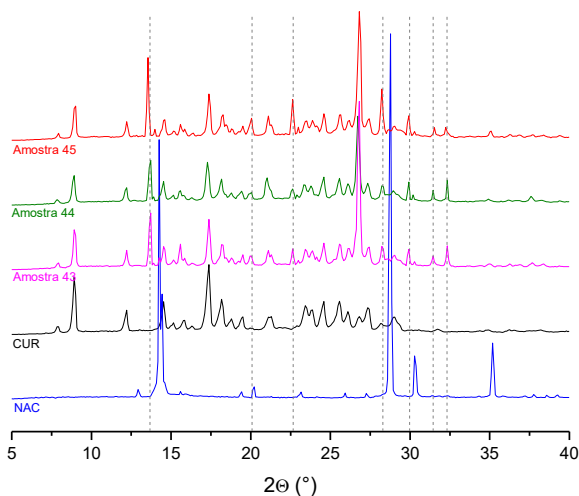
A amostra CUR-NAC produzida sem adição de cossolvente (amostra 43) apresenta um ponto de fusão de 111,8 °C ($\Delta H = 41,88 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$). Semelhante à anterior, a amostra CUR-NAC produzida com a adição de 500 μ L de acetona (amostra 44) exibe apenas um evento endotérmico

a 112,2 °C ($\Delta H = 26,16 \text{ J.g}^{-1}$). Já a amostra produzida com acetato de etila (amostra 45) tem o menor ponto de fusão, sendo este de 108,7°C ($\Delta H = 52,91 \text{ J.g}^{-1}$).

As três amostras produzidas por CSS, tendo sido utilizado ou não cossolventes, apresentaram um só evento endotérmico, sendo estes semelhantes entre si no que diz respeito a estarem abaixo do ponto de fusão do ingrediente ativo e do coformador. Resultado também observado por Schultheiss e Newmann (2009) para cerca de 40% dos cocristais estudados. Outra semelhança a ser notada é o fato de as três amostras apresentarem entalpias menores do que àquelas dos compostos puros, indicando uma estrutura cristalina mais frágil (KOTBANTAO; CHAROENCHAITRAKOOL, 2017; PANZADE *et al.*, 2017; EL-GIZAWY *et al.*, 2015). Mudanças no ponto de fusão das amostras em relação aos compostos puros indicam a formação de uma nova estrutura cristalina e, portanto, a possibilidade de se tratar de cocristais (PESSOA, 2018).

Com o objetivo de confirmar a formação de cocristais, os difratogramas de raio-X das amostras produzidas foram comparados aos difratogramas dos compostos puros. Os padrões de DRXP são apresentados na Figura 16 e os resultados são discutidos abaixo.

Figura 16 - Difratogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.



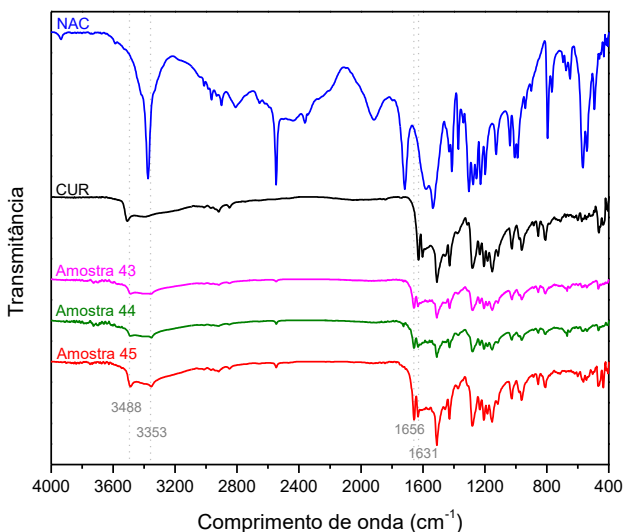
A curcumina apresentou reflexões características em $7,8^\circ$, $8,9^\circ$, $12,2^\circ$, $14,4^\circ$, $15,8^\circ$, $17,4^\circ$, $18,2^\circ$, $21,2^\circ$, $23,4^\circ$, $23,9^\circ$, $24,6^\circ$, $25,5^\circ$, $26,0^\circ$, $26,8^\circ$, $27,3^\circ$ e $29,0^\circ$ 2θ . A *N*-acetilcisteína apresentou reflexões em $14,3^\circ$, $28,8^\circ$, $30,3^\circ$ e $35,2^\circ$ 2θ .

Diferente dos compostos puros, as amostras produzidas por CSS apresentam reflexões características em $13,7^\circ$, $20,1^\circ$, $22,6^\circ$, $28,3^\circ$, $30,0^\circ$, $31,5^\circ$ e $32,2^\circ$ 2θ . As três amostras apresentaram difratogramas muito semelhantes, variando somente a intensidade dos picos. A amostra produzida com acetona (amostra 44) apresenta um difratogramas com reflexões mais brandas o que se deve a uma cadeia cristalina mais fraca. Esses resultados corroboram com os resultados do DSC, no qual a amostra produzida com acetona apresentou a menor entalpia ($\Delta H = 26,16$ J/g) e, portanto a rede cristalina mais frágil entre os três cocristais.

Esses resultados também fortalecem os resultados obtidos no DSC quanto à semelhança das três amostras e ao fato de se tratar de novas redes cristalinas, indicando que as amostras são de fato cocristais.

Visando observar possíveis interações químicas entre os compostos na formação dos cocristais, foram realizadas análises de FTIR e os espectros foram comparados aos dos compostos puros (Figura 17).

Figura 17 - Espectros FTIR da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.



O espectro da curcumina apresentou sinais característicos a 3509 cm^{-1} referente à frequência de estiramento do O-H fenólico, 1627 cm^{-1} atribuído ao estiramento do C=O e 1602 cm^{-1} referente ao C=C do grupo aromático. Estes resultados estão de acordo com a literatura (KURNIAWANSYAH *et al.*, 2015; KHO; NUGROHO; SUGIH; 2018; CHOW *et al.*, 2014; SATHISARAN; DALVI, 2017).

E *N*-acetilcisteína por sua vez apresentou sinais característicos a 3374 cm^{-1} referente ao estiramento O-H do grupo carboxílico, 2547 cm^{-1} referente ao estiramento S-H, 1716 cm^{-1} atribuído ao estiramento C=O. Sinais característicos entre 2800 e 3000 cm^{-1} , entre 1500 e 1600 cm^{-1} e entre 1200 e 1300 cm^{-1} referem-se à frequência de estiramento N-H, de torção N-H e de estiramento C-O, respectivamente (ITUEN; AKARANTA; UMOREN, 2017).

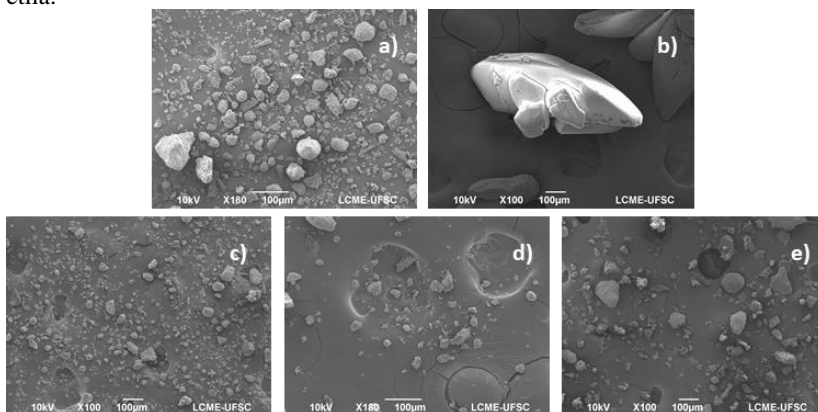
O processamento de curcumina com *N*-acetilcisteína por CSS com ou sem cossolventes acarreta em diferenças nos espectros de FTIR em comparação aos compostos puros. Uma mudança no ambiente químico de grupos fenólicos O-H pode ser observada no espectro dos cocristais pelo deslocamento dos picos característicos da CUR e da NAC de 3509 e 3374 cm^{-1} para 3488 e 3353 cm^{-1} . Também houve mudanças na frequência de estiramento do C=O e do grupo aromático C=C de 1627 e 1602 cm^{-1} para 1656 e 1631 cm^{-1} , respectivamente. Os sinais característicos de absorção e as diferenças entre as frequências dos componentes puros e dos cocristais são apresentadas na Tabela 3. Estes resultados são consistentes com os evidenciados pelas análises de PRXD e DSC confirmando a interação entre CUR e NAC a partir da cocrystalização com solvente supercrítico, resultando na formação de cocristais.

Tabela 3 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, *N*-acetilcisteína e dos cocristais formados por CSS.

Vibração	Comprimento de onda (cm^{-1})			
	CUR	NAC	Amostras 43 e 44	Amostra 45
Estiramento O-H	3509	3374	3488 - 3353	3488 - 3353
Estiramento C=O	1627	1716	1656	1656
Estiramento C-O	1612	1200 - 1300		
Estiramento C=C	1602	-	1631	1631
Estiramento N-H	-	2800 - 3000	-	2800 - 3000
Estiramento S-H	-	2547	2547	2547
Torção N-H	-	1500 - 1600	-	-

Na figura 18 são apresentadas as micrografias da curcumina, da *N*-acetilcisteína e dos cocristais produzidos por CSS.

Figura 18 - Imagens do MEV da curcumina, N-acetilcisteína e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.



Legenda: (a) curcumina, (b) *N*-acetilcisteína, (c) CUR-NAC CSS sem cossolvente (amostra 43), (d) CUR-NAC CSS com acetona (amostra 44), (e) CUR-NAC CSS com acetato de etila (amostra 45).

A partir da Figura 18 pode-se observar que tanto a curcumina quanto os cocristsais possuem morfologia arredondada e distribuição de tamanho heterogêneo. A *N*-acetilcisteína apresenta partículas grandes e de formato irregular. A Tabela 4 apresenta os dados obtidos da média da linha diagonal em μm de cada amostra.

Tabela 4 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, *N*-acetilcisteína e dos cocristsais formados por CSS.

Amostra	Tamanho da partícula (média da linha diagonal em μm)
CUR	$27,9 \pm 13,2$
NAC	$715,3 \pm 83,4$
43 - CUR-NAC CSS	$31,6 \pm 17,1$
44 - CUR-NAC CSS A	$25,9 \pm 15,2$
45 - CUR-NAC CSS AE	$58,8 \pm 17,2$

Tamanho determinado a partir de imagens obtidas por MEV usando o software SizeMeter (versão 1.1). A variação indica desvio padrão ($n = 200$ partículas).

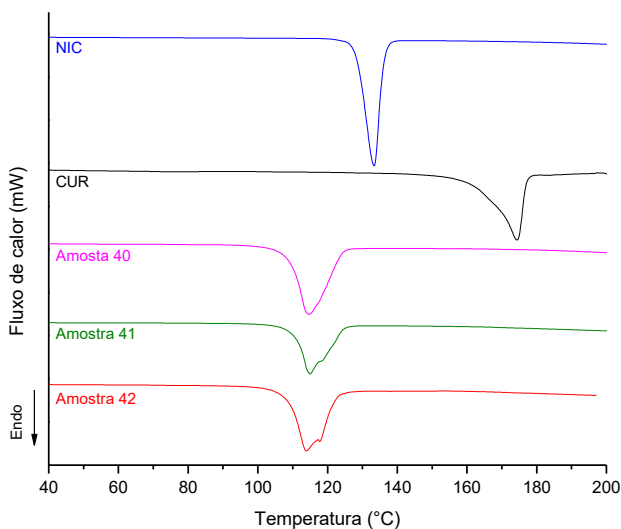
A partir dos dados obtidos para o tamanho das partículas, observa-se uma grande diferença em relação ao tamanho dos cocristsais comparados entre si. Analisando esses resultados em conjunto aos

padrões de DRX e às entalpias obtidas através das curvas de DSC é possível concluir que os cocristsais que apresentam uma rede cristalina mais forte também apresentam tamanhos médios de partícula maiores, por outro lado se a rede cristalina é mais fraca, a partícula apresenta um tamanho reduzido. Corroborando com os resultados apresentados anteriormente, o cocrystal que apresenta uma rede cristalina mais frágil foi o produzido com adição de acetona. Resultados similares foram relatados por Kho, Nugroho e Sughi (2018).

4.2.1.2 Curcumina e nicotinamida (CUR-NIC)

Assim como para a *N*-acetilcisteína, as amostras de curcumina e nicotinamida foram produzidas por CSS sem adição de cossolvente (amostra 40), com adição de acetona (amostra 41) e acetato de etila (amostra 42). As curvas de DSC obtidas para estas amostras são apresentadas na Figura 19.

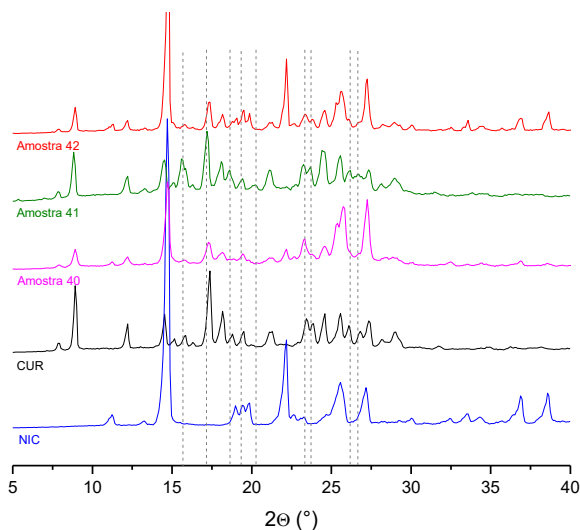
Figura 19 - DSC da Nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.



Como já dito anteriormente, a curcumina apresenta seu ponto de fusão a 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J.g}^{-1}$). A nicotinamida tem ponto de fusão de 133,3 °C ($\Delta H = 197,7 \text{ J.g}^{-1}$). As curvas obtidas para as amostras de curcumina e nicotinamida produzidas por CSS apresentam eventos endotérmicos únicos abaixo da temperatura de fusão dos compostos puros. Para a amostra produzida sem co-solvente o ponto de fusão é de 114,6 °C ($\Delta H = 75,8 \text{ J.g}^{-1}$). Já as amostras produzidas com acetona e acetato de etila apresentam eventos endotérmicos a 115,0 °C ($\Delta H = 47,97 \text{ J.g}^{-1}$) e 113,4 °C ($\Delta H = 79,8 \text{ J.g}^{-1}$) respectivamente. A amostra produzida com acetato de etila apresentou um evento endotérmico com a presença de um segundo pico, isso pode ocorrer devido à uma cocristalização parcial durante a análise de DSC ocasionada pela fusão dos compostos.

Assim como para os cocristais de CUR-NAC, uma menor entalpia de fusão pode indicar uma estrutura cristalina mais fraca, o que ocorre mais acentuadamente para as amostras produzidas com acetona (KOTBANTAO; CHAROENCHAITRAKOOL, 2017; PANZADE *et al.*, 2017; EL-GIZAWY *et al.*, 2015). Este evento pode ser devido a uma maior solubilidade do ingrediente ativo e do coformador em acetona do que em acetato de etila. Mais uma vez mudanças no ponto de fusão das amostras em relação aos compostos puros podem indicar a formação de uma nova estrutura cristalina e, portanto, a possibilidade de se tratar de cocristais (PESSOA, 2018). Dessa forma, os padrões de DRXP foram analisados visando obter melhores conclusões (Figura 20).

Figura 20 - Difratogramas da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente, com acetona e com acetato de etila.



A curcumina apresentou reflexões características em $7,8^\circ$, $8,9^\circ$, $12,2^\circ$, $14,4^\circ$, $15,8^\circ$, $17,4^\circ$, $18,2^\circ$, $21,2^\circ$, $23,4^\circ$, $23,9^\circ$, $24,6^\circ$, $25,5^\circ$, $26,0^\circ$, $26,8^\circ$, $27,3^\circ$ e $29,0^\circ$ 2θ . A nicotinamida apresentou reflexões em $11,2^\circ$, $14,6^\circ$, $19,0^\circ$, $19,4^\circ$, $19,7^\circ$, $22,1^\circ$, $25,6^\circ$, $27,2^\circ$, $36,9^\circ$ e $38,5^\circ$ 2θ .

A amostra produzida por CSS com adição de acetato de etila (amostra 42) apresentou todas as reflexões características da nicotinamida e da curcumina. A amostra produzida sem cossolvente (amostra 40) apresentou um padrão de difração muito semelhante àquela com acetato de etila como cossolvente, porém algumas reflexões estão ausentes, sendo estas: $19,0^\circ$, $19,7^\circ$, $26,9^\circ$ e $28,5^\circ$ 2θ . As reflexões características da curcumina e nicotinamida que se repetem no difratograma desta amostra são: $7,8^\circ$, $8,9^\circ$, $11,2^\circ$, $12,2^\circ$, $18,2^\circ$, $19,4^\circ$, $23,3^\circ$, $24,6^\circ$ e $27,3^\circ$ 2θ . Temos ainda para esta amostra, o deslocamento de reflexões características dos compostos iniciais, sendo estas reflexões presentes no difratograma da amostra em $15,7^\circ$, $17,3^\circ$, $21,1^\circ$, $22,2^\circ$, $23,3^\circ$ e $25,7^\circ$ 2θ . Além destes deslocamentos, temos o aparecimento de um novo pico em $25,4^\circ$ 2θ .

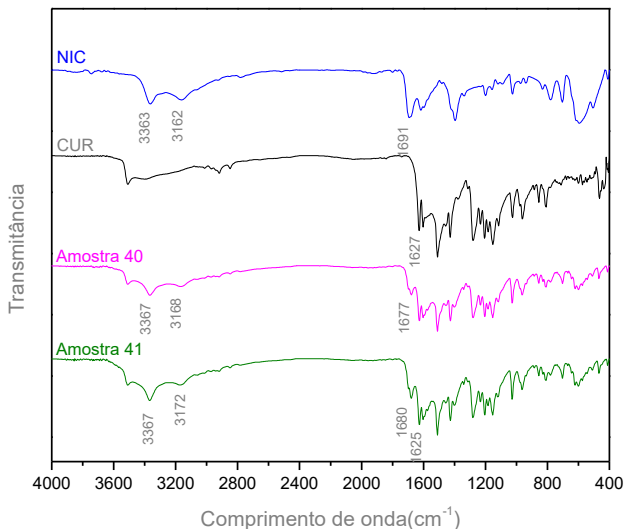
A amostra produzida com adição de acetona (amostra 41) apresentou deslocamentos de diversas reflexões características da curcumina e nicotinamida. As reflexões referentes aos deslocamentos aparecem em: 15,7°, 17,1°, 18,6°, 19,3°, 23,3°, 23,7°, 26,2° e 26,6° 2 θ . Além dos deslocamentos temos o aparecimento de um novo pico em 20,3° 2 θ .

A partir da análise dos padrões de DRXP, pode-se concluir que a amostra produzida com acetato de etila é apenas uma mistura física entre os dois compostos iniciais, resultado semelhante ao obtido pela técnica LAG. Esta amostra apresentou um evento endotérmico com a presença de um segundo pico, indicando que a cocristalização parcial desta amostra pode ter ocorrido durante a análise de DSC. Devido ao PDRX não ocasionar a degradação térmica da amostra, pode-se observar que de fato se trata de uma mistura física. Neste caso pode ter ocorrido uma falha do agitador magnético durante o processamento da amostra, ocasionando a não homogeneização do sistema, impedindo a ocorrência de cocristalização.

A amostra obtida sem cossolvente apresentou alguns deslocamentos e desaparecimento de picos, o que pode ser um indicativo de uma nova rede cristalina. Já a amostra obtida com acetona apresentou um padrão com mais deslocamentos, bem como o aparecimento de um novo pico, portanto pode-se afirmar que a amostra possui uma rede cristalina diferente dos compostos puros.

Visando observar possíveis interações químicas entre os compostos na formação dos cocristais, foram realizadas análises de FTIR das amostras produzidas sem cossolvente e com acetona e os espectros foram comparados aos dos compostos puros (Figura 21).

Figura 21 - Espectros FTIR da N-acetilcisteína, curcumina e das amostras CUR-NAC produzida por CSS sem cossolvente e com acetona.



Como apresentado anteriormente, o espectro da curcumina apresenta sinais característicos a 3509 cm^{-1} referente à frequência de estiramento do O-H, 1627 cm^{-1} atribuído ao estiramento do C=O e 1602 cm^{-1} referente ao C=C do grupo aromático. Esses resultados estão de acordo com a literatura (KURNIAWANSYAH *et al.*, 2015; KHO; NUGROHO; SUGIH; 2018; CHOW *et al.*, 2014; SATHISARAN; DALVI, 2017).

A nicotinamida, por sua vez, apresenta as principais absorções em 3363 e 3162 cm^{-1} correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo NH_2 , 1691 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação C=O e 703 cm^{-1} correspondente à deformação angular fora do plano da ligação C=O. Esses dados estão de acordo com a literatura (RAMALINGAM *et al.*, 2010; PATIL *et al.*, 2017).

Ambas as amostras produzidas apresentam deslocamentos em três das principais bandas da nicotinamida. A amostra produzida sem cossolvente apresentou deslocamentos das bandas referentes aos estiramentos NH_2 de 3363 e 3162 cm^{-1} para 3367 e 3168 cm^{-1} e da banda de estiramento da carbonila de 1691 para 1677 cm^{-1} . A amostra

produzida com acetona apresentou deslocamentos das bandas características da nicotinamida de 3363, 3162 e 1691 cm^{-1} para 3367, 3172 e 1679 cm^{-1} além do deslocamento da banda de estiramento da carbonila da curcumina de 1627 cm^{-1} para 1625 cm^{-1} . Não houve deslocamento do estiramento da hidroxila da curcumina em nenhuma das duas amostras. A Tabela 5 apresenta as principais absorções vibracionais dos compostos puros e os deslocamentos dos cocristais.

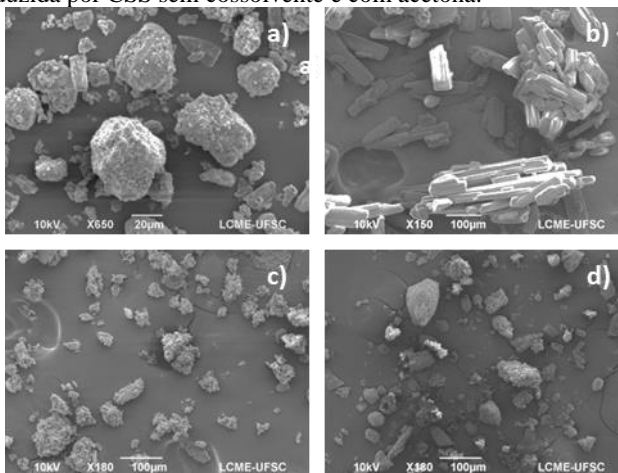
Tabela 5 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, nicotinamida dos cocristais formados por CSS.

Vibração	Comprimento de onda (cm^{-1})			
	CUR	NIC	Amostra 40	Amostra 41
Estiramento C=O	1627	1691	1627 e 1677	1625 e 1679
Estiramento simétrico e assimétrico do NH ₂	-	3363 e 3162	3367 e 3168	3367 e 3172
Estiramento do O-H	3509	-	3509	3509

Esses resultados são consistentes com os evidenciados pelas análises de PRXD e DSC confirmando a interação entre CUR e NIC a partir da cocrystalização com solvente supercrítico, resultando na formação cocristais.

Na Figura 22 são apresentadas as micrografias da curcumina, da nicotinamida e dos cocristais produzidos por CSS sem adição de cossolvente e com acetona.

Figura 22 - Imagens do MEV da curcumina, nicotinamida e das amostras CUR-NIC produzida por CSS sem cossolvente e com acetona.



Legenda: (a) curcumina, (b) nicotinamida, (c) CUR-NIC CSS com acetona (amostra 41), (d) CUR-NIC CSS (amostra 40).

A partir da Figura 22 pode-se observar que a nicotinamida apresenta morfologia tubular com tamanho heterogêneo. A curcumina e os cocristais possuem morfologia e distribuição de tamanho heterogêneo. A amostra produzida com acetona apresentou partículas em formato de agulhas aglomeradas. Por outro lado, a amostra produzida sem cossolvente é arredondada e heterogênea. A Tabela 6 apresenta os dados obtidos da média da linha diagonal em μm de cada amostra.

Tabela 6 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, nicotinamida e dos cocristais formados por CSS.

Amostra	Tamanho da partícula (média da linha diagonal em μm)
CUR	$27,9 \pm 13,2$
NIC	$38,4 \pm 23,4$
40 - CUR-NIC CSS	$52,1 \pm 23,2$
41 - CUR-NIC CSS A	$32,6 \pm 13,1$

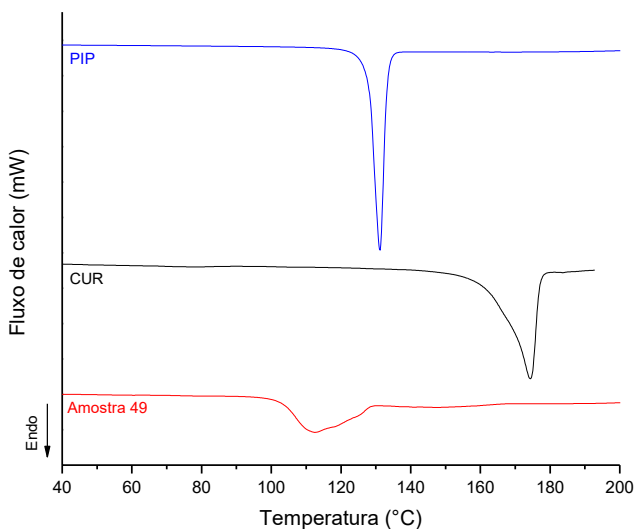
Tamanho determinado a partir de imagens obtidas por MEV usando o software SizeMeter (versão 1.1). A variação indica desvio padrão ($n = 200$ partículas).

A partir dos dados é possível observar que todas as amostras apresentaram tamanho médio similar. Comparando os dois cocristais, nota-se que a amostra produzida com acetona apresenta menor tamanho, podendo ser devido à alta solubilidade dos compostos neste solvente o que acarreta um cocristal menor. Resultados similares foram relatados por Kho, Nugroho e Sughi (2018).

4.2.1.3 Curcumina e piperina (CUR-PIP)

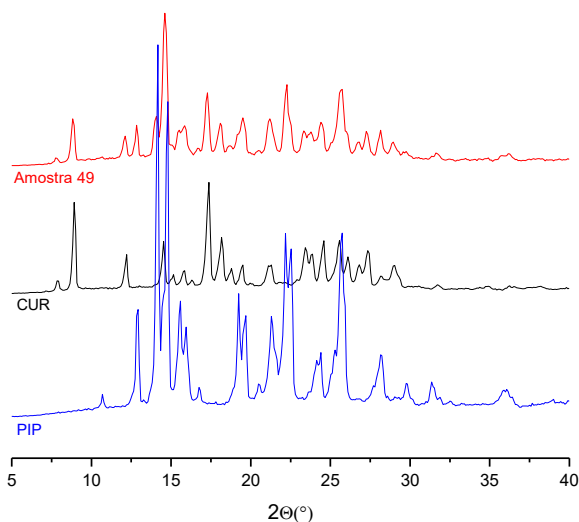
A piperina é uma amida terciária e o alcaloide responsável pela sensação de ardência ao se ingerir algumas variedades de pimenta. A estabilidade e biodisponibilidade da curcumina são aumentadas a partir da administração conjunta com a piperina (GOUD *et al.*, 2012). Dessa forma foi testada a formação de cocristal de curcumina com piperina por CSS (amostra 49). As curvas de DSC obtidas para estas amostras são apresentadas na Figura 23.

Figura 23 - DSC da piperina, curcumina e da amostra CUR-PIP produzida por CSS sem cossolvente.



A curcumina apresenta seu ponto de fusão a 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J.g}^{-1}$). A piperina tem ponto de fusão de 112,3 °C ($\Delta H = 49,4 \text{ J.g}^{-1}$). A curva obtida para a amostra de curcumina e nicotinamida produzida por CSS apresentou um eventos endotérmico único abaixo da temperatura de fusão dos compostos puros, porém o pico é brando e largo, podendo se tratar de uma amostra não pura, ou seja, uma mistura de cocristais ou mistura física. Assim como para os cocristais de CUR-NAC, uma menor entalpia de fusão pode indicar uma estrutura cristalina mais fraca (KOTBANTAO; CHAROENCHAITRAKOOL, 2017; PANZADE *et al.*, 2017; EL-GIZAWY *et al.*, 2015). Os padrões de DRXP para a amostra e para os compostos puros foram analisados visando obter melhores conclusões (Figura 24).

Figura 24 - Difratomogramas da piperina curcumina e da amostra CUR-PIP produzida por CSS sem cossolvente.



Pode-se observar a partir da comparação dos difratogramas que a amostra produzida por CSS sem cossolvente é a soma das reflexões características dos compostos iniciais. Dessa forma, conclui-se que a amostra é apenas uma mistura física e a obtenção de um evento endotérmico único na análise de DSC é possivelmente devido a uma

cocrystalização ocasionada pela fusão dos compostos puros. Portanto não foi possível obter um cocrystal de curcumina com piperina pela técnica CSS.

4.2.2 GÁS ANTISSOLVENTE

A cocrystalização por gás antissolvente tem como vantagem de ser mais rápida do que as técnicas a pressão ambiente, possibilita a produção de compostos amorfos e cocrystalis puros e evita o uso de solventes orgânicos como antissolvente (PADRELA *et al.*, 2018).

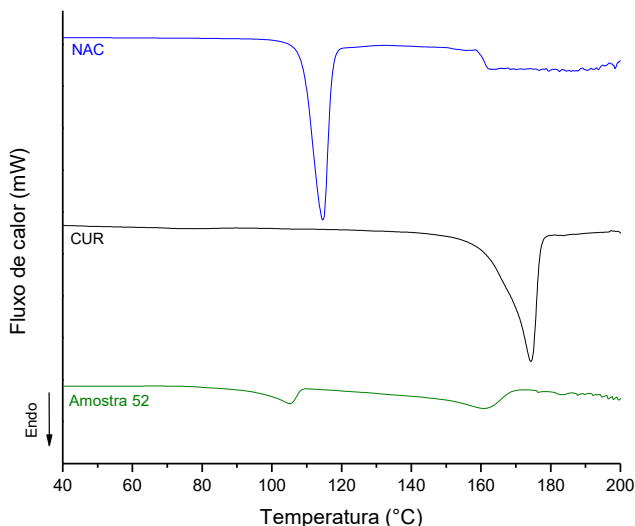
Com esta técnica foi possível produzir amostras com acetona, pois amostras produzidas com acetato de etila por vezes tinham aspecto heterogêneo, parte se assemelhando a um algodão e parte em forma de partículas, e por vezes a amostra ficou aderida à câmara de cocrystalização sendo impossível a coleta.

Os resultados obtidos da caracterização das amostras serão apresentados e discutidos nas seções a seguir.

4.2.2.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC)

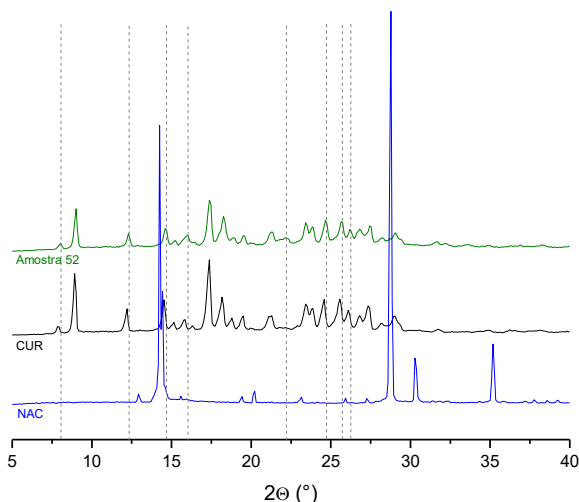
A Figura 25 apresenta as curvas de DSC dos compostos puros e da amostra produzida por GAS com acetona (amostra 52).

Figura 25 - DSC da N-acetilcisteína, curcumina e da amostra CUR-NAC produzida por GAS com acetona.



Como já dito anteriormente, a curcumina apresentou seu ponto de fusão a 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J.g}^{-1}$). A *N*-acetilcisteína tem ponto de fusão de 114,3 °C ($\Delta H = 224,3 \text{ J.g}^{-1}$). A amostra produzida por GAS apresenta dois eventos endotérmicos brandos, sendo uma a 105,5 °C ($\Delta H = 9,1 \text{ J.g}^{-1}$) e outro a 161,8 °C ($\Delta H = 21,4 \text{ J.g}^{-1}$). Estes pontos de fusão se assemelham com os encontrados para as amostras produzidas por LAG e LAS, o que sugere que podemos ter uma mistura de cocristais, cada um deles tendo características próprias de estrutura cristalina. A partir dos valores de entalpia de fusão pode-se observar também que a estrutura cristalina da amostra é mais frágil comparada aos compostos puros. Visando analisar se de fato houve cocristalização, o padrão de DRXP da amostra foi obtido e comparado aos compostos puros (Figura 26).

Figura 26 - Difrátogramas da *N*-acetilcisteína, curcumina e da amostra CUR-NAC produzida por GAS com acetona.

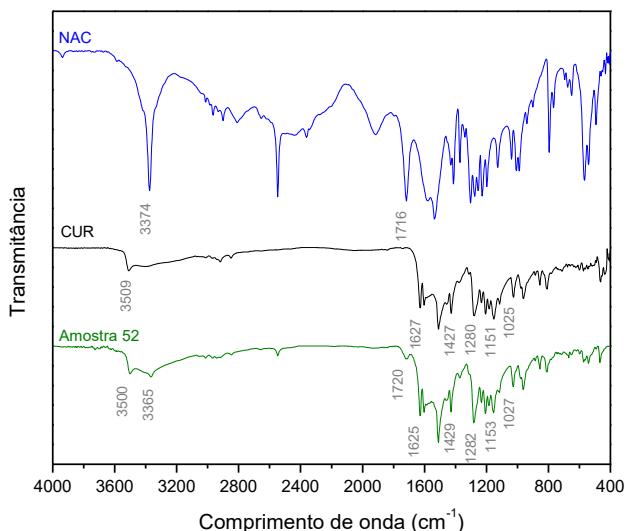


A curcumina apresentou reflexões características em $7,8^\circ$, $8,9^\circ$, $12,2^\circ$, $14,4^\circ$, $15,8^\circ$, $17,4^\circ$, $18,2^\circ$, $21,2^\circ$, $23,4^\circ$, $23,9^\circ$, $24,6^\circ$, $25,5^\circ$, $26,0^\circ$, $26,8^\circ$, $27,3^\circ$ e $29,0^\circ$ 2θ . A *N*-acetilcisteína apresentou reflexões em $14,3^\circ$, $28,8^\circ$, $30,3^\circ$ e $35,2^\circ$ 2θ .

A amostra CUR-NAC produzida por GAS com acetona apresenta deslocamentos de reflexões características da curcumina, sendo estes de $8,9^\circ$, $12,2^\circ$, $14,4^\circ$, $15,8^\circ$, $24,6^\circ$, $25,5^\circ$ e $26,0^\circ$ para $8,0^\circ$, $12,3^\circ$, $14,6^\circ$, $16,0^\circ$, $24,7^\circ$, $25,6^\circ$ e $26,2^\circ$ 2θ . Deslocamentos semelhantes das reflexões para $14,6^\circ$, $25,6^\circ$ e $26,2^\circ$ também aparecem nas amostras produzidas por LAS. A amostra apresentou ainda uma nova reflexão em $22,4^\circ$ 2θ , muito próxima às novas reflexões das amostras produzidas por LAG e CSS. Observando mais atentamente, as amostras produzidas por LAS também apresentam esta nova reflexão, porém não é perceptível sem uma aproximação do padrão de DRXP, pois seus picos são brandos. Podemos então concluir que o aparecimento de uma reflexão próxima a $22,4^\circ$ 2θ é característico dos cocristais de curcumina e *N*-acetilcisteína. Apesar de possivelmente se tratar de uma amostra não pura, pode-se concluir que é um cocrystal ou uma mistura de cocristais.

O espectro de FTIR foi analisado visando obter mais informações sobre o cocrystal produzido (Figura 27).

Figura 27 - Espectros FTIR da N-acetilcisteína, curcumina e da amostra CUR-NAC produzida por GAS com acetona.



O espectro da curcumina apresenta sinais característicos a 3509 cm^{-1} referente à frequência de estiramento do O-H fenólico, 1627 cm^{-1} atribuído ao estiramento do C=O e 1602 cm^{-1} referente ao C=C do grupo aromático. Esses resultados estão de acordo com a literatura (KURNIAWANSYAH *et al.*, 2015; KHO; NUGROHO; SUGIH; 2018; CHOW *et al.*, 2014; SATHISARAN; DALVI, 2017).

A N-acetilcisteína por sua vez apresentou sinais característicos a 3374 cm^{-1} referente ao estiramento O-H do grupo carboxílico, 2547 cm^{-1} referente ao estiramento S-H, 1716 cm^{-1} atribuído ao estiramento C=O. Sinais característicos entre 2800 e 3000 cm^{-1} , entre 1500 e 1600 cm^{-1} e entre 1200 e 1300 cm^{-1} referem-se à frequência de estiramento N-H, de torção N-H e de estiramento C-O, respectivamente (ITUEN; AKARANTA; UMOREN, 2017).

A amostra produzida por GAS apresentou deslocamentos em bandas características da CUR e NAC. O primeiro deslocamento

observado é referente ao estiramento de grupos fenólicos O-H da curcumina e *N*-acetilcisteína de 3509 e 3374 cm^{-1} para 3500 e 3365 cm^{-1} , respectivamente. A amostra também apresentou mudanças na frequência de estiramento do C=O da curcumina de 1627 para 1625 cm^{-1} e da NAC de 1716 para 1720 cm^{-1} .

Pode-se notar certa semelhança entre a região de *fingerprint* da curcumina e da amostra, no entanto é perceptível a ocorrência de vários deslocamentos (Figura 27). Pequenos deslocamentos nesta região mantendo a distribuição das bandas indicam mudanças nas ligações de hidrogênio (NIBBERING *et al.*, 2007).

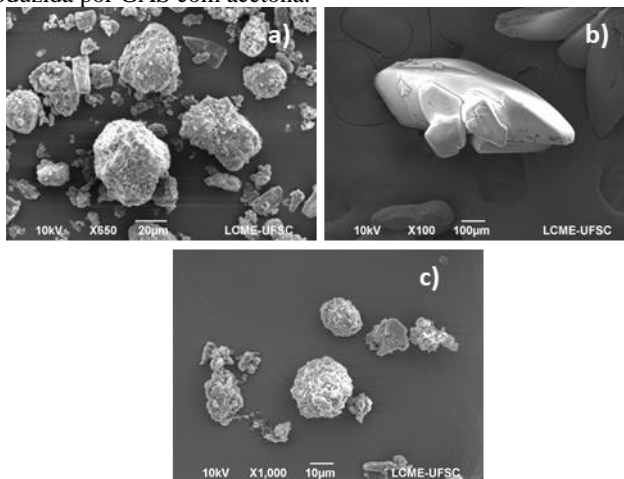
Os sinais característicos de absorção e as diferenças entre as frequências dos componentes puros e do cocrystal é apresentada na Tabela 7. Estes resultados são consistentes com os evidenciados pelas análises de PRXD e DSC confirmando a interação entre CUR e NAC a partir da cocrystalização com gás antissolvente, resultando na formação de cocrystal.

Tabela 7 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, *N*-acetilcisteína e do cocrystal formado por GAS.

Vibração	Comprimento de onda (cm^{-1})		
	CUR	NAC	Amostra 52
Estiramento O-H	3509	3374	3500 - 3365
Estiramento C=O	1627	1716	1625 - 1720
Estiramento C=C	1602	-	1602
Estiramento N-H	-	2800 - 3000	-
Estiramento S-H	-	2547	2547
Torção N-H	-	1500 - 1600	-

Na Figura 28 são apresentadas as micrografias da curcumina, da *N*-acetilcisteína e do cocrystal produzidos por GAS com acetona (amostra 52).

Figura 28 - Imagens do MEV da curcumina, nicotinamida e das amostras CUR-NAC produzida por GAS com acetona.



Legenda: (a) curcumina, (b) *N*-acetilcisteína, (c) CUR-NAC GAS com acetona (amostra 52).

A partir da Figura 28 pode-se observar que *N*-acetilcisteína apresenta morfologia lisa de formato irregular com tamanho heterogêneo. A curcumina e o cocristal possuem morfologia arredondada. A amostra produzida com acetona apresenta partículas de tamanho reduzido com morfologia flocular. A Tabela 8 apresenta os dados obtidos da média da linha diagonal em μm de cada amostra.

Tabela 8 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, nicotinamida e dos cocristais formados por CSS.

Amostra	Tamanho da partícula (média da linha diagonal em μm)
CUR	$27,9 \pm 13,2$
NAC	$715,3 \pm 83,4$
52 - CUR-NAC GAS A	$17,6 \pm 12,3$

Tamanho determinado a partir de imagens obtidas por MEV usando o software SizeMeter (versão 1.1). A variação indica desvio padrão ($n = 200$ partículas).

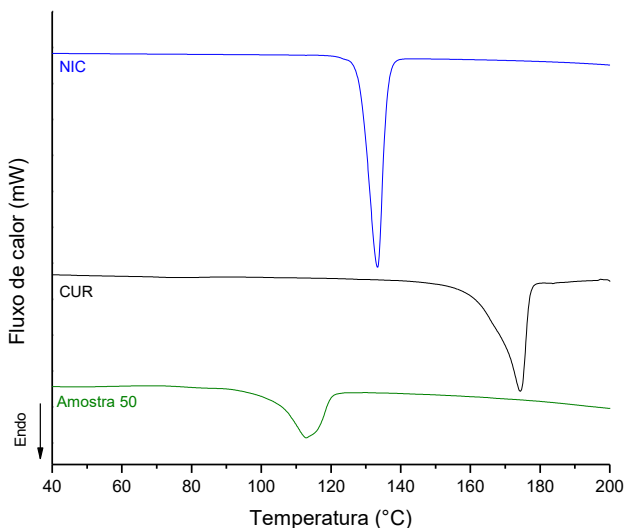
Comparando com os cocristais produzidos por CSS é possível notar que a amostra produzida por GAS apresentou tamanho reduzido, isso se deve à dissolução prévia dos compostos puros em acetona,

acarretando, durante o processo de cocrystalização, na precipitação de partículas menores.

4.2.2.2 CUR-NIC

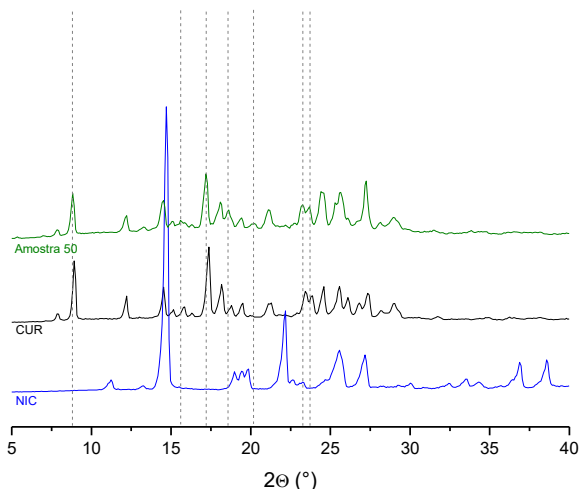
Assim como para a *N*-acetilcisteína, a amostra de curcumina e nicotinamida foi produzida por GAS com acetona (amostra 50). As curvas de DSC obtidas para estas amostras são apresentadas na Figura 29.

Figura 29 - DSC da Nicotinamida, curcumina e das amostras CUR-NIC produzida por GAS com acetona.



A curcumina apresentou seu ponto de fusão a 174,5 °C ($\Delta H = 112,9 \text{ J.g}^{-1}$) e a nicotinamida a 133,3 °C ($\Delta H = 197,7 \text{ J.g}^{-1}$). A curva obtida para a amostra de curcumina e nicotinamida produzida por GAS apresentou ponto de fusão em 112,9 °C ($\Delta H = 68,4 \text{ J.g}^{-1}$). Como já visto anteriormente, a presença de um único evento endotérmico pode indicar que houve cocrystalização, obtendo-se uma nova estrutura cristalina diferente dos compostos puros. Para verificar esta hipótese, o padrão de DRXP foi obtido e analisado (Figura 30).

Figura 30 - Difratoograma da nicotinamida, curcumina e da amostra CUR-NIC produzida por GAS com acetona.

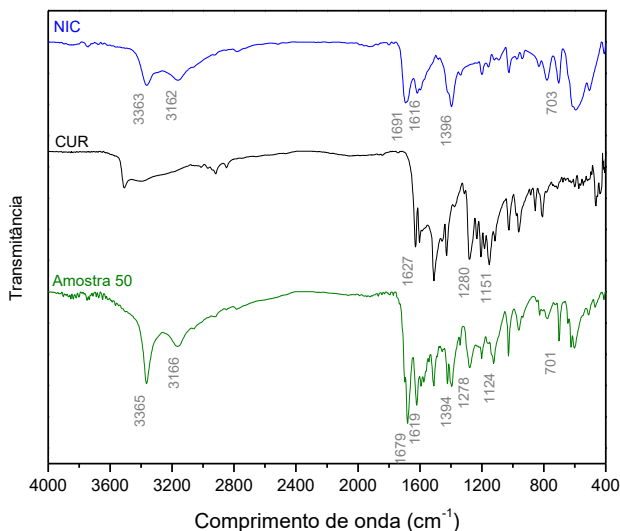


A curcumina apresenta reflexões características em $7,8^\circ$, $8,9^\circ$, $12,2^\circ$, $14,4^\circ$, $15,8^\circ$, $17,4^\circ$, $18,2^\circ$, $21,2^\circ$, $23,4^\circ$, $23,9^\circ$, $24,6^\circ$, $25,5^\circ$, $26,0^\circ$, $26,8^\circ$, $27,3^\circ$ e $29,0^\circ$ 2θ . A nicotinamida apresenta reflexões em $11,2^\circ$, $14,6^\circ$, $19,0^\circ$, $19,4^\circ$, $19,7^\circ$, $22,1^\circ$, $25,6^\circ$, $27,2^\circ$, $36,9^\circ$ e $38,5^\circ$ 2θ .

A amostra produzida por GAS apresentou deslocamento em reflexões características da curcumina de $8,9^\circ$, $15,8^\circ$, $17,4^\circ$, $18,2^\circ$, $23,4^\circ$ e $23,9^\circ$ para $8,8^\circ$, $15,6^\circ$, $17,2^\circ$, $18,5^\circ$, $23,2^\circ$ e $23,7^\circ$ 2θ . Algumas reflexões características tanto da curcumina quanto da nicotinamida se repetem na amostra. A amostra apresentou ainda uma nova reflexão em $20,2^\circ$ 2θ assim como nas amostras produzidas por CSS, indicando a possibilidade dessa reflexão ser característica de cocrystalos de curcumina e nicotinamida.

Visando observar possíveis interações químicas entre os compostos na formação dos cocrystalos, foram realizadas análises de FTIR da amostra produzida com acetona (amostra 50) e o espectro foi comparado aos dos compostos puros (Figura 31).

Figura 31 - Espectros FTIR da nicotinamida, curcumina e da amostra CUR-NIC produzida por GAS com acetona.



O espectro da curcumina apresenta sinais característicos a 3509 cm^{-1} referente à frequência de estiramento do O-H, 1627 cm^{-1} atribuído ao estiramento do C=O e 1602 cm^{-1} referente ao C=C do grupo aromático. Estes resultados estão de acordo com a literatura (KURNIAWANSYAH *et al.*, 2015; KHO; NUGROHO; SUGIH; 2018; CHOW *et al.*, 2014; SATHISARAN; DALVI, 2017).

A nicotinamida, por sua vez, apresenta as principais absorções em 3363 e 3162 cm^{-1} correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo NH_2 e 1691 e 1616 cm^{-1} correspondentes ao estiramento da ligação C=O. Esses dados estão de acordo com a literatura (RAMALINGAM *et al.*, 2010; PATIL *et al.*, 2017).

Assim como para as amostras produzidas por CSS, a amostra produzida por GAS apresentou deslocamento nas bandas referentes aos estiramentos NH_2 da nicotinamida de 3363 e 3162 cm^{-1} para 3365 e 3166 cm^{-1} . Outros deslocamentos importantes são das bandas de estiramento da carbonila da curcumina e da nicotinamida de 1627 e 1691 cm^{-1} para 1625 e 1677 cm^{-1} , respectivamente. Ao contrário das amostras obtidas por CSS, a amostra 50 não apresentou o estiramento da

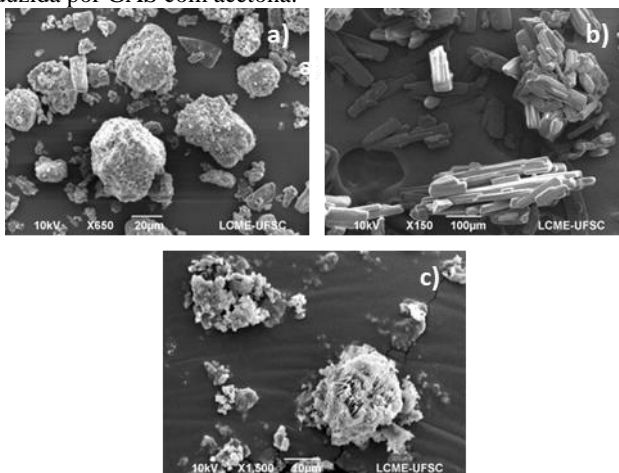
hidroxila da curcumina. Além disso, a região de *fingerprint* dessa amostra diferiu bastante dos dois compostos puros, apresentando alguns deslocamentos de bandas características da curcumina e da nicotinamida. Dessa forma podemos concluir que se trata de um cocrystal, corroborando com os resultados obtidos nas análises de DSC e DRXP. A Tabela 9 apresenta as principais absorções vibracionais dos compostos puros e os deslocamentos do cocrystal.

Tabela 9 - Dados relevantes dos espectros de FTIR da curcumina, nicotinamida dos cocristais formados por GAS.

Vibração	Comprimento de onda (cm ⁻¹)		
	CUR	NIC	Amostra 50
Estiramento C=O	1627	1691	1625 e 1677
Estiramento simétrico e assimétrico do NH ₂	-	3363 e 3162	3365 e 3166
Estiramento do O-H	3509	-	-

Na figura 32 são apresentadas as micrografias da curcumina, da nicotinamida e do cocrystal produzido por GAS com uso de acetona como solvente orgânico.

Figura 32 - Imagens do MEV da curcumina, nicotinamida e da amostra CUR-NIC produzida por GAS com acetona.



Legenda: (a) curcumina, (b) nicotinamida, (c) CUR-NIC GAS com acetona (amostra 50).

A nicotinamida apresentou morfologia tubular com tamanho heterogêneo (Figura 32). A curcumina e o cocrystal possuem morfologia arredondada e distribuição de tamanho também heterogêneo. O cocrystal produzido com adição de acetona apresentou morfologia flocular, tendo em seu interior um aglomerado com formato de agulha. A Tabela 10 apresenta os dados obtidos da média da linha diagonal em μm de cada amostra.

Tabela 10 - Dados de tamanho de partícula para curcumina, nicotinamida e dos cocrystal formados por GAS.

Amostra	Tamanho da partícula (média da linha diagonal em μm)
CUR	27,9 \pm 13,2
NIC	38,4 \pm 23,4
50 - CUR-NIC GAS A	29,8 \pm 11,5

Tamanho determinado a partir de imagens obtidas por MEV usando o software SizeMeter (versão 1.1). A variação indica desvio padrão ($n = 200$ partículas).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.2.3 CONCLUSÃO

O Quadro 9 apresenta as amostras produzidas por LAS e LAG e os resultados obtidos para cada amostra.

Quadro 9 - Conclusões obtidas após análise dos resultados das amostras produzidas por CSS e GAS.

Amostra	Método/ Solvente	Coformador	Fração molar (curcumina: coformador)	Solvente utilizado
40	CSS / Sem cossolvente	NIC	1:3	Cocrystal
41	CSS / Acetona	NIC	1:3	Cocrystal
42	CSS / Acetato de etila	NIC	1:3	Mistura física
43	CSS / Sem cossolvente	NAC	1:1	Cocrystal
44	CSS / Acetona	NAC	1:1	Cocrystal
45	CSS / Acetato de etila	NAC	1:1	Cocrystal

46	CSS / Sem cossolvente	NAC	2:1	Mistura física
47	CSS / Acetato de etila	NAC	2:1	Mistura física
48	CSS / Acetato de etila	NAC	1:2	Mistura física
49	CSS / Sem cossolvente	PIP	1:1	Mistura física
50	GAS / Acetona	NIC	1:3	Cocrystal
51	GAS / Acetato de etila	NIC	1:3	Amostra heterogênea
52	GAS / Acetona	NAC	1:1	Cocrystal
53	GAS / Acetato de etila	NAC	1:1	Não foi possível coletar
54	GAS / Acetona	PIP	1:1	Amorfo

Legenda: NAC: N-acetilcisteína, NIC: nicotinamida, PIP: piperina.

A formação de cocristais de curcumina com *N*-acetilcisteína e nicotinamida foi bem sucedida tanto pela técnica CSS quanto pela técnica GAS. A técnica CSS é baseada na dissolução, ao menos parcial, dos compostos no dióxido de carbono supercrítico, além da ação mecânica devido à alta pressão empregada (90 bars). Estas duas características do método facilitam a ocorrência de interações intermoleculares entre os compostos, permitindo a formação de cocristais. Por outro lado, a técnica GAS é baseada na ação do dióxido de carbono supercrítico como antissolvente, permitindo a precipitação em forma de cocristais dos compostos previamente dissolvidos em solvente orgânico.

A partir da caracterização dos cocristais produzidos por CSS com NAC foi possível observar que esses apresentaram estrutura cristalina semelhante, porém tamanhos de partícula diferentes. Esta diferença morfológica ocorreu devido à solubilização dos compostos no cossolvente adicionado. O mesmo ocorreu para os cocristais produzidos por CSS com NIC.

Os cocristais produzidos por GAS apresentaram algumas diferenças em sua estrutura cristalina quando comparados às amostras

obtidas por CSS, esses resultados se devem à prévia dissolução do ingrediente ativo e coformadores na acetona e posterior precipitação.

Dessa forma, foi possível atingir o objetivo de produzir cocristais de curcumina com o uso de dióxido de carbono supercrítico.

4.3 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

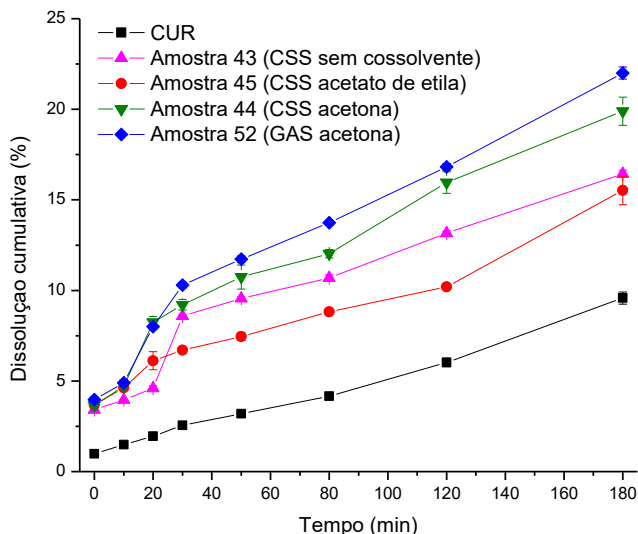
Estudos de dissolução em água destilada foram realizados para os cocristais produzidos por CSS (amostras 40, 41, 43, 44 e 45), GAS (amostras 50 e 52) e para curcumina pura. O objetivo foi observar se houve aumento do potencial de dissolução nos cocristais e correlacionar com os resultados obtidos nas seções anteriores.

4.3.1 PERFIL DE DISSOLUÇÃO

4.3.1.1 Curcumina e N-acetilcisteína (CUR-NAC)

Os perfis de dissolução dos cocristais de CUR-NAC produzidos por CSS sem cossolvente (amostra 43), com acetona (amostra 44) e com acetato de etila (amostra 45) e GAS com acetona (amostra 52) são apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Perfil de dissolução de cocristais de curcumina e N-acetilcisteína produzidos por CSS e GAS.



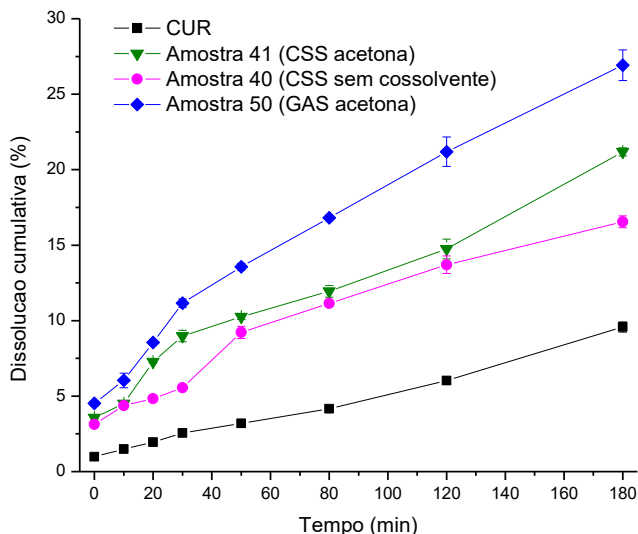
Imediatamente após adição da água destilada, a curcumina apresentou uma dissolução de 0,98%, enquanto os cocristais apresentaram em torno de 4% de dissolução. Após 10 minutos, a dissolução cumulativa dos cocristais aumentou para em torno de 5% e da curcumina para 1,5%. Os cocristais produzidos por CSS e por GAS com acetona apresentaram um aumento acentuado da dissolução entre 10 e 20 minutos chegando a 8%, o mesmo aconteceu para o cocristal produzido por CSS sem adição de cossolvente entre 20 e 30 minutos. A curcumina manteve um crescimento lento da dissolução até 80 minutos de experimento. Após 180 minutos, a curcumina apresentou 9,5% de dissolução cumulativa, mesma porcentagem apresentada pelo cocristal CUR-NAC produzido por CSS com acetona após 30 minutos. Esta amostra alcançou o dobro de dissolução da curcumina após 180 minutos de análise, chegando a 19% de dissolução. Os outros dois cocristais produzidos por CSS apresentaram em torno de 16% de dissolução após o tempo total de análise. O cocristal produzido por GAS com acetona apresentou 22% de dissolução após 180 min de análise.

O cocrystal de curcumina e *N*-acetilcisteína produzido por GAS com acetona apresentou a melhor dissolução, este resultado pode ser relacionado ao menor tamanho de partícula, como apresentado na análise de MEV. A obtenção de partículas menores se deve à solubilização prévia do ingrediente ativo e coformador na acetona, e posterior precipitação. Dentre os cocrists produzidos por CSS, àquele produzido com acetona como cossolvente apresentou a maior dissolução após 180 min de análise, isso se deve provavelmente à sua estrutura cristalina mais frágil, como observado a partir das análises de DSC e DRXP. Além disso, assim como a amostra produzida por GAS, a amostra produzida por CSS com acetona apresenta menor tamanho de partícula, como mostrado pela análise de imagem do MEV. Apesar de Sanphui *et al.* (2011) e Sathisaran e Dalvi (2017) realizarem análises de dissolução em solução de 40% de etanol-água, também reportaram um aumento no potencial de dissolução de cocrists de curcumina comparado à curcumina pura.

4.3.1.2 Curcumina e nicotinamida (CUR-NIC)

Os perfis de dissolução dos cocrists de curcumina e nicotinamida produzidos por CSS sem cossolvente (amostra 40) e com acetona (amostra 41) e GAS com acetona (amostra 50) são apresentados na Figura 34.

Figura 34 - Perfil de dissolução de cocristais de curcumina e nicotinamida produzidos por CSS e GAS.



Imediatamente após adição da água destilada, a curcumina apresentou uma dissolução de 0,98%, enquanto os cocristais produzidos por CSS apresentaram em torno de 4% de dissolução. O cocristal obtido por CSS sem cossolvente teve aumento contínuo na dissolução até 30 min, chegando a 5% de dissolução, em seguida teve um rápido aumento na dissolução passando para 9% após 50 min de análise. Essa amostra manteve o aumento da dissolução constante, chegando a 16% após 180 min. A amostra obtida por CSS com acetona apresentou um aumento na dissolução cumulativa constante de 0 a 30 min, atingindo 9% de dissolução nesse ponto. Ao final da análise essa amostra atingiu 21% de dissolução, sendo esse valor 2,2 vezes maior do que da curcumina pura. Assim como os cocristais produzidos com NAC, o cocristal produzido com nicotinamida por GAS apresentou um perfil de dissolução maior do que os cocristais produzidos por CSS, o que se deve provavelmente a um menor tamanho de partícula para essa amostra. Após 180 min, essa

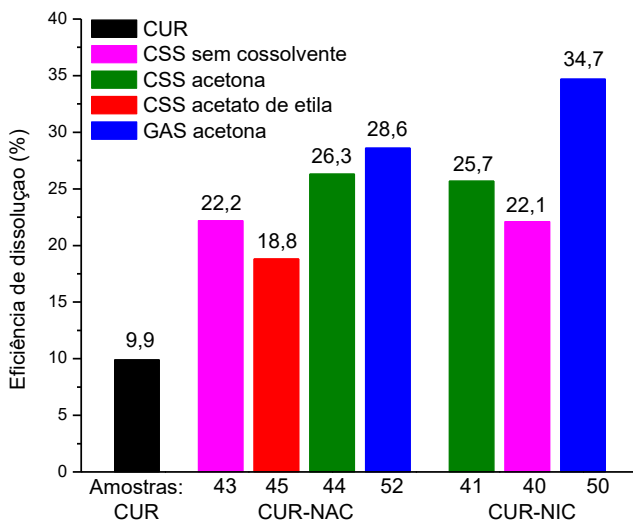
amostra apresentou 27% de dissolução cumulativa, sendo este valor 2,8 vezes maior do resultado obtido para curcumina pura.

4.3.2 EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO

A eficiência de dissolução permite uma comparação mais exata entre os perfis de dissolução do ingrediente ativo e cocristais, pois este parâmetro está relacionado com a quantidade real de ingrediente ativo que se encontra dissolvido no meio (SERRA; STORPIRTIS, 2007). Este parâmetro é obtido através da razão entre a área da curva de dissolução da amostra pela área total do gráfico (180 min, 100%).

A Figura 35 apresenta a eficiência de dissolução em água, calculada no intervalo de 0 a 180 min, relativa às amostras de curcumina pura, dos cocristais CUR-NAC obtidos por CSS e GAS, e dos cocristais CUR-NIC também obtidos por CSS e GAS.

Figura 35 - Eficiência de dissolução em 180 min da curcumina pura (CUR) e dos cocristais de curcumina com N-acetilcisteína (CUR-NAC) e nicotinamida (CUR-NIC) obtidos por CSS e GAS.



A eficiência de dissolução dos cocristais é, no mínimo, duas vezes maior do que da curcumina pura. Nesse teste pode-se observar que para os cocristais obtidos por CSS, àqueles produzidos com acetona como co-solvente apresentaram maior eficiência de dissolução. Esse efeito se deve à sua estrutura mais frágil e menor tamanho de partícula, devido à alta solubilidade em acetona do ingrediente ativo e os coformadores. Os cocristais produzidos por GAS apresentaram as melhores eficiências de dissolução, atingindo 26,6% para o cocristal CUR-NAC e 34,7% para o cocristal CUR-NIC. A maior eficiência de dissolução obtida para o cocristal produzido por GAS com nicotinamida como cocristal se deve à maior solubilidade da nicotinamida em água comparada à *N*-acetilcisteína, uma vez que os cocristais geralmente apresentam propriedades intermediárias entre o ingrediente ativo e o coformador.

4.3.3 CONCLUSÃO

Apesar de os cocristais produzidos por CSS para cada coformador apresentarem estruturas químicas semelhantes, o potencial de dissolução apresentou diferenças, o que se deve às diferenças de tamanho de partícula e fragilidade da estrutura cristalina. Os cocristais produzidos por GAS (amostras 50 e 52) apresentaram melhores perfis de dissolução e melhores eficiências de dissolução. Estes resultados se devem à prévia dissolução em acetona, permitindo a precipitação de partículas menores, além de apresentarem estrutura cristalina diferente dos cocristais produzidos por CSS, confirmado pelas diferenças de ponto de fusão, difratograma e espectro no infravermelho entre eles. Portanto, os resultados obtidos do perfil de dissolução das amostras em água corroboram com os resultados apresentados no capítulo 5, confirmando que houve cocristalização.

O principal objetivo da cocristalização da curcumina foi atingido. Foi possível obter cocristais com dissolução 2,8 vezes maior que a curcumina pura. A eficiência de dissolução após 180 minutos em água destilada a 37 °C sob agitação de 100 rpm chegou a 34,7% para o cocristal de curcumina e nicotinamida obtido por GAS (amostra 50), sendo este resultado 3,5 vezes maior do que a eficiência de dissolução da curcumina pura. Estes resultados demonstram a possibilidade de ampliar a utilização da curcumina nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

4.4 TESTE *IN VIVO*

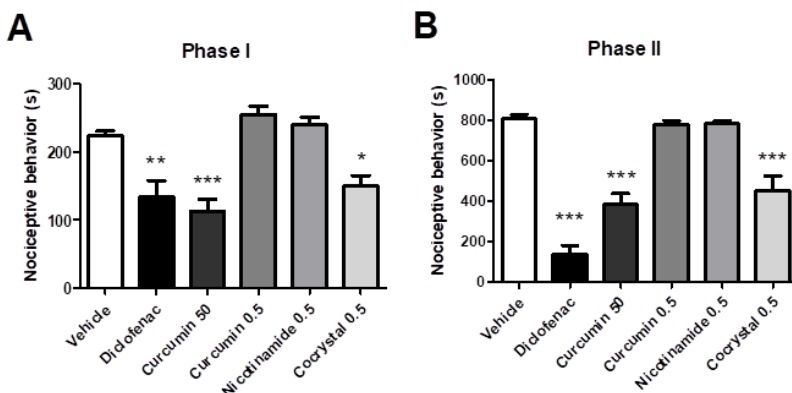
A técnica de CSS apresentou como maior vantagem o não uso ou o uso reduzido de solventes orgânicos durante a cocristalização. Dentre as amostras obtidas por esta técnica, o cocristal de curcumina e nicotinamida produzido sem adição de cossolvente apresentou um perfil de dissolução em torno de 2 vezes maior do que da curcumina pura. Além disso, essa amostra apresentou a vantagem da não utilização de solvente orgânico no processamento e por isso foi selecionada para a realização análise *in vivo* de ação anti-inflamatória e antinociceptiva. Esse teste foi realizado em parceria com a Dra. Liz Girardi Müller e o Dr. Gean Pablo S. Aguiar da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ.

4.4.1 TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

No teste de nocicepção induzida por formalina, o tempo gasto pelos camundongos levantando, sacudindo ou lambendo a pata na qual foi injetada a formalina, foi contado durante um período de 0-5 min após a injeção, sendo esse tempo correspondente à nocicepção neurogênica (primeira fase do teste) e 15-30 min após injeção de formalina, que corresponde à nocicepção inflamatória (segunda fase do teste).

O controle positivo diclofenaco (50 mg/kg), curcumina (50 mg/kg) e cocristal curcumina-nicotinamida (0,5 mg/kg) reduziram significativamente o comportamento nociceptivo em ambas as fases (fase I: $F(5,28) = 12.79$; $P < 0.001$; fase II: $F(5,28) = 35.40$; $P < 0.001$) do teste de formalina (Figura 36 A e B), e não houve diferenças entre o tempo de nocicepção desses grupos.

Figura 36 - Efeitos do comportamento nociceptivo do cocristal CUR-NIC em camundongos avaliados na primeira fase (painel A, 0-5 min) e na segunda fase (painel B, 15-30 min) do comportamento nociceptivo induzido pela formalina.



Camundongos ($n = 6-7$ /grupo) foram tratados por via oral com veículo (NaCl 0,9%, 10 ml/kg, grupo controle), diclofenaco (50 mg/kg), curcumina (50 ou 0,5 mg/kg), nicotinamida (0,5 mg/kg) ou cocristal curcumina-nicotinamida (0,5 mg/kg), 1 hora antes da administração intraplantar de formalina a 2%. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão. Análise de variância simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, diferente do grupo controle.

Fonte: Desenvolvido pela Dra. Liz Girardi Müller (UNOCHAPECO).

Os resultados obtidos no teste de formalina demonstraram que o cocristal, similarmente ao diclofenaco e à curcumina a 50 mg/kg, inibe as ações de lambar, sacudir ou levantar a pata induzido pela formalina, tanto na primeira quanto na segunda fases do teste. A primeira fase do teste de formalina está relacionada à dor neurogênica, quando ocorre a ativação de neurônios nociceptivos, enquanto a segunda fase está relacionada à liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995). Pode-se observar que com a redução de 100 vezes da dose de curcumina, de 50 mg/kg para 0,5 mg/kg, os efeitos na primeira e segunda fase reduziram. Diferente do cocristal, que mesmo com o uso de dose reduzida (0,5 mg/kg) apresentou melhor efeito antinociceptivo que a curcumina na mesma concentração e efeito anti-inflamatório similar à curcumina 100 vezes mais concentrada. Portanto, mesmo com a redução de 100 vezes da dose, o cocristal apresentou

efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, o que não ocorreu com a curcumina.

4.4.2 CONCLUSÃO

O cocrystal de curcumina-nicotinamida foi eficaz em ambas as fases do teste, o que demonstrou que além de manter as propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias da curcumina, a cocrystalização aumenta a potência da curcumina no teste da formalina. Mesmo com a redução de 100 vezes da dose, o cocrystal apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, o que não ocorreu com a curcumina. A cocrystalização tem sido apontada como um processo efetivo para melhorar a biodisponibilidade de substâncias sem alterar sua estrutura molecular (SHAIKH *et al.*, 2018). Considerando que a curcumina apresenta baixa biodisponibilidade devido à baixa solubilidade e mínima permeabilidade através do epitélio gastrointestinal (ANAND *et al.*, 2007), podemos inferir que o processo de cocrystalização provavelmente tenha aumentado sua potência antinociceptiva/anti-inflamatória devido às alterações em sua estrutura cristalina e, conseqüentemente, em sua biodisponibilidade.

CAPÍTULO 5

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

A partir da realização das técnicas de cocristalização em pressão ambiente foi possível escolher os coformadores utilizados neste trabalho. Dentre os coformadores analisados, a *N*-acetilcisteína e a nicotinamida foram escolhidos por apresentarem ponto de fusão e padrões de PDRX diferente dos compostos iniciais, indicando a possibilidade de formação de cocristais.

Pela técnica de Cocristalização com Solvente Supercrítico (CSS) foi possível obter cocristais de curcumina e *N*-acetilcisteína sem adição de cossolvente e com adição de acetona e acetato de etila, e cocristais de curcumina e nicotinamida sem adição de cossolvente e com adição de acetona. Os cocristais CUR-NAC obtidos por CSS apresentaram rede cristalina similar, como concluído através da análise dos resultados de DSC, PDRX e FTIR, porém apresentaram tamanhos de partícula levemente diferentes, o que se deve à dissolução de parte dos compostos iniciais nos cossolventes, o que facilita a ocorrência de interações moleculares durante o processamento.

Os cocristais de CUR-NAC obtidos por GAS apresentaram ponto de fusão diferente dos obtidos por CSS, isso pode ocorrer devido à uma estrutura cristalina diferente entre os cocristais. Esse resultado é confirmado pelas diferenças observadas nos padrões obtidos por PDRX bem como pelas diferenças de deslocamento das bandas de FTIR. O mesmo ocorre ao comparar os cocristais de curcumina e nicotinamida obtidos por CSS e GAS, exceto pelo fato de que ambos apresentaram pontos de fusão abaixo dos pontos de fusão dos compostos iniciais.

Os cocristais produzidos por CSS com acetona apresentaram as menores partículas e também as maiores taxas de dissolução, levando em conta a similaridade da estrutura cristalina, pode-se concluir que o tamanho de partícula é um fator relevante para a melhor dissolução dos cocristais. O mesmo ocorreu quando comparados os cocristais obtidos por CSS e GAS, esses últimos apresentam menor tamanho de partícula e maior taxa e eficiência de dissolução, sendo esse resultado mais acentuado para o cocristal de curcumina e nicotinamida produzido por GAS.

Foi possível obter cocristais com dissolução 2,8 vezes maior que a curcumina pura. A eficiência de dissolução após 180 minutos em

água destilada chegou a 34,7% para o cocrystal de curcumina e nicotinamida obtido por GAS, sendo este resultado 3,5 vezes maior do que a eficiência de dissolução da curcumina pura.

Com a grande vantagem de não possuir solvente orgânico, o cocrystal de curcumina e nicotinamida produzido por CSS foi testado *in vivo* quanto a sua atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. O cocrystal foi eficaz em ambas as fases do teste, o que demonstrou que além de manter as propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias da curcumina, a cocrystalização aumenta a potência da curcumina, visto que a dosagem do cocrystal foi reduzida em 100 vezes no teste da formalina. Isso ocorreu devido à uma mudança na estrutura cristalina do cocrystal, comparado à curcumina, que por consequência alterou positivamente sua biodisponibilidade.

Os objetivos deste trabalho foram atingidos e os resultados obtidos demonstraram a possibilidade de ampliar a utilização da curcumina nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a solubilidade da curcumina e coformadores em CO₂ supercrítico com solventes orgânicos;
- Estudar a influência de parâmetros como pressão, temperatura e tempo de processamento nas técnicas de CSS e GAS;
- Verificar os perfis de dissolução *in vitro* dos cocrystalis em fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulado;
- Realizar testes *in vivo* em modelos animais para avaliar a biodisponibilidade dos cocrystalis;
- Realizar estudos de estabilidade dos cocrystalis ao abrigo de luz e exposto à luz;
- Testar a cocrystalização da curcumina com outros coformadores;
- Avaliar o solvente residual nos cocrystalis produzidos por GAS.

REFERÊNCIAS

- AAKEROY, C. B.; SALMON, D. J. Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility. **Crystal Engineering Communications**, v. 7, n. 72, p. 439-448, julho 2005.
- ABBOTT, F.V; FRANKLIN, K.B.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain Pharmacology and Analgesia**, v. 60, n. 1, p. 91-102, 1995.
- AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 40-59, 2008.
- AGGARWAL, B.B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Cell press**, v. 30, n. 2, p. 85-94, 2009.
- AGUIAR, G. P. S.; ARCARI, B. D.; CHAVES, L. M. P.; DAL MAGRO, C.; BOSCHETTO, D. L.; PIATO, A. L.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J. V. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and *in vitro* antioxidante activity. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 1-5, 2018.
- AGUIAR, G. P. S.; MARCON, M.; MOCELIN, R.; HERRMANN, A. P.; CHAVES, L. M. P. C.; PIATO, A. L.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J. V. Micronization of *N*-acetylcysteine by supercritical fluid: evaluation of *in vitro* and *in vivo* biological activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, p. 282-291, 2017.
- AITIPAMULA, S. *et al.* Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name?. **Crystal Growth and Design**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.
- AMIDON, G. L. *et al.* A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANAND, P.; KUNNUMALLARA, R.; NEWMAN, R.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANTONY, B.; MERINA, B.; IYER, V. S.; JUDY, N.; LENNERTZ, K.; JOYAL, S. A.; Pilot cross-over study to evaluate human oral bioavailability of BCM-95 CG (Biocurcumax) a novel bioenhanced preparation of curcumin. **Industrial Journal of Pharmaceutical Science**, p. 445-449, 2008.

BALAN, P.; MAL, G.; DAS, S.; SINGH, H. Synergistic and additive antimicrobial activities of curcumin, manuka honey and whey proteins. **Journal of Food Biochemistry**, v. 40, p. 647-654, 2016.

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

BASSAVOJU, S.; BOSTROM, D.; VELAGA, S. P. Pharmaceutical Cocrystal and Salts of Norfloxacin. **Crystal Growth & Design**, v. 6, p. 1344-1352, 2006.

BLAGDEN, N.; MATAS, M.; GAVAN, P.T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates, **Advances in Drug Delivery Review**, v. 59, p. 617-630, 2007..

BRAGA, D.; GREPIONI, F. Making crystals from crystals: a green route to crystal engineering and polymorphism. **Chemical communications**, n. 29, p. 3635-3645, 2005;

BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. **New York: Steinkopff**, 1994. 387 ISBN 978-3-662-07382-7.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. III. Cromatografia com Fluido supercrítico: aplicações. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 790-795, 2006.

C.C. Brasil, LEI No 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, Constituição Federal, p. 4-9, 2018.

C.-M. Brasil, Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA, 2016. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

CHILDS, S. L.; STAHLY, G. P.; PARK, A. The salt-crystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 323-338, março 2007.

CHIU, M. H.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39-59, 2011.

CHOW, S. F.; SHI, L.; NG, W. W.; LEUNG, K. H. Y.; NAGAPUDI, K.; SUN, C. C.; CHOW, A. H. L. Kinetic entrapment of a hidden curcumin cocrystal with phloroglucinol. **Crystal Growth and Design**, v. 14, p. 5079-5089, 2014.

COCERO, M. J.; MARTIN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Review: Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 546-555, 2009.

CUADRA, I.A.; CABANAS, A.; CHEDA, J.A.R.; MARTINEZ-CASADO, F.J.; PANDO, C. Pharmaceutical co-crystals of the anti-inflammatory drug diflunisal and nicotinamide obtained using supercritical CO₂ as an antisolvent. **Journal of CO₂ utilization**, v. 13, p. 29-37, 2016.

CUADRA, I.A.; CABANAS, A.; CHEDA, J.A.R.; MARTINEZ-CASADO, F.J.; PANDO, C. I.A. Polymorphism in the co-crystallization of the anticonvulsant drug carbamazepine and saccharin using supercritical CO₂ as an anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 136, p. 60-69, 2018.

CUI, L.; MIAO, J.; CUI, L. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite Plasmodium falciparum: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 488-494, 2007.

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

DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G. P. S.; VENERAL, J. G.; SANTOS, A. E.; CHAVES, L. M. P.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 182-190, 2017.

DELORI, A.; FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. The role of mechanochemistry and supramolecular design in the development of pharmaceutical materials. **Crystal Engineering Communication**, v. 14, n. 7, p. 2350, 2012.

EL-GIZAWY, S. A.; OSMAN, M. A.; ARAFA, M. F.; EL MAGHRABY, G. M. Aerosil as a novel co-crystal co-former for improving the dissolution rate of hydrochlorothiazide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 773-778, 2015.

ERRIGUIBLE, A.; NEUROHR, C.; REVELLI, A.L.; LAUGIER, S.; FEVOTTE, G. ; SUBRA-PATERNAUT, P. Cocrystallization induced by compressed CO₂ as antisolvent: Simulation of a batch process for the estimation of nucleation and growth parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 194-203, 2015.

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

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J.J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, p. 219-226.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-crystals. **Food and Drug Administration**: Silver Spring, MD, dezembro 2011.

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

GALLAGHER, P. M. *et al.* Gas Antisolvent Recrystallization: New Process To Recrystallize Compounds Insoluble in supercritical Fluids. In: (Ed.). **Supercritical Fluid Science and Technology: American Chemical Society**, v.406, 1989. cap. 22, p.334-354. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412- 1678-9

GATELY, S. T.; TRIEZENBERG, S. J. Solid forms of curcumin. PCT/US2012/032396. 2012 WO 212138907A2.

GOUD, N. R.; SURESH, K.; SANPHUI, P.; NANGIA, A. Fast dissolving eutectic compositions of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 63-72, 2012.

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

HE, G.; JACOB, C.; GUO, L.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Screening for cocrystallization tendency: The role of intermolecular interactions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 32, p. 9890–9895, 2008;

HINO, T.; FORD, J. L.; POWELL, M. W. Assessment of nicotinamide polymorphs by differential scanning calorimetry. **Termochimica Acta**, v. 374, n. 1, p. 85-92, 2011.

HORST, J. H.; DEIJ, M. A.; CAINS, P. W. Discovering new co-crystals. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 3, p. 1531-1537, dezembro 2008.

ITUEN, E. B.; AKARANTA, O.; UMOREN, S. A. N-acetylcysteine based corrosion inhibitor formulations for steel protection in 15% HCl solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 246, p. 112-118, 2017.

JAIN, A.; YANG, G.; YALKOWSKY, S. H. Estimation of Melting Points of Organic Compounds. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 23, p. 7618-7621, 2004.

JAYASANKAR, A. *et al.* Cocrystal formation during cogrinding and storage in mediated by amorphous phase. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 10, outubro 2006.

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

KARIKAR, C.; MAITRA, A.; BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 1-18, 2007.

KAURIEN, B. T.; SINGH, A.; MATSUMOTO, H.; SCOFIELD, R. H. Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. **Assay Drug Development Technology**, v. 5, n. 4, p. 567-576, 2007.

KHO, K.; NUGROHO, D.; SUGIH, A. Preparation and characterization of highly water soluble curcumin-dextrose cocrystal. **The Journal of Pure and Applied Chemistry Research**, v. 7, n. 2, p. 139-147, 2018.

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

KURNIAWANSYAH, F.; DUONG, H. T. T.; LUU, T. D.; MAMMUCARI, R.; VITTORIO, O.; BOYER, C.; FOSTER, N. R. Inhalable curcumin formulations: micronization and bioassay. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 799-808, 2015.

KURNIAWANSYAH, F.; QUACHIE, L.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N. R. Improving the dissolution properties of curcumin using dense gas antisolvent technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 521, n. 1-2, p. 239-248, 2017.

LAO, C.D.; RUFFIN, M.T.; NORMOLLE, D.; HEATH, D.D.; MURRAY, S.I.; BAILEY, J.M.; BOGGS, M.E.; CROWELL, J.; ROCK, C.L.; BRENNER, D.E. Dose escalation of a curcuminoid formulation, BMC Complement. **Altern. Med.**, v. 6, p. 4-7, 2006.

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

NEUROHR, C.; ERRIGUIBLE, A.; LAUGIER, S.; SUBRAPATERNAUT, P. Challenge of the supercritical antisolvent technique SAS to prepare cocrystal-pure powders of naproxen-nicotinamide. **Chemical Engineering Journal**, v. 303, p. 238-251, 2016.

NIBBERING, T. J.; DREYER, J.; KUHN, O.; BREDENBECK, O.; HAMM, P.; ELSAESSER, T. Vibrational dynamics of hydrogen bonds, *in* **Analysis and control of ultrafast photoinduced reactions**, Springer, Berlin, v. 87, p. 619-687, 2007.

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

PADRELA, L.; RODRIGUES, M. A.; VELAGA, S. P.; FERNANDES, A. C.; MATOS, H. A.; DE AZEVEDO, E. G. Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 53, n. 1-3, p. 156–164, 2010.

PADRELA, L.; RODRIGUES, M. A.; VELAGA, S. P.; MATOS, H. A.; DE AZEVEDO, E. G. Formation of indomethacin-saccharin cocrystals using supercritical fluid technology. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, p. 9–17, 2009.

PADRELA, L.; RODRIGUES, M.A.; DUARTE, A.; DIAS, A.M.A.; BRAGA, M.E.M.; DE SOUSA, H.C. Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals – A comprehensive review. **Advances in Drug Delivery Reviews**, 2018.

PADRELA, L.; RODRIGUES, M.A.; TIAGO, J.; VELAGA, S.P.; MATOS, H.A.; DE AZEVEDO, E.G. Tuning physicochemical properties of theophylline by cocrystallization using the supercritical fluid enhanced atomization technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 129-136, 2014.

PADRELA, L.; RODRIGUES, M.A.; TIAGO, J.; VELAGA, S.P.; MATOS, H.A.; DE AZEVEDO, E.G. Insight into the Mechanisms of Cocrystallization of Pharmaceuticals in Supercritical Solvents? **Crystal Growth & Design**, v. 15, p. 3175-3181, 2015.

PANDO, C.; CABANAS, A.; CUADRA, I. Preparation of pharmaceutical co-crystals through sustainable processes using supercritical carbon dioxide: A review. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 6, n. 75, p. 71134-71150, 2016.

PANZADE, P.; SHENDARKAR, G.; SHAIKH, S.; RATHI, P. B. Pharmaceutical cocrystal of piroxicam design, formulation and evaluation. **Tabriz University of Medical Science**, v. 7, p. 399-408, 2017.

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

PESSOA, A. P.; AGUIAR, G. P. S.; OLIVEIRA, J. V.; BORTOLUZZI, A. J.; PAULONO, A.; LANZA, M. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamida cocrystals by gas antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 93-102, 2019.

PESSOA, A. Produção e caracterização de cocrystalis do resveratrol por técnicas a pressão ambiente e em meio supercrítico. **2018. 176 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.**

PUBCHEM. The PubChem Project: improved access to chemical data. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 21 novembro 2018.

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

RAMALINGAM, S.; PERIANDY, S.; GOVINDARAJAN, M.; MOHAN, S. FT-IR and FT-Raman vibrational spectra and molecular structure investigation of nicotinamide : A combined experimental and

theoretical study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v, 75, p.1552–1558, 2010.

RUBY, A. J.; KUTTAN, G.; BABU, K. D., RAJASEKHARAN, K. N.; KUTTAN, R. Anti-tumor activity and antioxidant activity of natural curcuminoids. **Cancer Letters**, v. 94, p. 79-83, 1995.

SALEM, M.; ROHANI, S.; GILLIES, E. R. Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 4, n. 21, p. 10815-10829, 2014.

SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SUNG, B.; AHN, K.S.; MARUKAMI, A.; SETHI, G.; LIMTRAKUL, P.; BADMAEV, V.; AGGARWAL, B.B. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8., p. 1765-1773, 2007.

SANTOS, R.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 417–426, 1999.

SANPHUI, P.; GOUD, N. R.; KHANDAVILLI, U. B. R. ; NANGIA, A. Fast dissolving curcumin cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 4135-4145, 2011.

SATHISARAN, I; DALVI, S. V. Crystal engineering of curcumin with salicylic acid and hydroxyquinol as cofomers. **Crystal Growth and Design**, v. 17, p. 3974-3988, 2017.

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

SEKHON, B. S. Pharmaceutical co-crystals – a review. **ARS Pharmaceutica**, v. 52, n. 3, p. 99-117, janeiro 2009.

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

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

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

SHAIKH, R.; SINGH, R.; WALKER, G.M.; CROKER, D.M. Pharmaceutical cocrystal drug products: an outlook on product development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 12, p. 1033-1048, 2018.

SKOOG, A. D.; HOLLER F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed., Porto alegre: Bookman, p. 488-492, 2002.

SRIMAL, R.C.; DHARWAN, B.N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 447-452, 1973.

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

STEELE, G. **Pharmaceutical Preformulation and Formulation**. 2. ed. v. 199. New York: Informa Healthcare USA, Inc., p. 198-201, 2009.

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

SU, H.; HE, H.; TIAN, Y.; ZHAO, N.; SUN, F.; ZHANG, X.; JIANG, Q.; ZHU, G. Syntheses and characterization of two curcumin-based cocrystals. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 55, p. 92-95, 2015.

THAKURIA, R.; DELORI, A.; JONES, W.; LIPERT, M.P.; ROY, L.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 101-125, 2013.

THANGAPAZHAM, R. L.; SHARMA, A.; MAHESHWARI, R. K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. **American Association of Pharmaceutical Scientist Journal**, v. 8, p. E443-E449 2006.

TRASK, A. V.; JONES, W. Crystal Engineering of Organic Cocrystals by the Solid-State Grinding Approach. In: TODA, F. (Ed.). **Organic Solid State Reactions: -/-**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p.41-70, 2005.

TRASK, A. V; MOTHERWELL, W. D. S.; JONES, W. Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 7, p. 890–891, 2004.

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

UPADHAYA, N. *et al.* Pharmaceutical co-crystal: an emerging approach to improve physical property. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 8, n. 1, p. 144-148, junho 2011.

VASISHT, K.; CHADHA, K.; KARAN, M.; BHALLA, Y.; JENA, A. K.; CHADHA, R. Enhancing biopharmaceutical parameters of bioflavonoid quercetin by cocrystallization. **Crystal Engineering Communications**, v. 18, n. 8, p. 1403-1415, 2016.

WANG, Y. J.; PAN, M. H.; CHENG, A. L.; LIN, L. I.; HO, Y. S.; HSIEH, C. Y.; LIN, J. K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 1867-1876, 1997.

WEISBERG, S.P.; LEIBEL, R.; TORTORIELLO, D.V. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and

diabetes in mouse models of diabetes. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3549-3558, 2008.

WICHIANPHONG, N.; CHAROENCHAITRAKOOL, M. Statistical optimization for production of mefenamic acid – nicotinaide cocrystals using gas anti-solvent (GAS) process. **Jornal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, p. 275-282, 2018.

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

ZHANG, X.; TIAN, Y.; JIA, J.; ZHANG, T.; ZHU, G. Synthesis, characterization and dissolution of three pharmaceutical cocrystals based on deferiprone, **Journal of Molecular Structures**, v. 1108, p. 560-566, 2016.

ZHOU, Z.; LI, W.; SUN, W.; LU, T.; TONG, H. H. Y.; SUN, C. C. ; ZHENG, Y. Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tableability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509, n. 1-2, p. 391-399, 2016.

APÊNDICE A – Curva de calibração da curcumina e varredura da N-acetilcisteína, nicotinamida e piperina.

Figura 1 – Curva de calibração média da curcumina obtida por espectrofotometria UV.

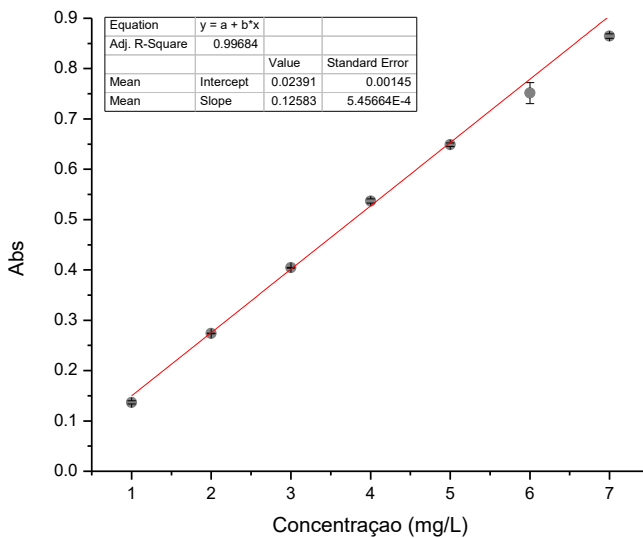


Figura 2 – Varredura para avaliar sobreposição dos espectros UV-Vis da N-acetilcisteína e nicotinamida.

