



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Alessandro Rogério Paulazzi

Cocrystal de curcumina e n-acetilcisteína: síntese, caracterização e atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*.

Florianópolis

2020

Alessandro Rogério Paulazzi

**Cocrystal de curcumina e n-acetilcisteína: síntese, caracterização e atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientadoras: Profa. Dra. Liz Girardi Müller

Florianópolis

2020

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

Paulazzi, Alessandro Rogério

Cocrystal de curcumina e n-acetilcisteína: síntese, caracterização e atividades antinociceptiva e anti inflamatória in vitro e in vivo. / Alessandro Rogério Paulazzi ; orientador, José Vladimir de Oliveira, coorientador, Liz Girardi Müller , 2020.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Cocrystal. 3. Curcumina. 4. Tecnologia Supercrítica. 5. dióxido de carbono supercrítico. I. Oliveira, José Vladimir de. II. Müller , Liz Girardi . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Alessandro Rogério Paulazzi

**Cocrystal de curcumina e n-acetilcisteína: síntese,  
caracterização e atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*.**

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

Dr. Gean Pablo Silva Aguiar

Instituição: Universidade Comunitária da Região de Chapecó

Prof.(a) Dr.(a) Cláudia Sayer

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado a meus pais Dorvalino Paulazzi e Ivanir Odete Bros Paulazzi e meus irmãos Alex Rodrigo Paulazzi e Ronaldo Roberto Paulazzi, e meus amigos que juntos vem me apoiando e ajudando nestes anos, pelo incentivo a educação e por nunca deixar que eu desistisse de meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a meus pais Dorvalino Paulazzi e Ivanir Odete Bros Paulazzi e a meus irmãos Alex Rodrigo Paulazzi e Ronaldo Roberto Paulazzi que nestes dois anos se dedicaram a me apoiar sempre, assim como fizeram por toda minha vida.

Ao professor Dr. José Vladimir de Oliveira pela orientação, por todo ensinamento que me passou, pelas correções e em especial pela motivação que me fez seguir até esta conclusão.

Às Professoras Dr.(as) Liz Girardi Müller e Anna Maria Siebel, que sempre me ajudaram, orientaram, e estiveram presentes quando foi necessário, por todos os ensinamentos, e pela amizade, agradeço muito por ter tido esta oportunidade de ser orientado por vocês.

A todos os meus amigos do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATTESC) e do Laboratório de Tecnologia Ambiental onde tornaram os dias de trabalho alegres e divertidos, e pelo apoio e força nos dias que não foi possível estar no laboratório, agradeço pela amizade.

Às bolsistas de iniciação científica, Bianca De Oliveira Alves e Gabriela Adriany Lisboa Zilli, sua amizade e parceria foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho, que sem o esforço e colaboração não teria chegado até aqui.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia Química, e à todos do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos.

À banca examinadora, pela atenção e valorosas contribuições.

À CNPq, pelo apoio financeiro.

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

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)





## RESUMO

Um dos grandes desafios da indústria farmacêutica é a baixa biodisponibilidade dos novos ingredientes farmacêuticos ativos, sendo que até 90% dos novos medicamentos recebem a classificação BCS II. Neste contexto encontra-se a curcumina, que é um polimorfo hidrofóbico bioativo, e tem sido estudada pelo seu potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, entre outros. Para melhorar a solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de substâncias, várias metodologias podem ser aplicadas. Entre elas, vem recendo destaque, nos últimos anos, a utilização de metodologias utilizando fluido supercrítico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir um cocrystal de curcumina, utilizando n-acetilcisteína como coformador, através da metodologia de gás antissolvente, empregando dióxido de carbono supercrítico como antissolvente, e avaliar a solubilidade do cocrystal, assim como seu potencial antinociceptivo e anti-inflamatório. Para comprovar a formação da forma cristalina, os seguintes testes de caracterização foram realizados: calorimetria exploratória diferencial, difratometria de raios-X de pó e microscopia eletrônica de varredura. A análise de solubilidade e de atividade anti-quimiotóxica também foram realizadas. A partir da comprovação da melhoria na solubilidade e da potencialização da atividade anti-quimiotóxica do cocrystal em relação à curcumina pura, testes *in vivo* foram realizados para avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória: ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético e edema de pata induzido por carragenina em camundongos Swiss machos. Os testes de open field e rota-rod foram realizados no intuito de verificar possíveis efeitos indesejados do cocrystal na integridade da coordenação motora e performance locomotora e exploratória. Os resultados de caracterização demonstram a formação de uma nova estrutura cristalina, comprovando que a formação do cocrystal ocorreu com sucesso. Os resultados do teste de solubilidade demonstram um aumento significativo na solubilidade do cocrystal, em comparação a curcumina pura. No ensaio de quimiotaxia, o cocrystal inibiu a migração de neutrófilos em todas as concentrações testadas, diferentemente da curcumina e do coformador quando testados isoladamente. Os testes *in vivo* demonstraram que o cocrystal teve uma potencialização da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória quando comparado à curcumina pura, visto que a dose efetiva do cocrystal foi 166,67 vezes menor que a dose efetiva de curcumina pura. O cocrystal não demonstrou efeitos negativos na coordenação motora e performance locomotora e exploratória. Possivelmente, devido ao aumento da solubilidade do cocrystal em água e diferentes pHs, houve favorecimento da absorção da curcumina no trato gastrointestinal e, assim, aumento de sua biodisponibilidade e potência farmacológica.

**Palavras-chave:** Cocrystal. Curcumina. Tecnologia Supercrítica. CO<sub>2</sub> supercrítico.

## ABSTRACT

One of the major challenges faced by the pharmaceutical industry is the low bioavailability of new active pharmaceutical ingredients. It is known that up to 90% of new drugs are included in the BCS II classification. In this context, curcumin, which is a bioactive hydrophobic polymorph, belongs to BCS class II. Curcumin has been studied on its antinociceptive and anti-inflammatory potential, among others. To improve the solubility and, consequently, the bioavailability of substances, several methodologies can be applied. Among them, the use of methodologies using supercritical fluid has been highlighted in recent years. Thus, the aim of this work was to produce a curcumin cocrystal, using n-acetylcysteine as coformer, by the anti-solvent gas methodology, using supercritical carbon dioxide as an anti-solvent, and to evaluate the cocrystal solubility, as well as its antinociceptive and anti-inflammatory activities. To attest the formation of the crystalline form, the following characterization tests were carried out: differential scanning calorimetry, powder X-ray diffraction and scanning electron microscopy. The analysis of solubility and anti-chemotactic activity were also performed. Based on the evidence of the improvement in solubility and the potentiation of the anti-chemotactic activity of cocrystal in relation to pure curcumin, *in vivo* tests were carried out to evaluate the anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the cocrystal: acetic acid-induced writhing test and carrageenan-induced paw oedema in male Swiss mice. The open field and rota-rod tests were carried out in order to verify possible undesired effects of the cocrystal on the integrity of motor coordination and locomotor and exploratory performance of the animals. The characterization results demonstrate the formation of a new crystalline structure, proving that the formation of the cocrystal successfully occurred. The results of the solubility test demonstrate a significant increase in the solubility of the cocrystal, compared to pure curcumin. In the chemotaxis assay, the cocrystal inhibited the migration of neutrophils at all concentrations tested, unlike pure curcumin and the coformer, when tested isolated. *In vivo* tests demonstrated that the cocrystal presented increased potency in the antinociceptive and anti-inflammatory activity when compared to pure curcumin, since the effective dose of cocrystal was 166.67 times lower than the effective dose of pure curcumin. The cocrystal did not impair the motor coordination and locomotor and exploratory activities of mice. Possibly, due to the increased solubility of the cocrystal in water and different pHs, the absorption of curcumin in the gastrointestinal tract was favored and, thus, its bioavailability and pharmacological potency were improved by the cocrystallization.

**Keywords:** Cocrystal. Curcumin. Supercritical technology. Supercritical CO<sub>2</sub>.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - 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.....	7
Figura 2 - Propriedades biológicas da curcumina.....	8
Figura 3 - Representação dos principais metabólitos da curcumina formados a partir de sua administração por diferentes vias.....	11
Figura 4 - Publicações a respeito de cocristais de 2001 a 2018.....	12
Figura 5 - Diagrama de pressão-temperatura para um componente puro.....	18
Figura 6 - Diagrama esquemático simplificado da técnica GAS.....	19
Figura 8 – Curva de calibração média da curcumina obtida por espectrofotometria UV.....	48

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Propriedades dos formadores do cocrystal.....	25
---	----

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Classificação da biodisponibilidade de acordo com a BCS.....	15
Tabela 2 - Propriedades críticas de alguns compostos.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

scCO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono supercrítico

BSC – *Biopharmaceutics Classification System* (sistema de classificação biofarmacêutica)

DRXP – Difração de raio-X de pó

COX – Enzima ciclooxigenase

Curc – Curcumina

DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria diferencial de varredura)

GAS – *Gas antisolvent* (Gás antissolvente)

Nac – N-acetilcisteína

$p_c$  – Pressão crítica

SAS – Supercritical Antisolvent (Antissolvente supercrítico)

SEDS – Solution Enhanced Dispersion of Supercritical Fluids (Dispersão em solução melhorada por fluídos supercríticos)

SEM – *Scanning Electron Microscopy* (Microscopia Eletrônica de Varredura)

T<sub>c</sub> – Temperatura crítica

AINES – Anti-inflamatórios não-esteroides

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1      OBJETIVOS .....	3
1.1.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>3</b>
1.1.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>3</b>
1.2      ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	4
1.2.1 <b>Capítulo 1 – introdução</b> .....	<b>4</b>
1.2.2 <b>Capítulo 2 – Revisão bibliográfica</b> .....	<b>5</b>
1.2.3 <b>Capítulo 3 – Materiais e métodos</b> .....	<b>5</b>
1.2.4 <b>Capítulo 4 – Resultados</b> .....	<b>5</b>
1.2.5 <b>Capítulo 5 – Conclusões e sugestões</b> .....	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b> <b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>6</b>
2.1      CURCUMA .....	6
2.2      CURCUMINA .....	7
2.2.1 <b>Características físico químicas</b> .....	<b>7</b>
2.2.2 <b>Atividade anti-inflamatória</b> .....	<b>8</b>
2.2.2.1 <i>Inflamação</i> .....	8
2.2.3 <b>Curcumina como anti-inflamatório</b> .....	<b>10</b>
2.2.4 <b>Propriedades farmacocinéticas da curcumina e a melhoria da biodisponibilidade</b> .....	<b>11</b>
2.3      COCRISTAIS .....	13
2.3.1 <b>Definições de co cristal</b> .....	<b>14</b>
2.3.2 <b>Propriedades físico químicas</b> .....	<b>14</b>
2.3.2.1 <i>Ponto de fusão</i> .....	15
2.3.2.2 <i>Solubilidade</i> .....	15

2.3.2.3	<i>Biodisponibilidade</i> .....	16
<b>2.3.3</b>	<b>Produção de cocristais</b> .....	<b>17</b>
2.3.3.1	<i>Métodos de obtenção de cocristais</i> .....	18
2.3.3.2	<i>Tecnologia por fluidos supercríticos</i> .....	18
<b>2.3.4</b>	<b>Dióxido de carbono supercrítico</b> .....	<b>20</b>
2.3.4.1	<i>Técnicas utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico como antissolvente</i> .....	21
2.4	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS COCRISTAIS</b> .....	22
<b>2.4.1</b>	<b>Calorimetria diferencial de varredura</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Difração de Raios X pelo método do pó</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)</b> .....	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	.....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1	MATERIAIS.....	26
<b>3.1.1</b>	<b>Produção do cocrystal</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Aplicação do cocrystal</b> .....	<b>26</b>
3.2	MÉTODOS.....	26
<b>3.2.1</b>	<b>Produção de cocristais por tecnologia supercrítica</b> .....	<b>27</b>
3.2.1.1	<i>Unidade experimental</i> .....	27
3.2.1.2	<i>Técnica de gás antissolvente (GAS)</i> .....	29
3.3	METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO DO COCRISTAL.....	30
<b>3.3.1</b>	<b>Difração de Raios X pelo método do pó</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Análise térmica</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura (SEM)</b> .....	<b>31</b>
3.4	Estudo <i>in vitro</i> .....	31
<b>3.4.1</b>	<b>Estudo de solubilidade</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4.2</b>	<b>ATIVIDADE ANTI-QUIMIOTÁXICA <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>32</b>
3.5	Estudos <i>in vivo</i> .....	32
<b>3.5.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>32</b>



3.5.2	Avaliação da atividade antinociceptiva do cocrystal pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos .....	33
3.5.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória pelo método de edema da pata induzido por carragenina.....	34
3.5.4	Avaliação da coordenação motora no teste de rota-rod.....	35
3.5.5	Avaliação da atividade locomotora/exploratória no teste de open field .....	36
3.6	Estudo <i>ex vivo</i> .....	36
3.6.1	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase .....	36
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>CAPÍTULO 4.....</b>		<b>38</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>Abstract</b>	<b>39</b>	
4.1	Introduction.....	39
4.2	Materials and methods .....	41
<b>4.2.1</b>	<b>Materials .....</b>	<b>41</b>
4.3	<i>Synthesis of cocrystals</i> .....	42
<b>4.3.1</b>	<b>Production of co-crystals by anti-solvent gas method.....</b>	<b>42</b>
4.4	Thermal analysis.....	42
4.5	Powder X-ray diffraction.....	42
4.6	Scanning electron microscopy.....	43
4.7	Solubility study.....	43
4.8	Antichemotactic assay in vitro.....	43
4.9	<i>In vivo experiments</i> .....	44
<b>4.9.1</b>	<b>Animals .....</b>	<b>44</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Treatments.....</b>	<b>44</b>
<b>4.9.3</b>	<b>Acetic acid-induced abdominal writhing test.....</b>	<b>45</b>
<b>4.9.4</b>	<b>Carrageenan-induced paw oedema test.....</b>	<b>45</b>

4.9.5	Myeloperoxidase (MPO) activity.....	46
4.9.6	Open field test .....	46
4.9.7	Rota-rod test.....	47
4.9.8	Statistical analysis.....	47
4.10	Results and Discussion .....	47
4.10.1	Thermal analysis.....	48
4.10.2	X-ray crystallography .....	49
4.10.3	Scanning electron microscopy .....	50
4.10.4	Solubility study .....	51
4.10.5	Antichemotactic activity in vitro .....	52
4.10.6	Acetic acid-induced abdominal writhing test.....	54
4.10.7	Carrageenan-induced paw oedema test.....	55
4.10.8	Myeloperoxidase activity.....	57
4.10.9	Locomotor and exploratory activities and motor coordination .....	59
4.11	Conclusions .....	61
4.12	References.....	62
<b>CAPÍTULO 5.....</b>		<b>68</b>
5	<b>Conclusão e sugestões .....</b>	<b>68</b>
5.1	Conclusão .....	68
5.2	Sugestões .....	68
<b>REFERÊNCIAS .....</b>		<b>69</b>

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da indústria farmacêutica é a baixa solubilidade e/ou baixa permeabilidade de novos ingredientes farmacêuticos ativos (API), o que dificulta ou impossibilita sua utilização como um novo fármaco/medicamento. A biodisponibilidade dos fármacos está ligada à solubilidade e permeabilidade, sendo um fator chave para obter efeitos benéficos de compostos bioativos. Até 90% dos novos fármacos recebem a classificação BCS II, ou seja, são substâncias que apresentam baixa solubilidade em água e alta permeabilidade (KAVANAGH et al., 2019; RIBAS et al., 2019; HOMAYOUNI et al., 2019)

Neste contexto, encontra-se a curcumina, um polifenol denominado 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, que existe do também na forma tautomérica enol, e é o principal polifenol natural encontrado no rizoma de *Curcuma longa* (açafrão). Foi demonstrado que a curcumina possui propriedades sobre a síndrome metabólica (KELANY; HAKAMI; OMAR, 2017), antidiabéticas (TAVAF et al., 2020), antimutagênicas (PARVATHY; NEGI; SRINIVAS, 2010), antibacterianas (SINGH et al., 2010), anti-HIV (SHARMA et al., 2019), antinociceptivas (ZHAO et al., 2012), antioxidantes (KHARAT et al., 2020) e anti-inflamatórias (SORASITTHIYANUKARN et al., 2019). Encontra-se na classificação BCS II, e, portanto, tem sua solubilidade em água abaixo de 0,6 µg / mL. (KURIEN et al., 2007; (HEWLINGS; KALMAN, 2017).

A inflamação é a resposta fisiológica adaptativa desencadeada pelo sistema imunológico, inclui uma longa cadeia de reações moleculares e atividade celular, sendo o único mecanismo identificado para restauração de tecido após lesão (HE et al., 2015). É caracterizada por um conjunto de reações que ocasionam diversos eventos vasculares, como vasodilatação, acúmulo de leucócitos e líquidos intersticiais, sensibilização de terminais nociceptivos, além de eventos celulares, como síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como cininas, óxido nítrico e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (ILs), como IL-1 $\beta$  e IL-6, que são ativadas pelo fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) para defesa do organismo contra estímulos nocivos, que podem ser endógenos ou exógenos (NENNIG; SCHANK, 2017; OLIVEIRA-TINTINO, 2018).

Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da curcumina são observados pela modulação de múltiplas vias de sinalização, como proteínas envolvidas na replicação e

sobrevivência molecular, fatores de transcrição (como NF- $\kappa$ B) e citocinas inflamatórias (LELLI et al., 2017). A inibição da ligação NF- $\kappa$ B-DNA leva à supressão da expressão de genes pró-inflamatórios, além disso, o efeitos anti-inflamatórios da curcumina estendem-se à redução da expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2), que é responsável pela conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas. Também, inibe a atividade da araquidonato 5-lipoxigenase (5-LOX) e a síntese de leucotrienos (GOEL; BOLAND; CHAUHAN, 2001; LIU; SMART; PANNALA, 2020). Apesar da atividade biológica promissora, a curcumina é pouco absorvida e rapidamente metabolizada depois de administrada oralmente, o que a torna pouco biodisponível e dificulta o alcance dos efeitos farmacológicos, devido às baixas concentrações plasmáticas e teciduais. Assim, seu uso como agente terapêutico eficaz é limitado por seus parâmetros farmacocinéticos (SINJARI et al., 2019; ROCHA et al., 2020).

Para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de substâncias, diversas técnicas vêm sendo empregadas, entre elas a cocristalização, que surgiu como uma nova maneira de melhorar a solubilidade e a taxa de dissolução de APIs fracamente solúveis (SHEKHAWAT; POKHARKAR, 2017). A cocristalização pode ser definida como um sistema multicomponente que contém um API e um coformador numa proporção estequiométrica específica que estão ligados através de interações intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio, ligações  $\pi - \pi$  e forças de Van der Waals (REN et al., 2019).

A cocristalização representa uma maneira conveniente de alterar as propriedades físico-químicas dos APIs, incluindo taxa de dissolução, solubilidade intrínseca, ponto de fusão, higroscopicidade e compressibilidade (DOUROUMIS; ROSS; NOKHODCHI, 2017). A estrutura básica que une API ao coformador é denominada sinton supramolecular. Estes sintons supramoleculares são arranjos especiais de interações intermoleculares, que podem ser formados por operações viáveis conhecidas (DESIRAJU, 1995).

A tecnologia de fluido supercrítico ou gás denso é um campo emergente e promissor no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e tem sido explorada como um método alternativo para produzir cocristais de alta qualidade (RODRIGUES et al., 2018), sobretudo quando utilizado dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) que tem condições críticas relativamente baixas ( $T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $p_c = 73,8 \text{ bar}$ ), que podem ser facilmente atingidas (COCERO et al., 2009).

Para tal pesquisa, o laboratório de termodinâmica e tecnologia supercrítica (LATESC), está equipado para prover todo equipamento necessário para o desenvolvimento dos processos de produção do cocristal. Destaca-se que nos últimos anos teses de mestrado e doutorado forma desenvolvidas na área de cocristalização, onde são aplicadas diversas

técnicas utilizando scCO<sub>2</sub> para produção de cocristais. Entre os artigos publicados pelo laboratório se destaca para esta pesquisa os seguintes: Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent, (Pessoa et al. 2019) proveniente dos seu trabalho de doutorado, Curcumin cocrystals using supercritical fluid technology (Ribas et al. 2019) e Curcumin-nicotinamide cocrystallization with supercritical solvent (CSS): Synthesis, characterization and in vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities (Ribas et al. 2019b) Proveniente do seus trabalhos de pesquisa no mestrado.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a produção de cocristais de curcumina e n-acetilcisteína utilizando tecnologia supercrítica através da metodologia de gás antissolvente (GAS), com scCO<sub>2</sub> como antissolvente, visando aumentar a solubilidade da curcumina em água e em diferentes pHs, o que pode potencializar as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias *in vivo*. Após a produção, o cocrystal foi caracterizado por calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raio-X de pó (DRXP) e microscopia eletrônica de varredura (SEM). Após a caracterização, foram realizados testes de solubilidade e de atividade antiquimiotóxica *in vitro*, para analisar a solubilidade e o potencial de inibição da migração de neutrófilos, indicador de possível atividade anti-inflamatória. Os cocristais então foram testados *in vivo* com intuito de verificar se o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da curcumina foi aumentado, com uma possível melhoria da biodisponibilidade proveniente da cocrystalização.

## ■ OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo aplicar o cocrystal de curcumina e n-acetilcisteína, produzido através de tecnologia supercrítica e caracterizado, aplicando em modelos *in vivo*, (camundongos: *Mus musculus*; linhagem: Swiss), *in vitro* e *ex vivo*, a fim de avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Produzir um cocrystal de curcumina com o coformador n-acetilcisteína, utilizando técnica de Gás Antissolvente (GAS);
- Verificar a formação de cocrystal através de diferentes métodos de caracterização, calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raio-X de pó (DRXP);
- Realizar a análise morfológica e de tamanho de partículas do cocrystal formado, a partir de microscopia eletrônica de varredura (SEM);
- Avaliar o perfil de dissolução do cocrystal, através da comparação do espectro do cocrystal e curcumina pura por espectroscopia de ultravioleta;
- Mensurar o potencial de inibição da migração de neutrófilos do cocrystal e compará-lo com o efeito da curcumina pura e do coformador, através do teste de atividade anti-quimiotática *in vitro*.
- Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do cocrystal, a partir dos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e edema de pata induzido por carragenina, *in vivo*, comparando a atividade do cocrystal com curcumina pura, coformador e mistura física de curcumina e coformador.
- Avaliar o efeito do cocrystal sobre a atividade de Mieloperoxidase (MPO), *ex vivo*, no tecido plantar de camundongos após a administração de carragenina, comparando a atividade do cocrystal com curcumina pura, coformador e mistura física de curcumina e coformador
- Avaliar os efeitos motores adversos do cocrystal no teste de campo aberto e barra rotativa, de modo a descartar possíveis resultados falsos positivos nos testes de nocicepção *in vivo*.

## ■ ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Este documento está estruturado em 5 capítulos

### 1.2.1 Capítulo 1 – introdução

Este capítulo apresenta uma breve descrição dos tópicos abordados no presente trabalho, apresentação dos objetivos e da estrutura do projeto desenvolvido.

### **1.2.2 Capítulo 2 – Revisão bibliográfica**

Apresentação de uma revisão da literatura sobre a curcumina, cocristais e a metodologia utilizada para produção do cocrystal.

### **1.2.3 Capítulo 3 – Materiais e métodos**

Apresentação dos materiais utilizados e das metodologias empregadas neste estudo, incluindo a descrição do equipamento utilizado nos processos

### **1.2.4 Capítulo 4 – Resultados**

A apresentação dos resultados encontra-se feita no formato de artigo, o qual foi submetido à revista *Acta Pharmaceutica Sinica B*.

### **1.2.5 Capítulo 5 – Conclusões e sugestões**

Apresentação da conclusão geral sobre o trabalho e sugestões para trabalhos futuros.

## CAPÍTULO 2

### **2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

Neste capítulo, será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o tema da dissertação. Nela contêm dados de trabalhos científicos que embasam esta pesquisa. Inicialmente, será apresentada uma revisão sobre a substância alvo deste trabalho, a curcumina, detalhando suas características e dando motivos para sua utilização na produção de cocristais por tecnologia supercrítica.

Então, será relatado o que é um cocristal, como são produzidos por métodos supercríticos, de forma a embasar a metodologia utilizada para produção.

#### ■ CURCUMA

A *Curcuma longa*, conhecida como açafrão ou açafrão da terra é uma das plantas pertencentes à família *Zingiberaceae*. Faz parte da antiga medicina tradicional chinesa e indiana, e tem sido amplamente utilizada como conservante de alimentos e na culinária do todo sudoeste da Ásia. É utilizada há muitos anos no tratamento de diversas doenças devido às suas propriedades farmacológicas. Sua composição contém 8,6% de proteína, 60 a 70% de carboidratos, 2 a 7% de fibra, 5 a 10% de gordura, 3 a 5% de curcuminoides e até 5% de óleos essenciais e resinas. Os curcuminoides consistem em quase 70% de curcumina, 17% de desmetoxicurcumina, 3% de bis-desmetoxicurcumina e o restante (10%) é chamado de ciclocurcumina. Assim, seu principal componente é a curcumina, um composto fitoquímico hidrofóbico polifenólico (KURIEN et al., 2007; HEWLINGS; KALMAN, 2017).



## CURCUMINA

### 2.2.1 Características físico químicas

A curcumina é um composto cristalino de cor característica amarelo-laranja, mas muda em diferentes pHs, formando uma solução de cor amarela brilhante na faixa de pH 2,5–7,0 com a cor mudando para vermelho escuro quando o pH é superior a 7 (LIU et al., 2020). Sua forma molecular é composta por 21 átomos de carbono, 20 átomos de hidrogênio e 6 átomos de oxigênio ( $C_{21}H_{20}O_6$ ), possui massa molecular de 368,37 g / mol e ponto de fusão próximo à 183° C, possuindo dois anéis de arila em suas extremidades e contém grupos *orto*-metoxifenólicos que estão simetricamente ligados a uma porção  $\beta$ -dicetona, coexistindo entre suas duas formas, apresentando tautomerismo nas formas ceto e enol (Figura 1). A forma ceto é predominante em soluções ácidas e neutras e a forma enol estável em meio alcalino. Tem nome químico 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona, também chamado de diferuloilmetano. (KURNIAWANSYAH et al., 2017; SU et al., 2015; HEWLINGS; KALMAN, 2017; KHOR et al., 2019; HOMAYOUNI et al., 2019; AKBARI et. al. 2020).

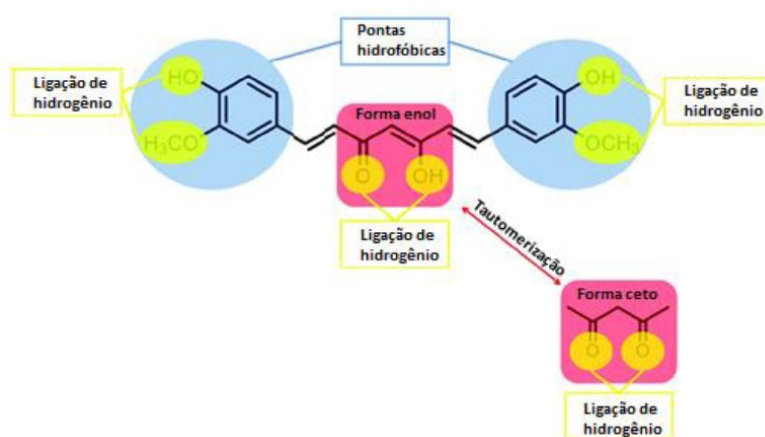


Figura 1 - Representação da molécula de curcumina, apresentando as formas ceto e enol, as regiões de possibilidade de ligação de hidrogênio e as regiões hidrofóbicas da molécula.

Fonte: RIBAS, (2019)

Na literatura estão relatadas as propriedades bioativas da curcumina (ANAND et.al., 2007), como apresentado na Figura 2. Entre essas propriedades, destacam-se o combate a doenças crônicas, como Parkinson (MYTHRI; BHARATH, 2012) e

Alzheimer (HAMAGUCHI; ONO; YAMADA, 2010), atividade antibacteriana (SINGH et al., 2010), anti-mutagênica (SHISHU; KAUR, 2008), antidiabética (TAVAF et al., 2020), (JAVIDI et al., 2019), anti-HIV (SHARMA et al., 2019), antinociceptiva (ZHAO et al., 2012), antioxidante (KHARAT et al., 2020), anti-inflamatória (SORASITTHIYANUKARN et al., 2019), entre outras.

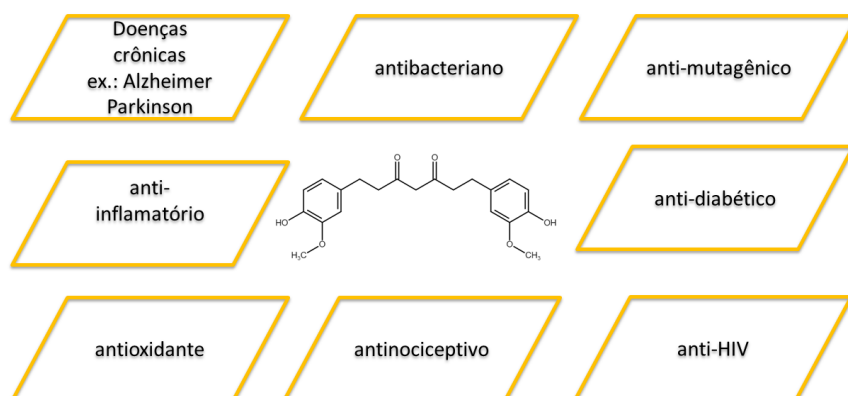


Figura 2 - Propriedades biológicas da curcumina

Fonte: desenvolvido pelo autor.

## 2.2.2 Atividade anti-inflamatória

### 2.2.2.1 Inflamação

Conforme já destacado anteriormente, a curcumina apresenta efeito anti-inflamatório. A inflamação é a resposta fisiológica adaptativa desencadeada pelo sistema imunológico, inclui uma longa cadeia de reações moleculares e atividade celular, sendo o único mecanismo identificado para restauração de tecido após lesão. Em nível celular e tecidual, inclui dilatação das vênulas e arteríolas, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e fluxo sanguíneo, com infiltração de leucócitos nos tecidos. A cronificação do processo inflamatório pode causar uma disfunção do tecido, pela atividade proteolítica. A

regeneração da produção humoral para o crescimento celular e reforma do novo tecido funcional e conjuntivo são observadas por meio de uma resposta inflamatória típica (HE et al., 2015). Além disso, ocorrem eventos como síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como cininas, óxido nítrico e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e interleucinas (ILs), como IL-1 $\beta$  e IL-6, para defesa do organismo contra estímulos nocivos, que podem ser endógenos ou exógenos (OLIVEIRA-TINTINO, 2018).

A inflamação pode ocorrer em dois estágios, dependendo do tempo de duração para atingir sua resolução. O primeiro estágio (inflamação aguda) é medido pela ativação do sistema imunológico (imunidade inata), que persiste apenas por um curto período de tempo, sendo, geralmente, benéfica para o organismo. Quando não se tem a resposta esperada, devido ao acúmulo de proteínas pró-inflamatórias, e provavelmente o resultado de um alto "estado inflamatório" adquirido, a inflamação pode durar mais tempo, iniciando o segundo estágio (inflamação crônica), que pode estar relacionado com várias doenças crônicas, entre elas, obesidade, diabetes, artrite, pancreatite, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e metabólicas (ARULSELVAN et al., 2016; WATSON et al., 2017)

A resposta inflamatória é coordenada por uma grande variedade de mediadores que formam redes regulatórias complexas. Uma resposta inflamatória aguda bem-sucedida resulta na eliminação dos agentes infecciosos, seguida por uma fase de resolução e reparo, que é mediada principalmente por macrófagos residentes em tecidos e recrutados. A mudança nos mediadores lipídicos das prostaglandinas pró-inflamatórias para as lipoxinas, que são anti-inflamatórias, é crucial para a transição da inflamação para a resolução. As lipoxinas, responsáveis por inibir o recrutamento de neutrófilos, promovem o recrutamento de monócitos, que removem as células mortas e iniciam a remodelação do tecido. Resolvinas e protectinas, que constituem outra classe de mediadores lipídicos, assim como o fator de crescimento transformador- $\beta$  e os fatores de crescimento produzidos pelos macrófagos, também têm um papel crucial na resolução da inflamação, incluindo o início da reparação tecidual (MEDZHITOV, 2008).

Um fator de transcrição ubíquo bem conhecido por seu papel na resposta imune é o fator nuclear kappa de células B ativadas (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B é um ativador transcricional de mediadores inflamatórios, como as citocinas (NENNIG; SCHANK, 2017). Em resposta ao estresse físico, fisiológico ou oxidativo, está associada a ativação da via de sinalização canônica do NF- $\kappa$ B, que é conservada em todos os animais multicelulares. A ativação do NF-

$\kappa$ B geralmente resulta na regulação positiva de genes antiapoptóticos, proporcionando, assim, mecanismo de sobrevivência celular para suportar o estresse fisiológico que desencadeou a resposta inflamatória. Além disso, o NF- $\kappa$ B induz citocinas que regulam a resposta imune (como, IL-1, IL-6 e IL-8) e o TNF- $\alpha$ , bem como moléculas de adesão, que levam ao recrutamento de leucócitos para locais de inflamação (HOESEL; SCHMID, 2013).

Os marcadores citosólicos da resposta inflamatória, são os membros da família de receptores IL-1. Este domínio está envolvido na resposta funcional, parte fundamental da imunidade inata. Adicionalmente, entre a família de proteínas das citocinas, a interleucina-6 (IL-6) é outro marcador de inflamação comum. IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que, em conjunto com outros indicadores, tem sido usada em uma ampla variedade de estudos de imagem para avaliar a presença e extensão de processos inflamatórios (WATSON et al., 2017).

Os anti-inflamatórios e analgésicos mais utilizados no tratamento de inflamação e dor leve e moderada são os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs). O mecanismo de ação está associado a inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que pode ser encontrada em duas isoformas, chamadas de ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). (DAVIES *et al.*, 2004; RANG, 2012). A COX-1 é uma enzima essencial fisiológica ou constitutiva, presente na maioria das células e tecidos como é o caso do endotélio, monócitos, plaquetas, tubos coletores renais ou nas vesículas seminais (RAO; KNAUS, 2008). Essa enzima é relacionada a inúmeras funções fisiológicas, modulando a formação de secreções gástricas protetoras e desempenhando uma função homeostática. A enzima COX-2, por sua vez, é induzida pelo processo inflamatório e responsável pela produção de prostaglandinas, que estão relacionadas aos sintomas clássicos como dor, edema, rubor e febre (RAO; KNAUS, 2008). A absorção desses fármacos é quase completa pelo intestino. No entanto, os AINEs possuem efeitos adversos podendo levar a um espectro de gastropatia, incluindo dispepsia, gastrotoxicidade, lesão e hemorragia subepitelial, erosão da mucosa gástrica, ulceração franca e necrose da mucosa gástrica (RANG, 2012; GOLAN, 2014). Desta forma, o estudo de candidatos à fármacos com mecanismos diferentes de ação e menor toxicidade é importante para o tratamento de processos inflamatórios.

### 2.2.3 Curcumina como anti-inflamatório

A curcumina tem demonstrado ser uma substância farmacodinamicamente pleiotrópica (é efetiva sobre muitos alvos farmacológicos), mas com potencial farmacocineticamente fraco (não atinge seus alvos específicos) (NELSON et al., 2017). Este

fato está associado à baixa absorção, rápida metabolização e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade, o que limita seu uso como agente terapêutico eficaz, dificultando que o efeitos farmacológicos possam ser alcançados, devido a baixas concentrações plasmáticas e teciduais (SINJARI et al., 2019; ROCHA et al., 2020).

Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da curcumina são observados pela modulação de múltiplas vias de sinalização, como proteínas envolvidas na replicação e sobrevivência molecular, fatores de transcrição (como o NF- $\kappa$ B) e citocinas inflamatórias (como TNF- $\alpha$ , IL-6 e Proteína Inflamatória de Macrófago 2 (MIP2) (LELLI et. al. 2019; KHOR et al., 2019). Destaca-se o efeito associado à sua capacidade de inibir a ligação do NF- $\kappa$ B ao DNA. A inibição da ligação NF- $\kappa$ B-DNA leva à supressão da expressão de moléculas pró-inflamatórias, como a metaloprotease da matriz 3 (MMP-3) e metaloprotease da matriz 9 (MMP-9). Essa inibição resulta também na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. Além disso, os efeitos anti-inflamatórios da curcumina estendem-se à inibição da expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2), responsável por catalisar a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas. Também, inibe a atividade da araquidonato 5-lipoxigenase (5-LOX) e a síntese de leucotrienos (GOEL; BOLAND; CHAUHAN, 2001; LIU; SMART; PANNALA, 2020).

Segundo JOBIN et al., (1999), a curcumina inibe a expressão gênica de ICAM-1 e IL-8, mediada por IL-1 $\beta$ , em células IEC-6, HT-29 e Caco-2, bloqueando a atividade de ligação ao DNA de NF- $\kappa$ B induzida por citocina, translocação nuclear RelA, degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , fosforilação de serina 32 de I $\kappa$ B e atividade de quinase I $\kappa$ B (IKK).

#### **2.2.4 Propriedades farmacocinéticas da curcumina e a melhoria da biodisponibilidade**

A administração da curcumina em estudos *in vivo* é feita de diversas formas, entre elas estão injeção intravenosa (i.v.), administração intranasal, administração tópica, distribuição subcutânea, administração intraperitoneal (i.p.) e administração oral (v.o.) (PRASAD; AGGARWAL, 2014).

Sua reduzida solubilidade em água faz com que ela seja pouco absorvida, e a presença de sítios lábeis ao metabolismo faz com que a mesma sofra metabolismo hepático de

primeira passagem, sendo agravada pelo fato de seus metabólitos serem inativos. O tipo de metabolismo envolvido está diretamente ligado à via de administração da curcumina. Administrações por via parenteral, como i.p. ou i.v., geram preferencialmente metabólitos de redução, como tetraidrocurcumina e hexaidrocurcuminol, enquanto a administração oral leva à formação direta de metabólitos de fase 2, como conjugação com ácido glicurônico e/ou com sulfato (SUETH-SANTIAGO et al., 2015), como demonstrado na Figura 3.

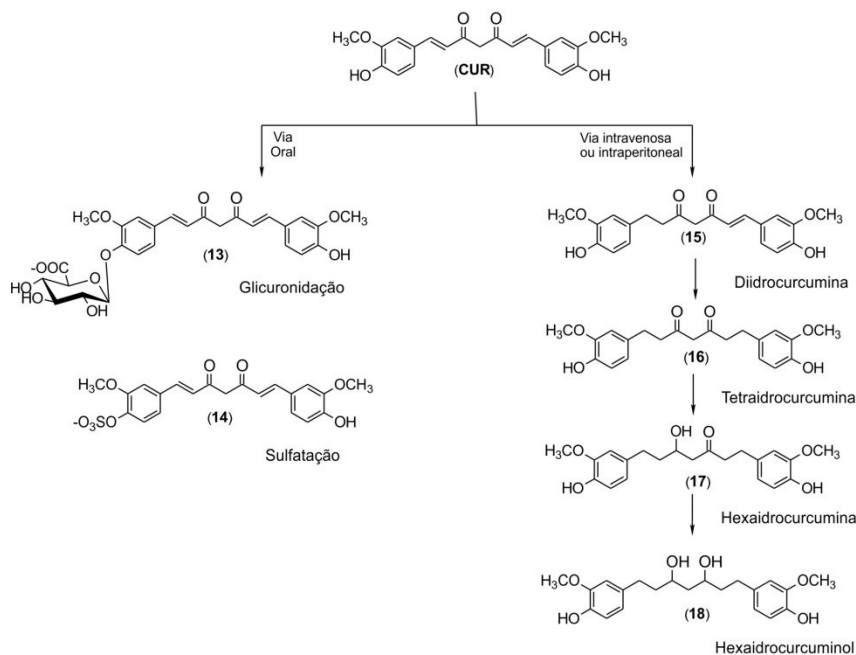


Figura 3 - Representação dos principais metabólitos da curcumina formados a partir de sua administração por diferentes vias.

Fonte: SUETH-SANTIAGO et al. (2015)

Por ser mais econômico, estável e fácil para a administração, a maioria dos produtos farmacêuticos modernos é fornecida a pacientes no estado sólido (comprimidos, cápsulas, pós) (SHAIKH et al., 2018).

Diversas técnicas para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade da curcumina vêm sendo empregadas. Entre elas, pode-se citar: adição de adjuvantes como piperina, inibindo a enzima UDP-glicuroniltransferase no fígado, limitando assim a extensão da glicuronidação da curcumina; produção de nanopartículas, lipossomas, micelas e complexos fosfolipídicos; nano e microemulsões; dispersão sólida; administração concomitante com

lecitina, quercitina, genistina, eugenol e terpinol (WANG et al., 1997; ANAND et al., 2007; ANTONY et al., 2008; LIU et al. 2020).

Entre os métodos mais utilizados para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de um API pouco solúvel em água, destaca-se a formação de sais. Para compostos ionizáveis (aniônicos ou catiônicos), a formação de sal é a estratégia mais barata e simples para melhorar a solubilidade com extrema pureza, capacidade de fabricação (propriedade de fluxo) e estabilidade (SHEKHAWAT; POKHARKAR, 2017). Este método, porém, não pode ser utilizado em moléculas como a curcumina, que não possuem grupos apropriados para ionização, assim não sendo possível a formação de sal (SATHISARAN; DALVI, 2017).

Com compostos não ionizáveis e com aqueles que apresentam  $pK_a$  em uma faixa onde a formação de sal não é possível, um cocristal farmacêutico é uma boa alternativa. A cocristalização farmacêutica surgiu como uma nova maneira de melhorar a solubilidade e a taxa de dissolução de APIs fracamente solúveis (SHEKHAWAT; POKHARKAR, 2017).

## ■ COCRISTAIS

Os cocristais podem impactar significativamente a indústria farmacêutica devido a sua capacidade de ajustar a estabilidade, solubilidade, taxa de dissolução, biodisponibilidade e propriedades mecânicas do API. Em revisão, KAVANAGH et al. (2019), demonstram o aumento linear do número de artigos publicados e de pedidos de patentes relativos aos cocristais. A Figura 4 demonstra os resultados gerados a partir de pesquisa no banco de dados da Web of Science®.

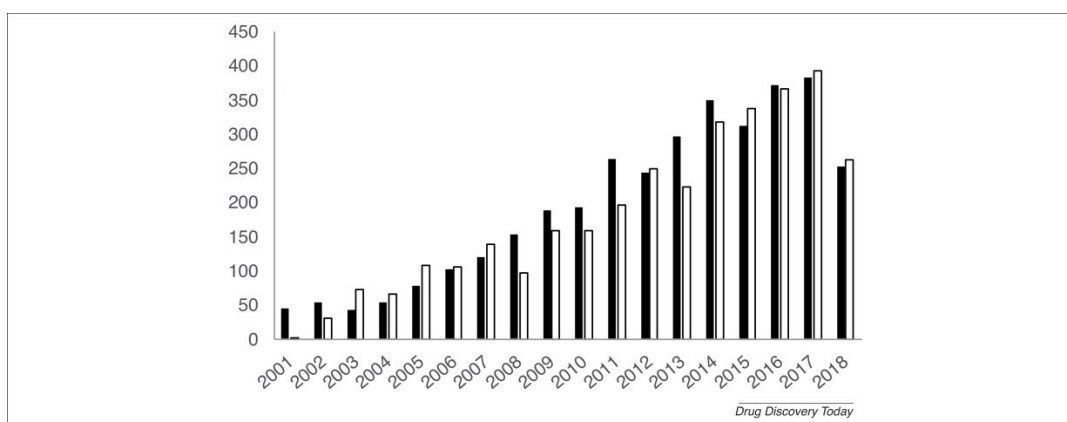


Figura 4 - Publicações a respeito de cocristais entre os anos de 2001 a 2018, geradas a partir de uma pesquisa no banco de dados Web of Science®. As barras pretas representam as

publicações resultantes da pesquisa com os termos 'cocrystal' ou 'co-crystal', e não considerando termos como 'biologia estrutural' e 'base estrutural' (13 de agosto de 2018). As barras brancas representam o número de patentes de cocristais entre os anos de 2001 a 2018, geradas a partir de uma pesquisa no banco de dados do Escritório de Marcas e Patentes dos EUA, utilizando os termos 'cocrystal' e 'co-crystal' (10 de agosto de 2018).

Fonte: KAVANAGH et al., (2019)

### 2.3.1 Definições de cocrystal

Apesar de já serem estudados há muito tempo, os cocristais ainda não tem uma definição bem definida na comunidade científica. UPADHAYA 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 API. REN et al., (2019) definiram como um sistema multicomponente que contém um API e um coformador, em uma proporção estequiométrica específica, que estão ligados através de interações intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio, ligações  $\pi - \pi$  e forças de Van der Waals. SHAIKH et al., (2018) definiram cocrystal farmacêutico como um sistema supramolecular construído com API e uma pequena molécula biocompatível (denominada formador de cocrystal) por meio de forças não covalentes envolvendo ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. KAVANAGH et al., (2019) define, por sua vez, como sólidos que são materiais monofásicos cristalinos compostos de dois ou mais compostos moleculares e / ou iônicos diferentes geralmente em uma razão estequiométrica que não são solvatos nem sais simples.

Dentre todas as definições estabelecidas, de certa forma, a definição mais abrangente é a publicada pelo guia da *Food and Drug Administration* (FDA), em dezembro de 2011, que define cocristais farmacêuticos como materiais sólidos cristalinos compostos de duas ou mais moléculas na mesma rede cristalina.

### 2.3.2 Propriedades físico químicas

A cocrystalização oferece uma maneira conveniente de alterar as propriedades físico-químicas dos APIs, incluindo taxa de dissolução, solubilidade intrínseca, ponto de fusão, higroscopicidade e compressibilidade (DOUROUMIS; ROSS; NOKHODCHI, 2017). Pode,



assim, impactar vários aspectos da farmacocinética do API, incluindo, mas não se limitando, à absorção do fármaco. A diversidade de formas sólidas oferecidas por meio da cocristalização pode facilitar mudanças drásticas na solubilidade e na farmacocinética (SHAN et al., 2014). As principais propriedades analisadas na formação de um cocristal são: ponto de fusão, dissolução e biodisponibilidade.

#### 2.3.2.1 *Ponto de fusão*

O ponto de fusão é uma propriedade física fundamental na caracterização de cocristais, sendo indicado pela temperatura na qual a fase sólida atingiu o equilíbrio com a fase líquida. O ponto de fusão caracteriza-se por ser um processo termodinâmico onde a energia livre de transição é igual a zero, sendo determinado pela relação entre mudança na entalpia de fusão e a variação na entropia de fusão (JAIN; YANG; YALKOWSKY, 2004).

Segundo revisão publicada por SCHULTHEISS E NEWMAN, (2009), onde compararam o ponto de fusão de 50 cocristais com os respectivos pontos de fusão do API e coformador, verificou-se que 51% dos cocristais apresentam pontos de fusão entre os do API e coformador, enquanto que 39% possuem ponto de fusão abaixo do princípio ativo ou coformador. Apenas 6% foram mais elevados e 4% tiveram o mesmo ponto de fusão do API ou do coformador.

#### 2.3.2.2 *Solubilidade*

Muitos APIs atualmente em desenvolvimento de pré-formulação enfrentam o sério problema de baixa solubilidade aquosa, tendo classificação BCS II e IV, ou seja, apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade ou baixa solubilidade e permeabilidade, respectivamente (SHAIKH et al., 2018).

A definição de solubilidade se estabelece pelo equilíbrio termodinâmico de um soluto entre a fase sólida e a fase em solução líquida. A solubilidade dos cocristais pode ser determinada pela solubilidade de equilíbrio e pela solubilidade cinética, onde as medições de equilíbrio termodinâmico fornecem informações dos processos de solubilização do cocristal, enquanto os estudos cinéticos fornecem informações sobre as escalas de tempo dos processos

dinâmicos e flutuações de concentração durante a dissolução do cocrystal (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009)

Na formação de um cocrystal, pode-se ajustar as propriedades físicas, exercendo um controle sobre a montagem supramolecular, pois não envolve formação ou quebra de ligações covalentes, assim a estrutura cristalina determina as propriedades físicas resultantes do composto formado. Dessa forma, se puder ser incorporado um API em uma rede de sólidos cristalinos caracterizados por uma consistência estrutural considerável, pode-se ajustar os pontos de fusão e a solubilidade aquosa da substância (AAKEROY et. al. 2009).

### 2.3.2.3 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade de um API depende principalmente de sua taxa de dissolução (fator cinético) e solubilidade (fator termodinâmico) nos fluídos gástricos e intestinais e a sua permeabilidade nas membranas celulares. O sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) divide os APIs em 4 classes distintas, baseado em sua solubilidade e permeabilidade (Tabela 1). Como faz parte da classe II, a curcumina caracteriza-se por ter baixa solubilidade e alta permeabilidade, sendo ideal para utilização como composto ativo para realizar a cocrystalização, visando aumentar a solubilidade (AMIDON et al., 1995). Os cocrystalis farmacêuticos podem causar supersaturação em relação ao fármaco original menos solúvel, assim é desejado que estudo termodinâmico e cinético sejam realizados durante seu desenvolvimento (AMIDON et al., 1995; SHAIKH et. al. 2018).

Tabela 1: Classificação da biodisponibilidade de acordo com a BCS.

<b>Classe</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Permeabilidade</b>	<b>Descrição</b>
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 et. al.2008.

### 2.3.3 Produção de cocristais

A formação de um cocrystal envolve a incorporação de um API e um coformador em uma rede cristalina. Cocristais são formados por interações não covalentes, livremente reversíveis e, portanto, a presença de um grupo ionizável não é uma necessidade (WALSH et al., 2018). A seleção do coformador, uma parte vital do processo design para cocristais, geralmente é feita com base nas regiões de complementaridade molecular entre ele e o API, pois é a natureza físico-química do coformador que controla as propriedades da fase de solução do cocrystal. 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).

A estrutura básica que une API ao coformador é denominada sintons supramoleculares, que são arranjos especiais de interações intermoleculares, e podem ser formados por operações viáveis conhecidas (DESIRAJU, 1995). Os sintons supramoleculares dividem-se em dois grupos: homossintons, que consistem em combinações de grupos funcionais semelhantes e, heterossintons, que são compostos por grupos funcionais diferentes, mas complementares (HEMAMALINI et al., 2014).

O desenho de cocristais envolvendo a formação de heterossintons supramoleculares entre o API e o coformador interage certos grupos funcionais como ácido carboxílico com nitrogênio aromático, ácido carboxílico com grupos amida ou álcool, que não são ligados covalentemente. Também podendo ser formado por meio de interações intermoleculares de homossintons, como ácido carboxílico-ácido carboxílico e amida-amida, porém, os heterossintons supramoleculares são estatisticamente mais predominantes em relação aos homossintons e favorecem a formação de cocristais (DOUROUMIS; ROSS; NOKHODCHI, 2017). A particularidade e interesse sobre os cocristais estão principalmente ligados à capacidade de obtenção de novas espécies cristalinas a partir de qualquer molécula, independentemente de ser ácida, básica, com grupos ionizáveis ou não. (UPADHAYA et al., 2011; SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009). As interações envolvidas são interações intermoleculares, como forças de contato de van der Waals, empilhamento  $\pi$ , ligação de hidrogênio, interação eletrostática e ligação de halogênio entre quantidades estequiométricas de várias moléculas (RODRIGUES et al., 2018).

A formação do cocrystal pode ser predita a partir do valor do pKa do ácido e da base. A extensão da transferência de prótons, geralmente dita a formação do cocrystal: se não houver transferência de prótons, pode-se formar um cocrystal; se a transferência for concluída, um sal é formado. Para formar um cocrystal, devemos ter uma diferença menor que 2,7 entre o pKa da base e o pKa do ácido ( $pK_a \text{ base} - pK_a \text{ ácido} < 2,7$ ), enquanto para formar um sal essa diferença deve ser maior que 2,7 (JONES; MOTHERWELL; TRASK, 2006; SEKHON, 2009).

#### 2.3.3.1 *Métodos de obtenção de cocrystalis*

Toda técnica capaz de combinar um API e um ou mais coformadores por meio de interações não covalentes em um processo de cristalização, pode ser considerada uma técnica de cocrystalização (RODRIGUES et al., 2018). Entre os aspectos que devem ser levados em consideração na escolha do método, se encontram a labilidade do coformador, solubilidade, estabilidade, susceptibilidade para formar polimorfos, solvatos ou amorfos, com o API. Além disso, são levadas em consideração questões como escalabilidade do método para aplicação industrial (IZUTSU et al., 2016).

Os métodos de classificação de cocrystalis podem ser definidos pelo uso de solvente, pois as técnicas de cocrystalização são normalmente classificadas em solvente ou sem solvente. Os métodos livres de solventes vêm ganhando interesse na academia e na indústria devido à possibilidade de serem associados aos princípios da química verde (SARKAR; ROHANI, 2015), com destaque para os métodos mecanoquímicos como moagem (TENG et al., 2020) e moagem assistida por líquido (LIN; WU; LIN, 2014). Entre as duas classificações, os métodos mais comuns são baseados em solventes, em particular para aplicações em laboratório (pequena escala) (RODRIGUES et al. 2018). As metodologias com base em solventes incluem técnicas de evaporação lenta (GUERAIN et al., 2020), cocrystalização por adição de antissolvente (OBER; GUPTA, 2012), cocrystalização assistida por ultrassom (RODRIGUES et al., 2020) e tecnologia por fluidos supercríticos (SCF), entre outras.

#### 2.3.3.2 *Tecnologia por fluidos supercríticos*

A tecnologia de fluido supercrítico ou gás denso é um campo emergente e promissor no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e tem sido explorada como um método alternativo para produzir cocrystalis de alta qualidade. O SCF pertence à região crítica, ou seja,

acima do ponto crítico do sistema, esses fluidos exibem propriedades semelhantes a líquido, como alta densidade, e propriedades semelhantes a gás, como baixa viscosidade e alta difusividade, que podem ser alteradas drasticamente com pequenas mudanças na pressão ou temperatura, e ajustadas para dar flexibilidade ao processo e obter produtos com características variadas. (RODRIGUES et al., 2018; MATOS et al., 2019)

Em uma representação de um diagrama de fases de um composto puro qualquer (Figura 5), é possível distinguir as 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. Uma quarta fase é visualizada acima da curva líquido-vapor, está é a região do fluido supercrítico, onde as propriedades de líquido saturado e vapor saturado são iguais (PESSOA, 2018).

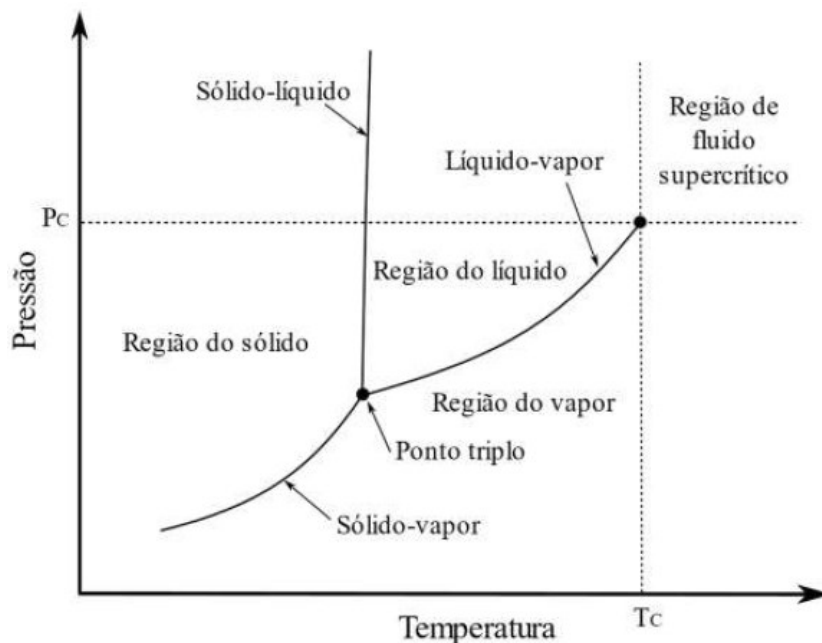


Figura 5 - Diagrama de pressão-temperatura para um componente puro.

Fonte: PESSOA (2018).

A solvatação ocasionada por um fluido supercrítico é dependente da sua massa específica, por sua vez, a massa específica é facilmente ajustada nas regiões próximas ao ponto crítico, onde pequenas variações nos valores de temperatura e pressão críticas aumentam consideravelmente a massa específica do fluido. Dessa forma, o poder de

solvatação de um fluido supercrítico pode ser mais facilmente controlado do que um solvente líquido. Na Tabela 2, encontram-se exemplos da temperatura, pressão e densidade críticas de algumas substâncias. As propriedades dos fluidos supercríticos são interessantes por apresentarem baixa viscosidade e alta difusividade como um gás e massa específica semelhante à de um líquido (RANDOLPH, 1990).

Tabela 2 - Propriedades críticas de alguns compostos.

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

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

Fonte: adaptado de REICHARDT (2006).

#### 2.3.4 Dióxido de carbono supercrítico

O dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) é selecionado para aplicação em cocristalização devido às suas condições críticas relativamente baixas (T<sub>c</sub> = 31,1 ° C e p<sub>c</sub> = 73,8 bar), que podem ser facilmente atingidas. Outro fator importante é a fácil remoção do sistema operacional, que é obtido facilmente, mediante despressurização simples do sistema, evitando adição de processos operacionais, como remoção de solventes residuais. Também é

atóxico, não inflamável e barato. Essas propriedades tornam o  $\text{scCO}_2$  especialmente atraente no campo farmacêutico, pois o processamento de compostos lábeis pode ser feito a baixas temperaturas e na maioria dos casos sem o auxílio de solventes orgânicos, que podem ser facilmente removidos da formulação quando seu uso for necessário. (COCERO et al., 2009; MATOS et al., 2019b).

O  $\text{CO}_2$  tem demonstrado por muito tempo sua capacidade de micronizar compostos orgânicos, mas sua capacidade de modificar a rede cristalina foi investigada mais recentemente. Os processos de formação de partículas envolvendo  $\text{scCO}_2$  são baseados na rápida expansão de solução supercrítica e cristalização de gás antissolvente (MONEGHINI et al., 2003; NEUROHR et al., 2013).

#### *2.3.4.1 Técnicas utilizando $\text{CO}_2$ supercrítico como antissolvente*

Entre as técnicas que utilizam  $\text{scCO}_2$  como antissolvente, as que se destacam são: SAS, SEDS e GAS. Estas técnicas são relativamente parecidas, utilizando-se do mesmo princípio, onde o soluto precisa ser completamente diluído em um solvente orgânico e pouco ou completamente insolúvel no dióxido de carbono supercrítico. Entretanto, para estas técnicas funcionarem com perfeição, é necessário que o solvente possua maior afinidade pelo antissolvente do que pelo soluto. Assim, quando a solução (soluto e solvente) entra em contato com o antissolvente (fluido supercrítico), ocorre uma expansão que diminui o poder de solvatação do solvente orgânico, o que leva à precipitação do soluto em forma de cocristais (FRANCESCHI, 2009).

A técnica de **Antissolvente Supercrítico (SAS)** consiste em bombear  $\text{scCO}_2$  para uma câmara de precipitação até que a pressão operacional seja atingida. A solução contendo coformador e API é então injetada na câmara através de um bico injetor, levando à precipitação do composto. Este processo também é conhecido como Aerosol Solvent Extraction System (ASES) (MATOS et al., 2019b)

A técnica de **dispersão aprimorada por fluidos supercríticos (SEDS)** é caracterizada pela pulverização simultânea da solução líquida através (solvente, API e coformador) de um bico coaxial de três componentes que permite um fluxo turbulento e uma melhor mistura antes que os componentes entrem no vaso de precipitação. Neste caso, o  $\text{scCO}_2$  é utilizado tanto como meio de dispersão, quanto antissolvente, acarretando a precipitação imediata das partículas (YEO; KIRAN, 2005; MATOS et al., 2019a).

Dentre as técnicas utilizando fluidos supercríticos, a técnica de **gas antissolvente (GAS)** é um método muito promissor para preparar dispersões sólidas (PATOMCHAIWIWAT; PAERATAKUL; KULVANICH, 2008). O método GAS origina-se do conhecimento de que a absorção de um gás em um líquido faz com que o líquido se expanda. O ingrediente ativo e o coformador são previamente solubilizados em um solvente orgânico e em seguida são inseridos na câmara de precipitação. A câmara é fechada e pressurizada, levando a expansão da solução. Assim, quando a solução é suficientemente expandida pelo  $\text{scCO}_2$ , a fase líquida não é mais um bom solvente para o soluto e ocorre a precipitação. As vantagens incluem maior rendimento de soluto e flexibilidade de escolha de solvente (JUNG; PERRUT, 2001; MONEGHINI et al., 2003; LONG; RYAN; PADRELA, 2019). O processo GAS permite controlar o tamanho da partícula, distribuição de tamanho, estrutura do cristal e fase do cristal, variando os parâmetros do processo (KIM et al., 2011). Um diagrama esquemático da técnica GAS é apresentado na Figura 6.

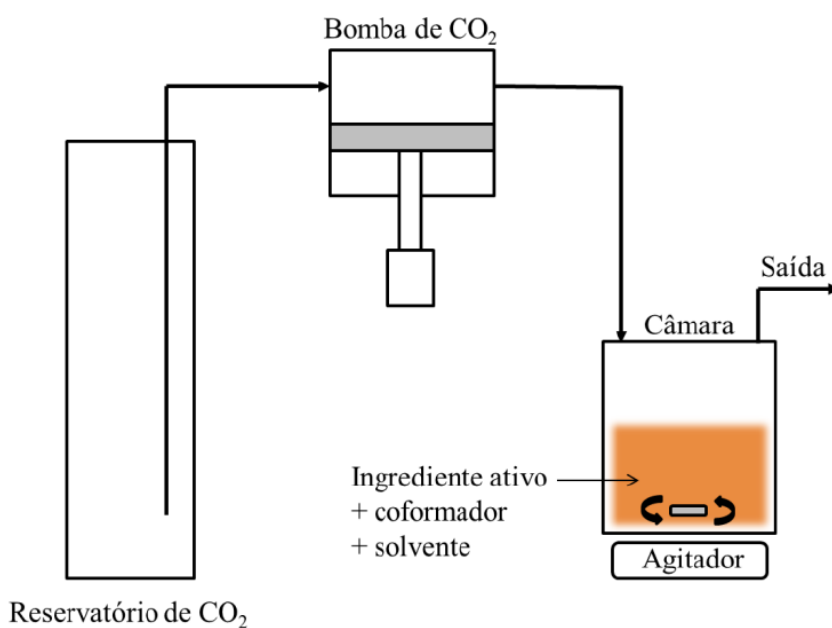


Figura 6 - Diagrama esquemático simplificado da técnica GAS.

Fonte: Adaptado de AGUIAR et. al (2017).

## ■ CARACTERIZAÇÃO DOS COCRISTAIS

O estudo de cocristsais depende da utilização de técnicas adequadas para caracterização da estrutura cristalina desenvolvida no processo, mediante avaliação das suas propriedades físico-químicas e estruturais.



Diversas técnicas podem ser utilizadas para caracterização de cocristais, entre as mais empregadas, destacam-se as seguintes: Difração de Raios X pelo método do pó (DRXP), Difração de Raios X de monocristal (DRXM), Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia Raman, calorimetria diferencial de varredura (DSC), Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) (PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017).

Neste trabalho, foram utilizadas as seguintes técnicas para a caracterização do cocrystal formado: técnicas de calorimetria diferencial de varredura, Difração de Raios X pelo método do pó e Microscopia Eletrônica de Varredura. A seguir são apresentados alguns fundamentos relacionados a cada uma destas técnicas.

#### **2.4.1 Calorimetria diferencial de varredura**

A calorimetria diferencial de varredura é considerada a técnica mais informativa para verificar a formação de um cocrystal, pois registra o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura. A partir da análise de DSC, pode-se observar e comparar se o ponto de fusão do cocrystal é diferente dos compostos iniciais (GOUD et al., 2012). Os eventos térmicos visualizados neste teste estão relacionados a à fusão, dessorção ou redução, quando o evento é endotérmico, e à cristalização, polimerização, oxidação e adsorção, quando o evento é exotérmico. Para se obter a energia necessária para essa transição de fase, a área do pico obtido deve ser integrada (CHIU; PRENNER, 2011).

Existem várias vantagens em utilizar a metodologia de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para verificar se houve a formação de um cocrystal. Entre as vantagens, destacam-se: (a) A triagem de cocrystal pode ser realizada muito rapidamente; (b) A técnica pode ser automatizada, com triagem de alto rendimento; (c) Apenas uma quantidade muito pequena de amostra é necessária; (d) É uma técnica 'verde' sem necessidade de solvente (LU; RODRÍGUEZ-HORNEDO; SURYANARAYANAN, 2008).

### **2.4.2 Difração de Raios X pelo método do pó**

A técnica de difração de Raios X pelo método do pó (DRXP) é uma técnica versátil e muito utilizada para determinação de formas cristalinas, por não ser uma técnica destrutiva e revelar informações detalhadas da composição química e da estrutura cristalográfica de matérias e compostos naturais ou sintetizados. A DRXP é uma técnica baseada na propriedade característica de cada cristal em desviar, em um ângulo específico, a direção dos raios X. Desta forma é possível gerar uma impressão digital única para cada estrutura cristalina através dos ângulos de desvio ou espalhamento da radiação (TREMAYNE, 2004). Este método é muito usado para a caracterização de materiais cristalinos desconhecidos, através de comparação dos dados da difração com os valores de uma base de dados de materiais conhecidos (SHAH et al., 2006).

### **2.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)**

O método de microscopia eletrônica de varredura (SEM) é utilizada para estudar a morfologia e obter micrografias utilizadas na medição do tamanho médio das partículas de cocristais. Estas propriedades influenciam diretamente na taxa de dissolução compressibilidade e fluxo dos pós, desta maneira a utilização do SEM é essencial. (STEELE, 2009). A técnica SEM utiliza de feixes de um feixe de elétrons energéticos para varrer a superfície da amostra, assim, que gerando elétrons secundários espalhados como sinais. Estes sinais são então captados por um software específico e convertido em imagens em tons de cinza (SKOOG et al., 2002).

### CAPÍTULO 3

#### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Nesta parte do trabalho, serão apresentados os materiais e métodos utilizados na produção e caracterização do cocrystal e testes *in vitro* e *in vivo* de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Inicialmente, serão apresentados os materiais formadores do cocrystal em detalhes, informando sua pureza, fórmula química e fabricantes.

Primeiramente será apresentado a metodologia da técnica gás antissolvente e detalhado como a técnica foi empregada. Para isso será descrito as quantidades de solvente, API e coformador e a estequiometria utilizada para que ocorra a formação do cocrystal.

Em seguida, será descrito as metodologias utilizadas para fornecer os dados de caracterização aplicadas para identificação da forma cristalina do cocrystal, incluindo difração de raio X de pó (DRXP), calorimetria diferencial de varredura (DSC), e microscópio eletrônico de varredura (SEM) e estudo de dissolução.

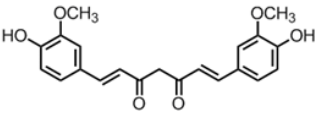
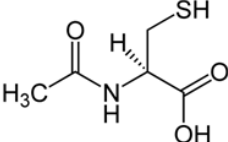
Finalmente, serão descritas as metodologias utilizadas nos testes *in vitro*, para o estudo da atividade antiquimiotóxica e *in vivo*, em camundongos, incluindo testes comportamentais e de ação anti-inflamatória e antinociceptiva, como os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, indução de edema de pata induzido por carragenina e atividade *ex vivo* da enzima mieloperoxidase. Além disso, serão apresentados os testes de rota rod e open field, utilizados para verificação dos efeitos do cocrystal sobre a atividade locomotora e exploratória e integridade da coordenação motora dos animais, respectivamente.

## ■ MATERIAIS

### 3.1.1 Produção do cocrystal

Os componentes formadores do cocrystal, Curcumina com pureza de 95% e N-acetilcisteína (NAC) com pureza de 99,0%, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O quadro 1, abaixo apresenta de forma resumida informações sobre as substâncias.

Quadro 1: Propriedades dos formadores do cocrystal.

Substância	Fórmula molecular	M <sup>a</sup> (g/mol)	S <sup>b</sup> (mg/L)	T.F. <sup>c</sup> (°C)
Curcumina		368,38	3,12	179-182°C
N-acetilcisteína		163.19	200000	109

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

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

Acetona com pureza de 95% foi adquirida da empresa Neon comercial LTDA / SP e o dióxido de carbono (99,9% na fase líquida) foi adquirido na White Martins S.A.

### 3.1.2 Aplicação do cocrystal

Indometacina foi adquirida da empresa Aspen Pharma. Álcool etílico com pureza de 99,5%, foi adquirido da Neon comercial LTDA / SP.

## ■ MÉTODOS

### 3.2.1 Produção de cocristais por tecnologia supercrítica

Nesta seção, serão apresentadas a unidade experimental utilizada para produção do cocrystal e a metodologia empregada neste trabalho.

#### 3.2.1.1 Unidade experimental

A Figura 7 é uma representação da unidade experimental utilizada na precipitação do cocrystal com uso de dióxido de carbono ( $scCO_2$ ), utilizando a técnica de cocrystalização com gas antissolvente (GAS).

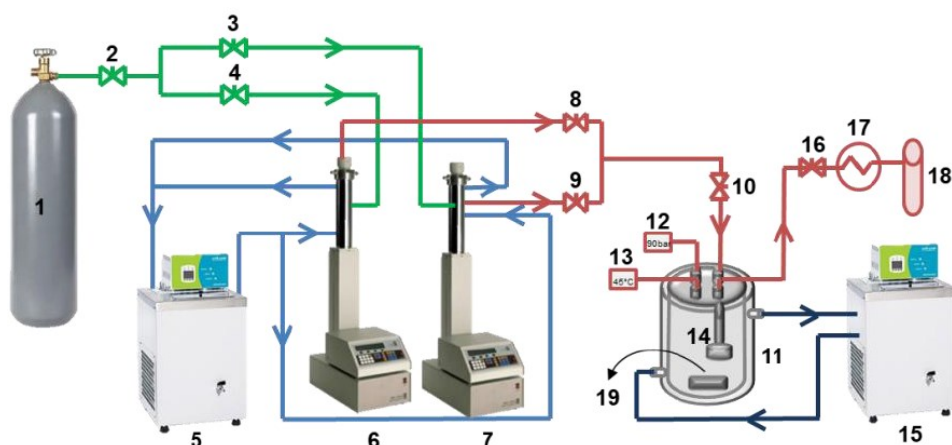


Figura 7- Representação dos componentes da unidade experimental utilizado na técnica GAS para produção do cocrystal

Fonte: RIBAS, (2019)

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 mL.min<sup>-1</sup>). Para CSS é utilizada uma bomba e para GAS duas bombas visando manter o fluxo de CO<sub>2</sub> constante. Por meio das bombas ainda é realizada a pressurização do CO<sub>2</sub> e controle da vazão para dentro da câmara de precipitação;

(8) e (9) Válvulas de esfera que permitem o fluxo de CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>. Utilizada para a retenção das partículas precipitadas no interior da câmara, permitindo apenas o fluxo do CO<sub>2</sub> e do solvente orgânico. Um dos filtros apresenta porosidade de 1 µm, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm servindo de base para o segundo filtro de 0,22 µm de porosidade, 8 mm de diâmetro e 150 µm de espessura. 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 desta válvula é possível controlar o fluxo de liberação do CO<sub>2</sub>;
- (17) Fita de aquecimento (FISATON, modelo 5, 200 W de potência). Utilizada devido ao efeito Joule-Thomson ser pronunciado pela expansão do CO<sub>2</sub> durante a despressurização congelando a linha de liberação. A temperatura utilizada na fita é de 200°C;
- (18) Filtro de segurança recheado com algodão, sendo possível observar o arraste dos princípios ativos se ocorrer;
- (19) Agitador magnético.

### 3.2.1.2 *Técnica de gás antissolvente (GAS)*

Para a produção do cocrystal foram utilizados dados de produção presentes na dissertação de mestrado da autora Marcela M. Ribas intitulado “Produção e caracterização de cocrystalis de curcumina por tecnologia supercrítica”, onde apresenta um estudo da produção de cocrystalis em diferentes metodologias utilizando curcumina, n-acetilcisteína e outros coformadores. Assim, visando obter razão molar de 1:1, curcumina e o coformador (NAC) foram pesados e dissolvidos em 15 mL de solvente em agitação ultrassônica, por 10 minutos, posteriormente foi adicionado à câmara de precipitação.

O procedimento é iniciado com o banho termostático, (5) é acionado 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 CO<sub>2</sub>, que foram então pressurizadas a 200 bar. A câmara de precipitação é montada com suas demais conexões 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 CO<sub>2</sub> até atingir a pressão utilizada durante o experimento (90 bar). Assim que a pressão desejada é atingida, a válvula 8 então é fechada e o tempo reacional é contado (10 min). Após o tempo decorrido, as

válvulas 9 e 16 são abertas permitindo fluxo contínuo de CO<sub>2</sub>, durante 50 minutos, mantendo a câmara na pressão reacional bar, fazendo o CO<sub>2</sub> agir como gás antissolvente. 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 atmosférica.

Assim que terminada a despressurização, as amostras são coletadas da câmara e armazenadas em franco âmbar, protegidas da luz, para posterior caracterização e demais análises.

## ■ METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO DO COCRISTAL

Nesta seção, serão apresentadas as metodologias utilizadas para caracterização do cocrystal. Entre elas, encontram-se DRXP, DSC e SEM.

### 3.3.1 Difração de Raios X pelo método do pó

A determinação da estrutura de pequenas moléculas pode ser alcançada através de métodos bem estabelecidos de difração de raios-X em pó (DRXP) (SARDO et al., 2015).

A estrutura cristalina foi analisada por difratogramas de raio X em pó (DRXP) na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das missões em um equipamento Rigaku MiniFlex II Desktop X-Ray Diffraktometer, utilizando radiação CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). Operando a voltagem de 30,0 KV, corrente de 15,0 mA e velocidade de varredura de 5° / min e 0,05 de passo. Utilizou-se ângulo de 2 $\theta$  (5 a 40°) (LOPES et al., 2013; RIBAS et al., 2019).

As análises foram realizadas na Central de Análises da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, campus Erechim.

### 3.3.2 Análise térmica

Visando verificar a obtenção de um ponto de fusão diferente dos compostos de partida na forma pura foi utilizado calorimetria diferencial de varredura, utilizando equipamento Jade-DSC-Perkin Elmer. Assim, é possível verificar se houve a formação de um cocrystal ou a formação de mistura eutética. Para a análise, foi utilizada atmosfera de nitrogênio com temperatura entre 40 e 240 °C, com atmosfera aquecida de 20 °C.min<sup>-1</sup> (MARTELLO et al., 2019).

As análises foram realizadas na Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ).



### 3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Visando obter o tamanho e formato da partícula formada através da técnica GAS, o cocristal teve seu tamanho de partículas mensurado, assim como sua morfologia, a partir da análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM), utilizando equipamento JEOL JSM-6390LV. A partir de análise de imagens, foi determinada a distribuição das partículas, com auxílio do software SizeMeter (versão 1.1). Para cada amostra, o comprimento médio da linha diagonal de 100 partículas foi medido (DAL MAGRO et al., 2017).

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

## ■ ESTUDO *IN VITRO*

### 3.4.1 Estudo de solubilidade

O estudo de solubilidade seguiu a metodologia descrita por AGUIAR et al., (2018) com modificações. A curva padrão da curcumina foi produzida em solvente etanólico (Apêndice A, Figura 1) e as leituras de absorvância foram realizadas a 435 nm. Para a análise, uma quantidade em excesso ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cada amostra foi adicionada em frasco de vidro contendo as seguintes soluções: água ultrapura, solução de HCl 0,1 M e solução tampão de fosfato (pH 6,8). As soluções foram submetidas à agitação ultrassônica por 10 min, então, mantidas sob agitação (100 rpm) em incubadora *shaker* com temperatura constante mantida a  $37^\circ \text{C}$ , por 72 h.

Para análise da concentração diluída, alíquotas de 25 ml de amostras foram filtradas utilizando membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  para remover qualquer partícula não dissolvida. Para que a leitura das amostras diluídas ocorresse no mesmo veículo (álcool etílico) utilizado na curva padrão, foi utilizado membrana de nitrocelulose para fazer a retenção das partículas solubilizadas nos solventes. Então, foram devidamente solubilizadas em álcool etílico e sua concentração foi medida por espectrometria UV em 435 nm. A concentração de curcumina foi calculada a partir da equação da reta da curva padrão.

### 3.4.2 ATIVIDADE ANTI-QUIMIOTÁXICA *IN VITRO*

A atividade anti-quimiotática foi realizada em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando neutrófilos polimorfonucleares obtidos de ratos Wistar (aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - UFRGS #37366). Este ensaio seguiu a metodologia da câmara de Boyden (SUYENAGA et al., 2011). No total, 7 ratos foram usados. Neutrófilos polimorfonucleares foram obtidos após a injeção de glicogênio estéril 1% (p / v) (20 mL) no peritônio de um rato Wistar. O animal foi sacrificado 4 h após, para coleta de sangue. Antes do ensaio de quimiotaxia, os neutrófilos foram tratados com curcumina, n-acetilcisteína ou o cocrystal (0,1 a 10 µg / mL) e indometacina (10 µg / mL), o controle positivo, a 37 ° C por 30 min. Para a obtenção do plasma, seis ratos foram usados. O plasma foi incubado a 37 ° C por 30 min com 65 µg / ml de LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*) e diluído em tampão de Hanks para obtenção de uma solução a 20% (v / v). Os leucócitos + substâncias testadas foram adicionados nos poços superiores da câmara, separados por um filtro de nitrocelulose de 8 µm (Millipore, EUA) do estimulante quimiotático (LPS) presente no compartimento inferior. Em seguida, a câmara foi mantida a 37 ° C por 1 h. A migração dos leucócitos através do filtro foi medida em microscópio óptico. A distância do topo do filtro ao plano mais distante do foco contendo duas células, em cinco campos microscópicos de filtros duplicados, permitiu a avaliação da migração de leucócitos (µm). A solução estoque das substâncias testadas (1 mg / ml) foi preparada usando solução salina balanceada de Hanks (HBSS) com adição de 1% (v / v) de polissorbato 80 (Tween 80) para soluções de curcumina e n-acetilcisteína) e sonicada por 1 min. O controle positivo indometacina também foi dissolvido em HBSS. A concentração de polissorbato 80 em todas as soluções de trabalho finais foi inferior a 0,01%. Como controle negativo, foram usadas a solução de neutrófilos aplicada sem adição do agente anti-quimiotático e também a solução de polissorbato 80 na concentração utilizada para diluição da amostra (1%).

## ■ ESTUDOS *IN VIVO*

### 3.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos com peso (6 a 8 semanas, 25 – 35 g), criados no Centro de Bioterismo da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), em todos os experimentos *in vivo*. Os animais foram

mantidos em ambiente controlado, com temperatura de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  em ciclo claro/escuro de 12 horas (6 h até às 18 h). A alimentação dos animais foi feita com ração padrão para roedores de laboratório e água *ad libitum*. Os cuidados dos animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da pesquisa em animais, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNOCHAPECÓ (aprovação #008-19), de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2016, 2008) e a Diretriz do Conselho das Comunidades Europeias de 22 de Setembro de 2010 (2010/63/UE).

### **3.5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva do cocrystal pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos**

A indução das contorções abdominais pela injeção intraperitoneal de ácido acético é um modelo comumente utilizado para testar a dor visceral (LEE et al., 2019). A utilização de substâncias, como o ácido acético, causa uma liberação de mediadores de processos inflamatórios, como as prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotonina, bradicinina e eicosanoides (VERMA et al., 2005; BAHAMONDE et al., 2013), o que resulta em um aumento da síntese de ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX) e, conseqüentemente, de prostaglandinas e leucotrienos (IKEDA et al., 2001; RADU et al., 2013). O presente estudo visou avaliar o efeito da cocrystalização sobre a potencialização da atividade antinociceptiva da curcumina.

A metodologia empregada foi descrita por KOSTER et al. (1987). Para o teste, os animais passaram por um período de adaptação à sala de experimentação de 1 h. Antes dos testes, foram mantidos em jejum por 2 horas. Então, divididos nos seguintes grupos (n = 8 animais):

Grupo veículo = administrado com água destilada + 1% de tween 80, 10 mL / kg, v.o. (controle negativo)

Grupo cocrystal 0,1 = tratado com cocrystal na dose de 0,1 mg / kg, v.o.

Grupo cocrystal 0,3 = tratado com cocrystal na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo cocrystal 0,5 = tratado com cocrystal na dose de 0,5 mg / kg, v.o.

Este teste foi realizado para determinar a menor dose efetiva do cocrystal e, também, das demais substâncias testadas. Assim, foram incluídos os seguintes grupos experimentais:

Grupo curcumina 50 = curcumina administrada na dose efetiva de 50 mg / kg, v.o.

Grupo curcumina 0,3 = curcumina administrada na dose sub-efetiva de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo Nac = tratado com n-acetilcisteína na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo Mix = tratado com uma mistura física na proporção 1:1 M contendo as substâncias formadoras do cocristal, na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo indometacina = tratado com indometacina na dose de 10 mg / kg, v.o. (controle positivo)

As substâncias em estudo foram suspensas previamente em água destilada contendo 1% de polissorbato 80. Uma hora após a administração v.o. das substâncias, foi injetado, por via intraperitoneal (i.p.), ácido acético a 0,6%. O número de contorções foi registrado durante 20 min. Imediatamente após os testes, os animais foram eutanasiados por anestesia profunda de tiopental (50 mg / kg, i.p.), precedida de lidocaína (10 mg / kg, i.p.). A confirmação foi realizada por deslocamento cervical (CONCEA, 2018).

### **3.5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória pelo método de edema da pata induzido por carragenina**

O teste de edema de pata induzido por carragenina é um modelo para rastreamento de substâncias com atividade anti-inflamatória. A carragenina, quando injetada na superfície plantar dos animais, produz um edema inflamatório bifásico. Na primeira hora, ocorre a liberação de bradicinina, histamina e serotonina, seguida pela produção de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), infiltração neutrofílica, indução de COX-2 e estresse oxidativo, até a sexta hora após a injeção (CUNHA et al., 2020).

A metodologia empregada foi adaptada de BATISTA et al. (2016). Os animais foram separados em grupos e ficaram em jejum por 2 horas. Antes de iniciar as administrações, a espessura de suas patas traseiras (direita e esquerda) foi medida com auxílio de paquímetro. Então, os mesmos (n = 25 animais) foram tratados conforme descrito:

Grupo veículo = administrado com água destilada + 1% de tween 80, 10 mL / kg, v.o. (controle negativo)

Grupo indometacina = tratado com indometacina na dose de 10 mg / kg, v.o. (controle positivo)

Grupo curcumina 50 = curcumina administrada na dose efetiva de 50 mg / kg, v.o.

Grupo cocrystal 0,3 = tratado com cocrystal na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo curcumina 0,3 = curcumina administrada na dose sub-efetiva de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo Nac = tratado com n-acetilcisteína na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo Mix = tratado com uma mistura física na proporção 1:1 M contendo as substâncias formadoras do cocrystal, na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

As substâncias em estudo foram suspensas previamente em água destilada contendo 1% de polissorbato 80. Uma hora após o tratamento, 20 µL de uma solução contendo 300 µg de carragenina foram injetados na superfície plantar (via intraplantar, i.pl.) na pata traseira direita e 20 µL de salina na pata traseira esquerda dos camundongos de todos os grupos experimentais. A pata injetada com salina representou o controle de cada grupo experimental. As avaliações da espessura das patas ( $\Delta$  da espessura, em µm) foram realizadas nos tempos: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 8 h depois das injeções i.pl. Após os testes, os animais foram eutanasiados por anestesia profunda de tiopental (50 mg/kg, i.p.), precedida de lidocaína (10 mg/kg, i.p.). A confirmação foi realizada por deslocamento cervical (CONCEA, 2018). Após a eutanásia, o tecido plantar das patas traseiras direita e esquerda dos camundongos foi coletado.

A utilização de 25 animais se justifica para a realização de pool de amostras para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido plantar dos animais.

#### **3.5.4 Avaliação da coordenação motora no teste de rota-rod**

Este teste foi realizado de modo a descartar qualquer efeito do cocrystal sobre a coordenação motora dos animais, que pudesse causar um resultado falso positivo nos testes comportamentais de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. A metodologia foi adaptada de MÜLLER et al. (2012). O aparato utilizado consiste em um cilindro rotatório dividido em 4 seções. Desta forma, 4 animais foram avaliados simultaneamente no aparelho. Foi utilizado velocidade de 5 r.p.m. A integridade da coordenação motora foi avaliada com base no tempo (em s) de resistência dos animais no cilindro giratório. Um dia antes do teste, os animais foram treinados para equilibrarem-se no cilindro e, para isso, permaneceram durante 5 min no aparato. No dia do teste, somente são avaliados os animais que aprenderam a permanecer no cilindro. Assim, o procedimento foi repetido e apenas os camundongos que se equilibraram na

haste rotativa durante 90 s (tempo de corte) foram selecionados para o teste. Os grupos testados tiveram 8 animais, e foram divididos e tratados conforme segue:

Grupo veículo = administrado com água destilada + 1% de tween 80, 10 mL / kg, v.o. (controle negativo)

Grupo indometacina = tratado com indometacina na dose de 10 mg / kg, v.o. (controle positivo)

Grupo curcumina 50 = curcumina administrada na dose efetiva de 50 mg / kg, v.o.

Grupo cocrystal 0,3 = tratado com cocrystal na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo curcumina 0,3 = curcumina administrada na dose sub-efetiva de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo Nac = tratado com n-acetilcisteína na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Grupo Mix = tratado com uma mistura física na proporção 1:1 M contendo as substâncias formadoras do cocrystal, na dose de 0,3 mg / kg, v.o.

Após uma hora da administração oral, o número de quedas e o tempo de permanência do animal na haste (em s), durante os 5 min de teste foi registrado.

### **3.5.5 Avaliação da atividade locomotora/exploratória no teste de open field**

O teste de open field é utilizado para avaliar as atividades locomotora e exploratória dos animais, assim descartando possíveis efeitos inespecíficos dos cocrystalis que possam alterar os resultados da pesquisa (RODRIGUES, 1996). Este teste foi feito imediatamente após o teste de rota-rod, com os grupos experimentais descritos anteriormente (item 3.5.5).

O teste foi realizado em caixa de MDF impermeabilizada, com a base dividida em 24 quadrantes iguais. O teste teve duração de 10 minutos, onde foram analisados o número de cruzamentos feitos entre os quadrantes (*crossings*), número de vezes em que o animal se apoia sobre as patas traseiras (*rearings*), o comportamento de autolimpeza (*groomings*), e o número de bolos fecais expelidos durante o teste (MÜLLER et al., 2015).

## **■ ESTUDO *EX VIVO***

### **3.6.1 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase**

A mieloperoxidase (MPO) é um membro da família de enzimas heme peroxidase e está localizada predominantemente em neutrófilos (até 5% em massa), com concentrações

mais baixas observadas em monócitos e macrófagos. Como parte da resposta do sistema imunológico, a MPO é liberada dos grânulos de neutrófilos para os fagolisossomos e o plasma, onde catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio e íons cloreto em ácido hipocloroso (SHAW et al., 2020). Assim, a MPO é considerada um marcador indireto da atividade de neutrófilos, cuja quantidade indica maior ou menor atividade desta proteína e infiltração dessas células no tecido. (ALMEIDA et al., 2018).

Para a análise, primeiramente foi realizada a preparação de homogenatos com as amostras teciduais dos animais. O tecido de 5 animais (*pool* de amostras) foi homogeneizado com tampão tris HCl 200 mM (pH 6,5). A homogeneização do tecido teve proporção de 10 vezes em relação ao volume, de acordo com as amostras pesadas.

O homogenato foi centrifugado a 9000 g (RCF) e o *pellet* foi separado. A partir disso, o *pellet* obtido foi suspenso com 1 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM com 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Após a homogeneização, as amostras foram novamente centrifugadas a 11000 g por 20 min, a 4 °C. Alíquotas de 30 µL do sobrenadante das amostras foram pipetadas em placas de 96 poços. Como branco, foi utilizada água ultrapura. Então, foram acrescidos aos poços da placa 200 µL de uma solução reacional (100 µL de tampão fosfato 80 mM, 85 µL de tampão fosfato 22 mM e 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,017%). A reação teve início com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina (TMB), um substrato enzimático que resulta num produto colorido em cada poço. A placa contendo as amostras foi incubada por 3 min a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados estão expressos como unidade de densidade óptica (D.O) / mg de tecido. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

## ■ ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. Os resultados do teste de solubilidade e da atividade da MPO *ex vivo* foram analisados por teste-t não pareado. A análise estatística dos demais resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste de Tukey. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## **CAPÍTULO 4**

### **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Neste capítulo, serão apresentados os resultados de todos os testes feitos neste estudo. A apresentação deste capítulo será feita na forma de artigo, o qual foi submetido a revista *Acta Pharmaceutica Sinica B*.

#### **Curcumin and n-acetylcysteine cocrystal: characterization, solubility, and preclinical evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities**

Alessandro R. Paulazzi<sup>a</sup>; Bianca O. Alves<sup>b</sup>; Gabriela A. L. Zilli<sup>b</sup>; Aline E. dos Santos<sup>a</sup>; Fernanda Petry<sup>b</sup>; Krissie D. Soares<sup>c</sup>; Letícia J. Danielli<sup>c</sup>; Jefferson Pedroso<sup>b</sup>; Miriam A. Apel<sup>c</sup>; Gean Pablo S. Aguiar<sup>b,d</sup>; Anna M. Siebel<sup>b,d</sup>; J. Vladimir Oliveira<sup>a</sup>; Liz G. Müller<sup>b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, UFSC, SC, Brazil

<sup>b</sup> Molecular Genetics and Ecotoxicology Laboratory, Community University of Chapecó Region, Chapecó, SC, Brazil

<sup>c</sup> Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Environmental Sciences Graduate Program, Community University of Chapecó Region, Chapecó, SC, Brazil

\*corresponding author: Dr. Liz G. Müller, Community University of Chapecó Region (Unochapecó), Servidão Anjo da Guarda, nº 295-D, Bairro Efapi, 89809-900, Chapecó, SC, Brazil. E-mail: lizmuller@unochapeco.edu.br. Phone: +55 49 33218215, Fax: +55 49 33218263.



## Abstract

Curcumin presents a promising anti-inflammatory potential, but its low water-solubility and bioavailability hinder its application. In this sense, cocrystallization represents a tool for improving physicochemical properties, solubility, permeability, and bioavailability of new drug candidates. Thus, the aim of this work was to produce curcumin cocrystals (with n-acetylcysteine as coformer, which possesses anti-inflammatory and antioxidant activities), by the anti-solvent gas technique using supercritical carbon dioxide, and to test its antinociceptive and anti-inflammatory potential. The cocrystal was characterized by differential scanning calorimetry, powder X-ray diffraction and scanning electron microscopy. The cocrystal solubility and antichemotaxic activity were also assessed *in vitro*. Antinociceptive and anti-inflammatory activities were carried out *in vivo* using the acetic acid-induced abdominal writhing and carrageenan-induced paw oedema assays in mice. The results demonstrated the formation of a new crystalline structure, thereby confirming the successful formation of the cocrystal. The higher solubility of the cocrystal compared to pure curcumin was verified in acidic and neutral pH, and the cocrystal inhibited the chemotaxis of neutrophils *in vitro*. *In vivo* assays showed that cocrystal presents increased antinociceptive and anti-inflammatory potency when compared to pure curcumin, which could be related to an improvement in its bioavailability and/or synergistic biological interaction with n-acetylcysteine.

**Keywords:** Cocrystal; Curcumin; n-acetylcysteine; anti-solvent gas; anti-inflammatory; supercritical carbon dioxide.

## ■ INTRODUCTION

The formulation of poorly soluble drugs is one of the problems faced by the pharmaceutical industry. This fact is linked to the physicochemical properties and bioavailability of the substances<sup>1</sup>. About 60% of the drugs are poorly soluble in water and up to 90% of new drugs are classified by the biopharmaceutical classification system (BCS) in the class II (low solubility and high permeability)<sup>2-3</sup>. Thus, in this class, a limiting step in the rate of drug release is solubility and, therefore, the poor bioavailability<sup>4</sup>. The improvement of the

physicochemical properties of drugs, such as particle size distribution, morphology and solubility are key factors for maximizing the efficacy and obtaining the beneficial effects of bioactive compounds<sup>2-5-6</sup>.

Curcumin [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadiene-3,5-dione], a phytochemical, hydrophobic and polyphenolic compound, is the main curcuminoid (about 70%) found in the rhizome of *Curcuma longa*<sup>7-8</sup>. It is a bioactive substance, that possesses antibacterial<sup>9</sup>, anti-mutagenic<sup>10</sup>, anti-diabetic<sup>11</sup>, anti-HIV<sup>12</sup>, antioxidant<sup>13</sup>, antinociceptive<sup>14</sup> and anti-inflammatory<sup>15</sup> potential, among others. Curcumin is capable to inhibit inflammatory transcription factors (e.g. NF- $\kappa$ B), cyclooxygenase 2 and lipoxygenase, as well as tumor necrosis factor and interleukin 1 and 6<sup>16-17</sup>. Evidences have shown that even at relatively high doses (~ 8 g), curcumin is safe for oral intake, but only a small fraction (~ 40 nM) actually ends up in the bloodstream due to its poor aqueous solubility and, therefore, low oral bioavailability<sup>13</sup>.

Despite numerous studies on the functionality of curcumin as a bioactive compound, it is known that this compound is practically insoluble in water (0.6  $\mu$ g / mL), which hinders its application by the pharmaceutical industry<sup>7</sup>. There are several ways to improve the physicochemical properties of an active pharmaceutical ingredient (API), such as salt formation, polymorphic forms, solvates or hydrates and cocrystals<sup>18</sup>. The pharmaceutical cocrystallization has quickly emerged as a valuable tool to improve the physicochemical properties of compounds, improving solubility, permeability, and bioavailability of new drug candidates, without changing their structure<sup>19-20-21</sup>. N-acetylcysteine (Nac) possesses antioxidant and anti-inflammatory properties<sup>22</sup>. It acts as a glutathione precursor as well as a direct free radical scavenger<sup>23</sup>, inhibits NF- $\kappa$ B and decreases the synthesis of proinflammatory cytokines<sup>24</sup>. Additionally, unlike curcumin, it is a highly water-soluble drug<sup>25</sup> and presents functional groups that allow the formation of bounds. Therefore, cocrystallizing the two compounds (curcumin and Nac) could represent an alternative to enhance the solubility of curcumin and potentialize its anti-inflammatory efficacy.

Supercritical technology has emerged from the growing demand for better and safer products, especially in the food and pharmaceutical sectors<sup>26</sup>. The anti-solvent gas technology is well known as a method to fractionate various materials as it allows controlling the particle size, size distribution, crystalline structure and crystalline phase<sup>27</sup>. Particles can be formed under mild and inert conditions when carbon dioxide is used as an anti-solvent supercritical fluid

(SF)<sup>28</sup>. Furthermore, CO<sub>2</sub> gas is a non-toxic, readily available, environmentally acceptable, non-flammable and inexpensive<sup>29</sup>. In processes that use supercritical fluids, CO<sub>2</sub> has been widely employed because it is cheap, less toxic than conventional solvents and easy to remove, resulting in the production of particles with negligible levels or free of residual solvent<sup>30</sup>.

Since the solubility of many drugs in supercritical CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) is limited, the development of techniques using CO<sub>2</sub> is compromised. In this sense, new methodologies were developed. The anti-solvent gas (GAS) method was developed from the knowledge that the absorption of a gas in a liquid causes its expansion. When a solution is sufficiently expanded by a gas, the liquid phase cannot maintain itself as a good solvent for the solute and precipitation occurs<sup>31-32</sup>.

Considering the above-mentioned facts, in order to enhance curcumin's solubility and potentiate its anti-inflammatory activity, this drug was successfully cocrystallized with Nac using the supercritical technology as the approach for cocrystallization by GAS. The cocrystal was characterized using Differential Scanning Calorimetry, Powder X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy. In order to verify the effects of cocrystallization on curcumin's anti-inflammatory and antinociceptive activities, the ability of the cocrystal to inhibit neutrophil migration *in vitro* as well as the effects of cocrystal on *in vivo* assays were assessed.

## ■ MATERIALS AND METHODS

### 4.2.1 Materials

The cocrystal forming components, curcumin (95% purity) and n-acetylcysteine (99% purity), were purchased from Sigma-Aldrich. Indomethacin was acquired from Aspen Pharma. Ethyl alcohol and acetone, with 99.5% purity, were purchased from Neon commercial LTDA / SP and carbon dioxide (99.9% in the liquid phase) was purchased from White Martins S.A.

## ■ SYNTHESIS OF COCRYSTALS

### 4.3.1 Production of co-crystals by anti-solvent gas method

In this study, the anti-solvent gas (GAS) technique was used, adapted from that described by Pessoa et al.<sup>33</sup>. In order to obtain a 1:1 M molar ratio, curcumin and Nac (coformer) were weighed and dissolved in 15 mL of organic solvent under ultrasonic stirring, for 10 min, and then added to the cocrystallization chamber. Initially, a thermostatic bath reached the operating temperature of the syringe pump (5 °C), then fed with CO<sub>2</sub>, and pressurized (20 MPa). A second thermostatic bath was used to control the operating temperature of the cocrystallization chamber (45 °C). The chamber was pressurized until it reached operating pressure (9 MPa) with CO<sub>2</sub> flow of 10 mL / min, using a needle valve specific for gas and monitored by the syringe pump, so the system was closed and the pressure maintained for the time of operation (10 min). Once the time has elapsed, the CO<sub>2</sub> inlet and outlet valves of the chamber are opened, maintaining a continuous flow inside the chamber (50 min), not allowing its decompression, this process makes the CO<sub>2</sub> act as an anti-solvent. After the stipulated time, the chamber inlet valve is closed and depressurization occurs slowly, the chamber is opened as soon as atmospheric pressure arrives and the crystals are collected.

## ■ THERMAL ANALYSIS

The differential scanning calorimetry (DSC) was carried out in a Jade-DSC-Perkin Elmer equipment. The samples (curcumin, Nac, cocrystal and a physical mixture (Mix) containing the cocrystal-forming substances in a 1:1 M ratio) were weighed (~ 5 - 10 mg) and analyzed using a nitrogen atmosphere with temperature between 40 and 240 °C, in an inert atmosphere (N<sub>2</sub> flow: 20 mL / min) and heating rate of 20 °C / min. The analysis was adapted from Martello et al.<sup>34</sup>.

## ■ POWDER X-RAY DIFFRACTION

The crystalline structure was analyzed by Powder X-ray diffraction (PXRD) using a Rigaku MiniFlex II Desktop X-Ray Diffraktometer, using CuK $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). Operating voltage of 30.0 KV, current of 15.0 mA and sweep speed of 5° min<sup>-1</sup> and 0.05 step. The angle of 2 $\theta$  (5 to 40 °C) was used<sup>35-36</sup>.

## ■ SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

The particle size of the cocrystal (and the cocrystal forming substances) as well as its morphology were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), using JEOL JSM-6390LV equipment. The particle size was determined using the Size Meter software (version 1.1)<sup>37</sup>.

## ■ SOLUBILITY STUDY

The solubility study followed the methodology described by Aguiar et al.<sup>38</sup>, with minor modifications. An excess amount (20 mg / L) of each sample was added to a glass flask containing the following solutions: ultrapure water, phosphate buffer solution (pH 6.8) and 0.1 M HCl solution. The solutions were subjected to ultrasonic shaking for 10 min, then kept under shaking (100 rpm) in an incubator with constant temperature (37 °C for 72 h). Once the time had elapsed, 25 mL aliquots of samples were filtered using 0.45 µm pore membrane to remove any undissolved particles. Then, they were filtered through a nitrocellulose membrane, in order to make the retention of all particles solubilized in water. The particles were solubilized in ethyl alcohol (vehicle used to carry out the analytical curves) and their concentration was measured by UV spectrometry at 435 nm.

## ■ ANTICHEMOTACTIC ASSAY IN VITRO

The anti-chemotactic activity was carried out using the method of the Boyden chamber<sup>39</sup>. In total, 7 animals were used in this test. Rat polymorphonuclear neutrophils were obtained after the injection of sterile 1% (w / v) glycogen (10 mL) into the peritoneum of one Wistar rat. The animal was euthanized 4 h later to collect the leukocytes. Prior to the assay, neutrophils were treated with curcumin, Nac or the cocrystal (0.1; 1 and 10 µg / mL) and indomethacin (10 µg / mL), the positive control, at 37 °C for 30 min. For plasma obtention, six rats were used. The plasma was incubated at 37 °C for 30 min with 65 µg / ml of LPS (lipopolysaccharide from *E. coli*) and diluted in Hanks buffer to a 20% solution (v / v). The leukocyte/samples were added in the upper wells of the chamber, separated by a nitrocellulose filter 8 µm (Millipore, USA) from the chemotactic stimulant (LPS) present in the bottom compartment. Then, the chamber was kept at 37 °C for 1 h. The leucocytes migration through the filter was measured by using an optical microscope and leukocyte migration was

expressed in  $\mu\text{m}$ . The stock solution of the substances (1 mg / ml) was prepared by using Hanks' balanced salt solution (HBSS). The cocrystal, Nac and the reference drug indomethacin were dissolved in HBSS. The curcumin solution was prepared with addition of 1% polissorbate 80 (v / v) and sonicated for 1 min. The concentration of polissorbate 80 in all final working solutions was less than 0.01%. The neutrophil solution without addition of the antichemotatic agent as well as polissorbate 80 solution at the concentration used for sample dilution (1%) represented the negative controls.

## ■ *In vivo experiments*

### 4.9.1 Animals

Male Swiss mice (25 - 35 g) bred at the Community University of Chapecó Region (Unochapecó) bioterium were used in all *in vivo* experiments. Male Wistar rats (220 - 250 g) from Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) at the Federal University of Rio Grande do Sul, were used for *in vitro* assays. The animals were kept in a controlled environment, with a temperature of  $22 \pm 1$  °C in a 12-hour light / dark cycle (6:00 am to 6:00 pm) and had free access to standard laboratory feed and water. Mice were fasted for 2 h before oral administrations. Animal care was conducted in accordance with the ethical principles of animal research, approved by the Ethics Committee of Community University of Chapecó Region (approval number #008-19), and the Ethics Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (approval number #37366), in accordance with Brazilian law<sup>40</sup> and the Directive of the Council of the European Communities (2010/63/EU).

### 4.9.2 Treatments

The tested substances were dissolved in saline solution + 1% polissorbate 80 (Vehicle), except the cocrystal, which was solubilized without the aid of polissorbate 80. The doses of the cocrystal and the physical mixture (curcumin + Nac) were calculated in order to provide a curcumin dose of 0.1; 0.3 or 0.5 mg / kg. Mice were treated with volumes of 10 mL / kg, according to their weight, by the oral route (p.o.) (intra-gastric administration), intraperitoneal (i.p.) and intraplantar (i.pl.), depending on the protocol of each test. Experimenters were blinded to treatment conditions.

### 4.9.3 Acetic acid-induced abdominal writhing test

The method used in this test was adapted from Scapinello et al.<sup>41</sup>. This assay had the purpose to evaluate the minimum effective dose of the cocrystal. The animals were divided into groups (n = 8 mice / group) and treated with cocrystal at 0.5; 0.3 and 0.1 mg / kg (p.o.). The dose that presented the best result in this experiment was chosen to be used in the other tests of nociception and inflammation. The effects of cocrystal-forming substances curcumin (50 mg / kg, p.o. – effective dose - and 0.3 mg / kg, p.o. – sub effective dose) and Nac (0.3 mg / kg p.o.), as well as a physical mixture (Mix) containing the cocrystal-forming substances in a 1:1 M ratio (0.3 mg / kg p.o.) were also assessed in the test. Curcumin's effective dose was chosen based on a previous study<sup>42</sup>. Indomethacin (10 mg / kg, p.o.) was used as the positive control. One hour after the oral administrations, acetic acid (0.6%) was administered intraperitoneally (i.p.). The number of abdominal writhing was cumulatively counted for 20 min and considered as the nociceptive behavior.

### 4.9.4 Carrageenan-induced paw oedema test

The method used was adapted from previous studies<sup>41-43</sup>. Briefly, the animals were subcutaneously injected under the plantar surface (i.pl.) of the right hind paw with 20  $\mu$ L of carrageenan (300  $\mu$ g / paw, dissolved in 0.9% NaCl), as previously described<sup>41</sup>. The left hind paw was injected with saline solution (0.9% NaCl, 20  $\mu$ L) and served as the control of each experimental group. One hour prior to the i.pl. injection of saline and carrageenan, the animals (n = 25 mice / group) were pretreated with vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80, 10 mL / kg, p.o., negative control), indomethacin (20 mg / kg, p.o., positive control)<sup>44</sup>, Nac (0.3 mg / kg, p.o.) or curcumin (0.3 mg / kg, p.o. – sub effective dose or 50 mg / kg, p.o. – effective dose), or a physical mixture (Mix) containing the cocrystal-forming substances (curcumin + Nac) in a 1:1 M ratio (0.3 mg / kg, p.o.). Thirty minutes, 1 h, 2 h, 4 h and 8 h after the i.pl. injection of carrageenan, the paw thickness was assessed using a caliper<sup>41</sup>. The oedema formation was defined as  $\Delta$  paw thickness (mm) = test paw thickness – basal paw thickness. After the last measure of hind paw thickness, the animals were euthanized, and the paw tissue was collected for further tests.

#### 4.9.5 Myeloperoxidase (MPO) activity

MPO activity was performed in the paws' tissues of animals submitted to the carrageenan-induced paw oedema test. The left and right hind paws tissues were collected after 8 h of the i.pl. administration. Animals from the same group (n = 25 mice / group) were used to make a sample (the tissues from 5 animals were pooled)<sup>43</sup>. The paw tissue was homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and centrifuged at 4 °C. The pellets were resuspended in 80 mM potassium phosphate buffer (1 mL) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide, and then centrifuged at 11,000 g (20 min, 4 °C). Aliquots from the supernatant (30 µL) were added to 96-well microplates in triplicate. Subsequently, the reaction solution (100 µL of 80 mM phosphate buffer + 85 µL of 22 mM phosphate buffer + 15 µL of 0.017% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and 20 µL of 5% tetrametil-5,5'-benzedine were added. The plates were incubated (3 min, 37 °C) and the reaction was stopped by adding 30 µL of 1.46 M sodium acetate (pH = 3.0) to each well. The enzymatic activity was assessed using a spectrophotometer at 620 nm<sup>43</sup>. Total protein content in the samples was quantified by the method of Lowry et al.<sup>45</sup>. The MPO activity of the non-inflamed paw (injected with 0.9% NaCl) was used as the control. The results are expressed as optical density unit / mg protein, as described by Bradley et al.<sup>46</sup>.

#### 4.9.6 Open field test

The effects of the cocrystal on the locomotor and exploratory performance of the animals was assessed by the open field test according to Müller et al.<sup>47</sup> with minor modifications<sup>41</sup>. The animals (n = 8 mice / group) were orally treated with vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80, 10 mL / kg), indomethacin (10 mg / kg), Nac (0.3 mg / kg), curcumin (0.3 mg / kg – sub effective dose or 50 mg / kg – effective dose), cocrystal (0.3 mg / kg) or a physical mixture (Mix) containing the cocrystal-forming substances (curcumin + Nac) in a 1:1 M ratio (0.3 mg / kg), one hour before being observed in the open-field. The test was carried out in a waterproofed MDF box (40 × 30 × 30 cm), in a 24 squares equally divided floor. The animals were individually placed in the arena and the number of crossings, rearings and groomings was recorded in a 10 min session. Afterwards, the number of fecal bolus expelled during the session was counted and the apparatus was cleaned with 10% ethanol after each mice exposition.



#### 4.9.7 Rota-rod test

The rota-rod test was carried out to evaluate the possible effects of the cocrystal on the integrity of the motor coordination of mice according to Galeotti et al.<sup>48</sup>, with minor modifications<sup>47</sup>. The apparatus consists of a rotating cylinder divided into four sections, with a speed of 5 rpm. Firstly, the animals were habituated to the rotating cylinder for 5 min. Twenty-four hours later, the procedure was repeated, and only the mice that stayed balanced on the rotating rod for 90 s (cut-of time) were selected for the test. Immediately after, mice (n = 8 animals / group) were orally treated with vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80, 10 mL / kg), indomethacin (10 mg / kg), Nac (0.3 mg / kg), curcumin (0.3 mg / kg – sub effective dose or 50 mg / kg – effective dose), cocrystal (0.3 mg/ kg) or a physical mixture (Mix) containing the cocrystal-forming substances (curcumin + Nac) in a 1:1 M ratio (0.3 mg / kg). One hour after the administrations, mice performance in the rota-rod were evaluated, considering the longest time of permanence on the apparatus and the number of falls, in a 5 min period.

#### 4.9.8 Statistical analysis

The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of *n* animals per group. The results from solubility studies and MPO activity were analyzed by unpaired t-test. The statistical analysis of data from antichemotactic assay *in vitro* and *in vivo* experiments was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test.  $p < 0.05$  were considered significant.

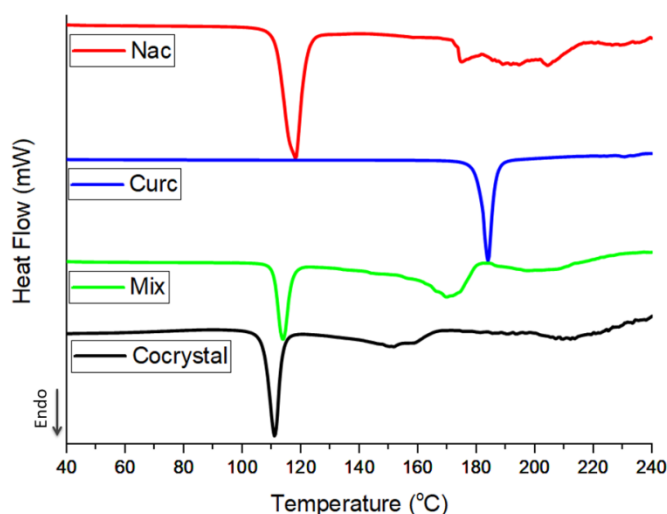
## RESULTS AND DISCUSSION

Curcumin downregulates chemokine expression in inflammatory cells and, therefore, presents anti-inflammatory activity<sup>12-49</sup>. Unfortunately, this compound shows low water solubility (0.6  $\mu\text{g} / \text{mL}$ )<sup>7</sup>, which hinders its clinical applications. However, Nac is a highly water-soluble compound (0.2 g / mL)<sup>50</sup> which is also known for its antioxidant and anti-inflammatory properties<sup>22</sup>. Therefore, in this study, we propose the successful production of a curcumin-Nac cocrystal by the anti-solvent gas technique using  $\text{scCO}_2$ , which represents a solution that signalizes an advance in the application of curcumin. The cocrystal was characterized by

differential scanning calorimetry, powder X-ray diffraction, scanning electron microscopy and evaluated by *in vitro* and *in vivo* assays.

#### 4.10.1 Thermal analysis

Figure 1 shows the DSC thermograms used to check the formation of the cocrystal. The melting point of the cocrystal and its pure forming substances were tested. Curcumin presented a melting point of 184.06 °C, a value close to that found by Zhang et al.<sup>51</sup>, and Nac was characterized by a melting point of 118.19 °C. It was found that the cocrystal produced by GAS presented a melting point of 111.03 °C, below the points found for curcumin and Nac. According to Schultheiss and Newman<sup>52</sup>, about 39% of the cocrystals have lower melting points than the API and cofomers due to the presence of a weaker crystalline structure, which is consonant to our findings.

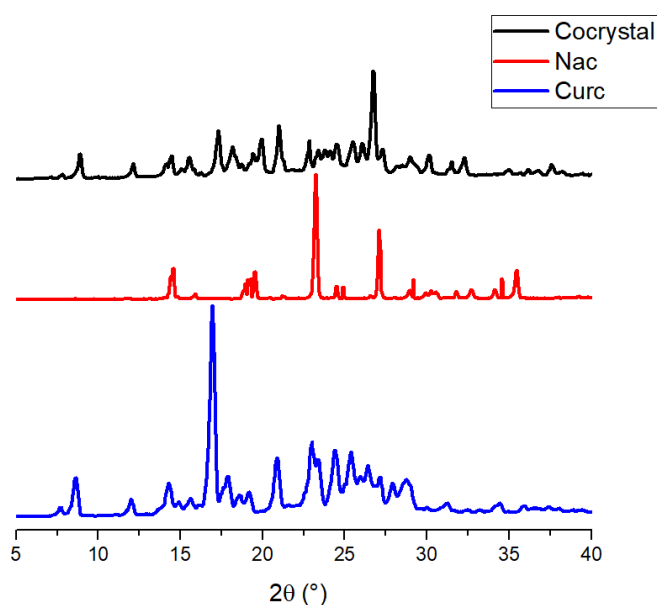


**Figure 2** DSC spectrogram. The substances n-acetylcysteine (Nac), curcumin (Curc), physical mixture (Curc + Nac, 1:1M ratio) (Mix) and cocrystal were tested in the range of 40 to 240 °C to confirm the melting points.

Thermal analysis is used to study the formation of new solid forms because the thermal behavior of the forming substances presents itself differently, when compared to the newly formed structure. In contrast, a simple physical mixture must exhibit two endothermic points, which are related to the melting point of the individual components<sup>53</sup>. Herein, different values were found for the physical mixture, which presented two melting points (114.11 °C and 169.93 °C), evidencing the simple mixture of the pure substances. Therefore, the DSC analysis suggests the formation of a new crystalline form, with the presence of a unique endothermic profile different from the pure components.

#### 4.10.2 X-ray crystallography

Powder X-ray diffraction (PXRD) is a reliable technique for analyzing the solid-state structure<sup>54</sup>. The crystalline phase of the cocrystal was demonstrated through PXRD analysis and Figure 2 shows the diffractograms of the cocrystal, Nac and curcumin. It was found that there is a shift in the diffraction peaks (when compared to pure substances), indicating the formation of a new crystalline layer, in values of  $2\theta$ .

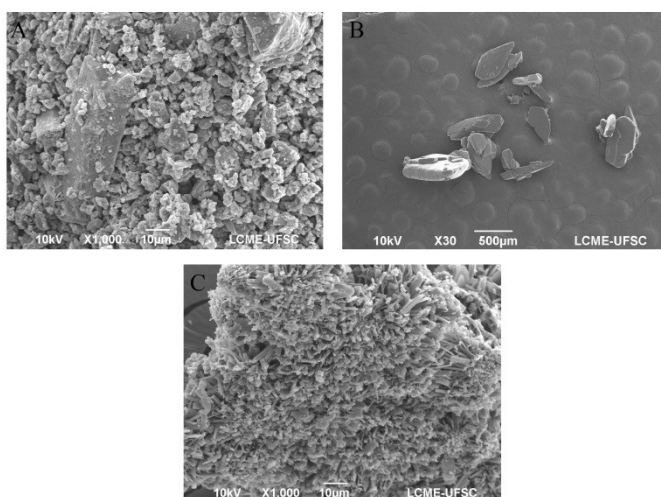


**Figure 3** X-ray powder diffractogram. PXRD pattern of the characteristic peaks of cocrystal, n-acetylcysteine (Nac) and curcumin (Curc).

Curcumin showed characteristic reflections at  $7.75^\circ$ ,  $8.6^\circ$ ,  $12.0^\circ$ ,  $14.3^\circ$ ,  $15.6^\circ$ ,  $16.95^\circ$ ,  $17.9^\circ$ ,  $20.9^\circ$ ,  $23.0^\circ$ ,  $23.4^\circ$ ,  $25.4^\circ$ ,  $25.95^\circ$ ,  $26.4^\circ$ ,  $27.15^\circ$ ,  $27.9^\circ$ ,  $28.7^\circ$ ,  $2\theta$ . Nac showed characteristic reflections at  $14.55^\circ$ ,  $19.55^\circ$ ,  $23.25^\circ$ ,  $27.1^\circ$ ,  $29.15^\circ$ ,  $30.25^\circ$ ,  $35.45^\circ$ ,  $2\theta$ , similar to those found by Ribas et al.<sup>36</sup>. The cocrystal showed a shift in the peak at  $8.9^\circ$ ,  $17.3^\circ$ ,  $22.85^\circ$ ,  $26.7^\circ$  and the appearance of a peak at  $37.55^\circ$ ,  $2\theta$ , which evidence the formation of a new crystalline phase, in accordance with the DCS results.

### 4.10.3 Scanning electron microscopy

Figure 3 represents the size of the cocrystal particles and their forming components (curcumin and Nac), which were observed by scanning electron microscopy (SEM) images. Several authors report irregular particle size for curcumin.<sup>55</sup> Onoue et al. reported irregularly shaped particles and sizes ranging from about 10 - 100  $\mu\text{m}$ . However, Kurniawansyah et al.<sup>56</sup>, found the particle size for curcumin with 90% purity, ranging from 10 - 30  $\mu\text{m}$ . Herein, in accordance to previous studies<sup>55-56</sup>, curcumin exhibited a heterogeneous morphology, with a distinct variation in the size of its particles ( $12.91 \pm 7.90 \mu\text{m}$ ) and a rounded shape. Nac exhibited a rectangular heterogeneous morphology with a size of  $714.57 \pm 110 \mu\text{m}$ . In contrast, the cocrystal presented homogeneous needle-shaped morphology with a size of  $8.43 \pm 2.08 \mu\text{m}$ . The particle sizes and standard deviations are shown in Table 1.



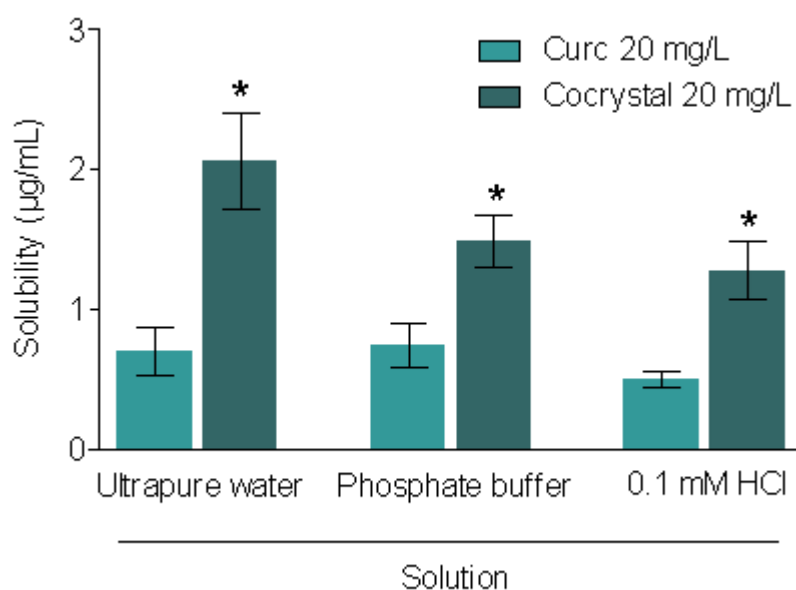
**Figure 4** Scanning electron microscopy images: A) curcumin, B) n-acetylcysteine, C) cocrystal

**Table 1** Curcumin particle size data: (A), n-acetylcysteine (B) and cocrystal (C). The average particle size was calculated from the measurement of the diagonal line of 100 particles.

Samples	Particle size (mean diagonal line in $\mu\text{m}$ )
Curcumin	$12.91 \pm 7.90$
N-acetylcysteine	$714.57 \pm 110$
Cocrystal	$8.43 \pm 2.08$

#### 4.10.4 Solubility study

The results of solubility of curcumin and cocrystal dissolved in ultrapure water, phosphate buffer (pH 6.8) or 0.1 M HCl are shown in Figure 4. The cocrystal samples demonstrated greater solubility in all tested solvents, when compared to curcumin. The solubility found for curcumin in ultrapure water was  $0.54 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ , a value close to that found in the literature ( $> 0.6 \mu\text{g/mL}$ )<sup>7</sup>.



**Figure 5** Solubility of cocrystal in different solutions: The solubility of cocrystal and curcumin (Curc) were evaluated in ultrapure water, phosphate buffer (pH 6.8) and 0.1 M HCl solution.

The solubility found for the cocrystal in ultrapure water ( $2.11 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ ) was significantly ( $p < 0.05$ ) greater (4.06 times) than the curcumin solubility in the same medium. In phosphate solution (pH 6.8), the solubility of cocrystal ( $1.34 \pm 0.1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) was 2.29 times higher ( $p < 0.05$ ) than the solubility of curcumin ( $0.62 \pm 0.08 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). Additionally, in the acidic medium (0.1 M HCl), the cocrystal also showed an increase (2.62 times,  $p < 0.05$ ) in solubility: the values found for curcumin were  $0.54 \pm 0.02 \mu\text{g} / \text{mL}$  and for the cocrystal,  $1.42 \pm 0.01 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Our results are in accordance with other studies that also demonstrated increased solubility of curcumin cocrystals. Sathisaran et al.<sup>57</sup>, demonstrated that the solubility of curcumin-trimethic acid cocrystal (1:1 ratio) in 40% ethanol-water solution (v /

v) is 1.8 times greater than the solubility of pure curcumin. Additionally, Ribas et al.<sup>58</sup> showed that the water solubility of curcumin-nicotinamide cocrystal (1:1 ratio) is 2 times increased when compared to pure curcumin.

It is well known that the solubility of drugs influences their bioavailability. The increase in solubility elicits a better absorption of oral APIs and, therefore, can improve their bioavailability and pharmacological potency<sup>59</sup>. Considering that our results demonstrated greater solubility of the cocrystal in comparison to pure curcumin, we performed additional tests regarding the anti-inflammatory and antinociceptive effect of the cocrystal aiming to compare its pharmacological potency and efficacy to the pure curcumin. The effects of Nac and the physical mixture (curcumin + Nac) (Mix) were also tested.

#### **4.10.5 Antichemotactic activity in vitro**

Inflammation is an essential defense of the human organism against invasions of pathogens, observed by the modulation of multiple signaling pathways, mitogen-activated protein kinase (MAPK), transcription factors (such as nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) and inflammatory cytokines (such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL6 and Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP2)). These chemotactic cytokines activate and elicit the migration of leukocytes to the inflamed site<sup>60</sup>, subsequently inducing biosynthesis, transformation and expression of various pro-inflammatory cytokines, prostaglandins and other mediators<sup>61-62</sup>. Among the most important transcription factors is the NF- $\kappa$ B, which acts by regulating the expression of many genes involved in innate and adaptive immunity and inflammation<sup>63</sup>. It is well known that curcumin exhibits anti-inflammatory activity and affects kinase reactions, such as those of MAP kinase, and PKC, c-Jun/AP-1<sup>64-65</sup>. Furthermore, evidence show that curcumin blocks NF- $\kappa$ B activity during transcription<sup>66-67</sup> and inhibits CXCR1 and CXCR2 recycling; resulting in decreased neutrophil chemotaxis. In addition, it has been demonstrated that curcumin changes the intercellular trafficking of the IL-8 receptor in neutrophils<sup>68</sup>.

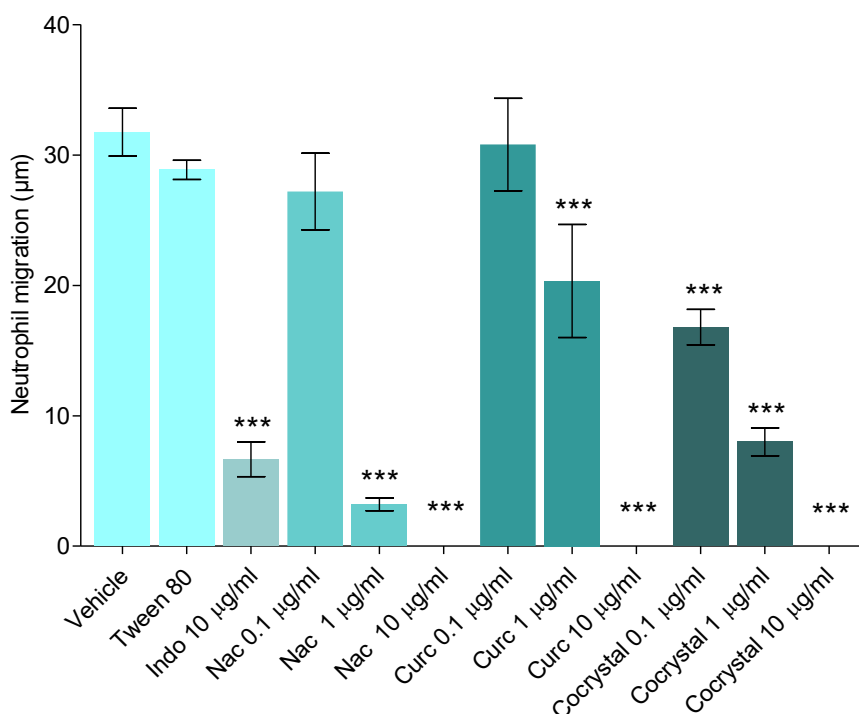
Interestingly, the antichemotactic effect of Nac has already been shown. Mottahedin et al.<sup>69</sup>, demonstrated that Nac is able to decrease neutrophil transmigration across the choroidal epithelial barrier.

Considering that the suppression of neutrophil functions control inflammatory responses and is part of the mechanism of action of curcumin and some non-steroid anti-inflammatory drugs<sup>70</sup>, the effects of the cocrystal on leukocyte chemotaxis induced by LPS were

investigated in the Boyden chamber *in vitro* method. Bacterial LPS simulates several inflammatory effects of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or IL-6<sup>71</sup>.

The results of antichemotactic assay are shown in Figure 5. Nac and curcumin demonstrated a significant ( $p < 0.001$ ) inhibitory effect on neutrophils migration at 1 and 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  when compared to the negative controls. The cocrystal significantly ( $p < 0.001$ ) inhibited neutrophil migration at all concentrations tested and this effect was comparable to the effect of indomethacin, which was used as positive control. These results indicate that the cocrystal presents an increase in the antichemotactic effect in 10 times when compared to the pure compounds, probably due to the superior water solubility of the cocrystal (which allowed an effective contact with the leukocytes at the lower concentration) and a synergism between the antichemotactic effect of curcumin and Nac.

Considering that there is not always a direct *in vitro/in vivo* correlation of the cocrystal activity and studies on cocrystals effects can provide improved performance in animal studies<sup>52</sup>, the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the cocrystal were investigated in *in vivo* experiments.



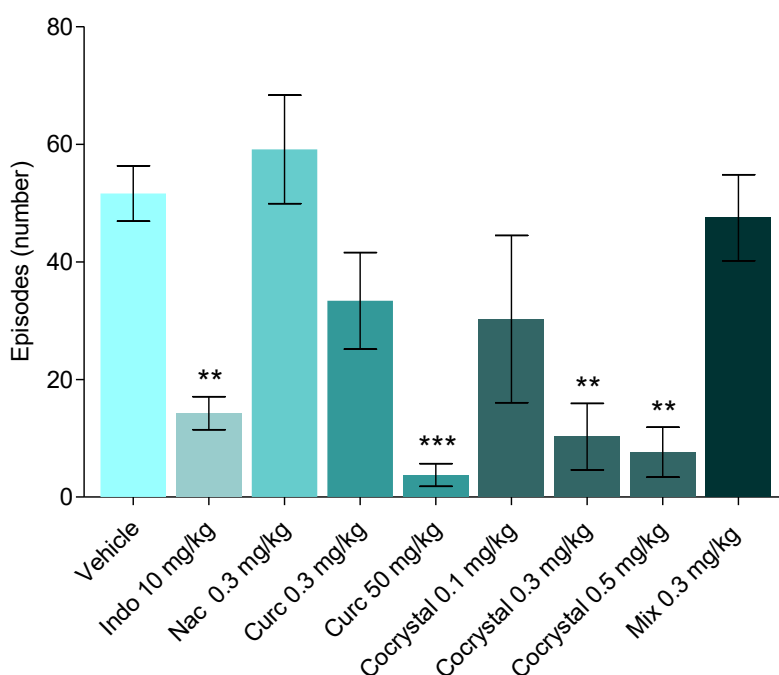
**Figure 6** Effect of cocrystal on neutrophil chemotaxis *in vitro*. The leukocytes were treated with n-acetylcysteine (Nac), curcumin (Curc) or cocrystal in concentrations of 0.1; 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  at 37 ° C for 1 h. Chemotaxis is expressed as mean  $\pm$  SEM of neutrophil

migration ( $\mu\text{m}$ ). One-way ANOVA followed by Tukey test; \*\*\* significantly different from Vehicle and Tween 80,  $p < 0.001$ .

#### 4.10.6 Acetic acid-induced abdominal writhing test

Prompted by the *in vitro* results, we performed the acetic acid-induced abdominal test in mice. The results are shown in Figure 6. The injection of acetic acid evokes acute abdominal writhing in rodents, through the peripheral production of several pro-inflammatory mediators<sup>43</sup>. Firstly, we investigated the effects of the cocrystal at 0.1; 0.3 and 0.5 mg / kg on the test. The animals orally treated with the cocrystal showed a significant ( $p < 0.01$ ) reduction on abdominal writhing elicited by acetic acid at 0.5 and 0.3 mg / kg, when compared to the vehicle-treated animals. Indomethacin ( $p < 0.01$ ) and curcumin at 50 mg / kg ( $p < 0.001$ ) reduced the number of abdominal writhing triggered by the injection of acetic acid when compared to the vehicle group, as expected. The cocrystal forming substances (Nac and curcumin) and the physical mixture of curcumin+Nac (Mix) were also tested at 0.3 mg / kg (the minimum effective dose of the cocrystal), and were not effective in reducing the abdominal writhes induced by acetic acid, suggesting that the cocrystallization was fundamental to the observed *in vivo* results.

The minimum dose of cocrystal that presented the best result in this experiment (0.3 mg / kg) was chosen to be used in the carrageenan-induced paw oedema test.



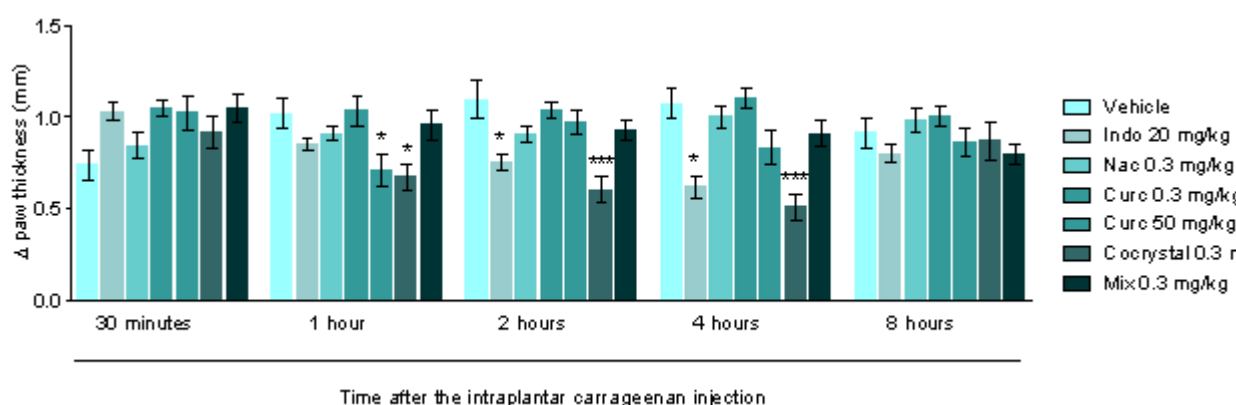


**Figure 7** Effect of cocrystal on mice abdominal writhing test induced by acetic acid. Animals ( $n = 8$  / group) were orally treated with curcumin in the effective (Curc 50 mg/kg) and sub-effective doses (Curc 0.3 mg / kg), n-acetylcysteine (Nac 0.3 mg / kg), curcumin+N-acetylcysteine physical mixture in a 1:1 M ratio (Mix) at 0.3 mg/kg, and cocrystal at 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg and 0.5 mg/kg, 1 h prior to the i.p. injection of acetic acid (0.6%). Indomethacin (Indo, 10 mg / kg, p.o.) was used as the positive control and the negative control group received the vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80) used to dissolve the substances used (10 ml / kg, p.o.). Mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA, followed by Tukey's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  different from the Vehicle-treated group.

#### 4.10.7 Carrageenan-induced paw oedema test

The carrageenan-induced paw oedema test is a widespread used animal model for screening drugs with anti-inflammatory activity. The intraplantar injection of carrageenan produces an inflammatory oedema due to the release of bradykinin, histamine, and serotonin, followed by the production of prostaglandins and nitric oxide (NO), neutrophilic infiltration, cyclooxygenase 2 (COX-2) enzyme induction and oxidative stress<sup>72</sup>.

The results obtained in the carrageenan-induced paw oedema test are shown in Figure 7. Indomethacin (20 mg / kg, p.o.) prevented the formation of carrageenan-induced paw oedema at 2 h ( $p < 0.05$ ) and 4 h ( $p < 0.01$ ) after carrageenan administration (ipl.). Nac, curcumin and the physical mixture of curcumin+Nac (Mix) at 0.3 mg / kg, were not effective in reducing the oedema induced by carrageenan in the right hind paw of the animals. Mice pretreated with the effective dose of curcumin (50 mg / kg) presented a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in the paw oedema 1 h after the i.pl. injection of carrageenan, only. The cocrystal significantly prevented the paw oedema at 1 ( $p < 0.05$ ), 2 ( $p < 0.001$ ) and 4 h ( $p < 0.001$ ) after carrageenan injection (ipl.). Rocha et al.<sup>73</sup>, reported that microparticles of carnauba wax containing curcumin reduce the oedema formation 4 h after carrageenan injection. However, the microparticles were only capable of reducing the oedema at 400 mg/kg, p.o.<sup>73</sup> Herein, the cocrystal was effective at 0.3 mg/kg, and its anti-inflammatory effects lasted for 4 h after the oral administration, which represents a significant improvement in the anti-inflammatory potency.



**Figure 8** Effect of cocrysal on paw oedema induced by carrageenan in mice. Animals ( $n = 25$  / group) were orally treated with curcumin at the effective (Curc 50 mg/kg) and sub-effective (Curc 0.3 mg/kg) doses, n-acetylcysteine (Nac 0.3 mg / kg), curcumin+N-acetylcysteine physical mixture in a 1:1 M ratio (Mix) at 0.3 mg/kg, and cocrysal at 0.3 mg/kg (Cocrysal 0.3), 1 h prior to the i.pl. injection of carrageenan (300  $\mu$ g in 0.9% NaCl, 20 $\mu$ L) in the right hind paw. Indomethacin (20 mg / kg, p.o.) was used as the positive control and the negative control group received the vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80) used to dissolve the substances used (10 ml / kg, p.o.). Measurements were performed at 30 min, 1, 2, 4 and 8 h after the i.pl. injection of carrageenan. Mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA, followed by Tukey's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  different from the Vehicle-treated group.

Carrageenan-induced paw oedema is characterized by three stages that correlate with the mediators involved. The first stage occurs in the first 90 min of the test, which is related to the release of histamine and serotonin, responsible for vasodilation and increased vascular permeability, triggering the onset of the inflammatory process. The second stage occurs from 90 to 150 min after carrageenan injection and is associated with increased blood vessel permeability and prostacyclin biosynthesis. The last stage, after 150 min, involves an increase in the synthesis of prostaglandins in the inflamed tissue, and infiltration of polymorphonuclear leukocytes<sup>74</sup>.

The anti-inflammatory effect of curcumin involves the inhibition of the COX-2 enzyme and NF- $\kappa$ B and reducing the synthesis / release of pro-inflammatory mediators, such as cytokines and free radicals that are derived from oxygen and nitrogen<sup>75</sup>. Herein, the animals treated with curcumin at 50 mg/kg presented a significant reduction in the paw oedema, demonstrating its anti-inflammatory effect. However, this effect lasted for only 1 h, which could be related to curcumin's low solubility, low bioavailability, and rapid elimination from the organism<sup>7</sup>.

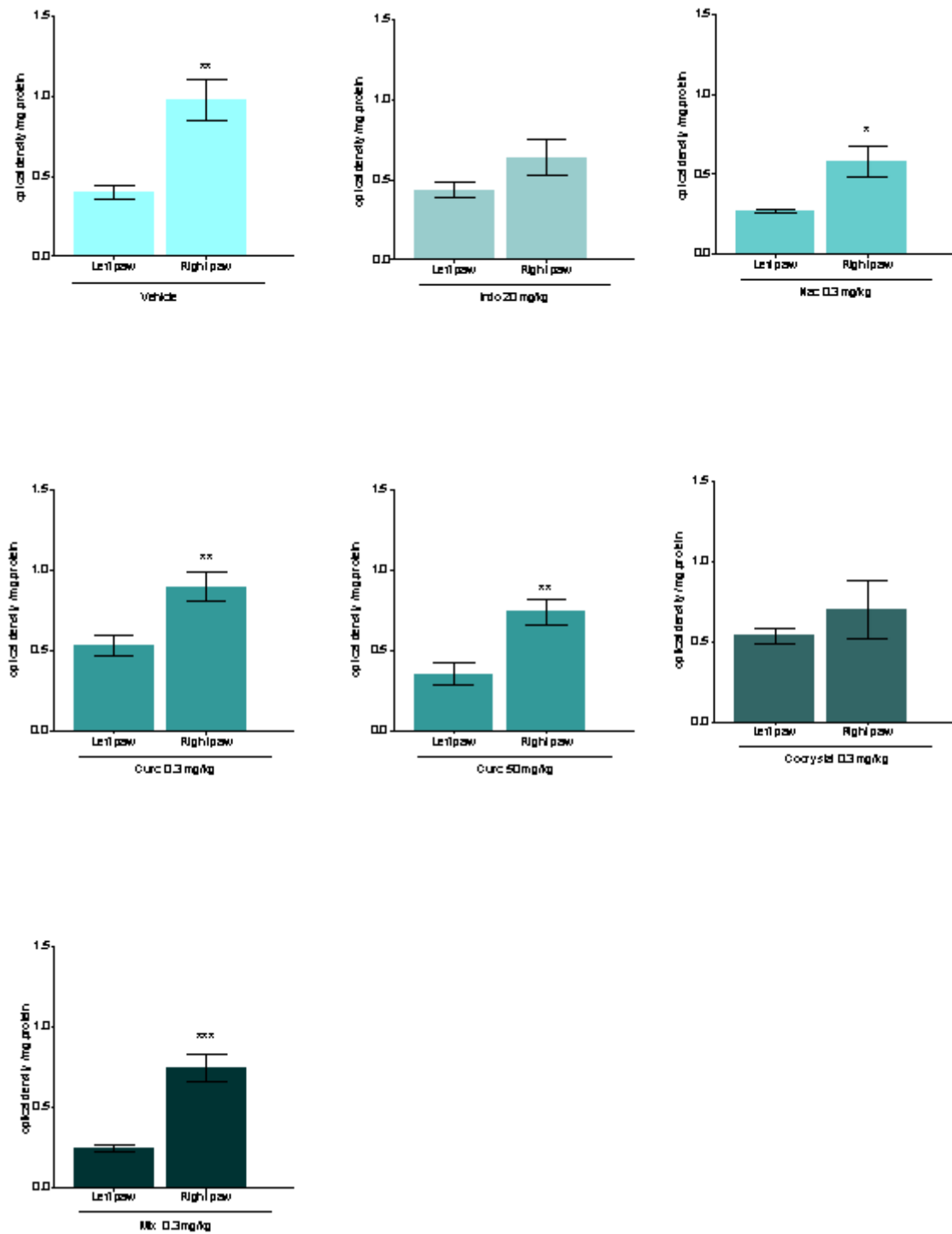
The cocrysal showed significant activity between the first and second stages of the carrageenan-induced paw oedema test, which indicates that its performance could be related to a decrease in release of histamine and serotonin in the first hour followed by reduced

prostaglandin biosynthesis. Considering that the pharmacological effects of curcumin can only be achieved if pharmacologically active plasma and tissue concentrations are reached<sup>73</sup>, the increase in curcumin's potency and duration of anti-inflammatory effect after cocrystallization are probably related to the improvement in its solubility, that could favor absorption. Furthermore, it is possible to suggest the occurrence of a synergistic interaction between the anti-inflammatory action of Nac and curcumin elicited by the cocrystallization.

#### **4.10.8 Myeloperoxidase activity**

Myeloperoxidase (MPO) is a member of the heme peroxidase and cyclooxygenase enzyme family and is located predominantly in neutrophils, with lower concentrations observed in monocytes and macrophages. As part of the immune system's response, MPO is released from neutrophil granules to phagolysosomes and plasma, where it catalyzes the conversion of hydrogen peroxide and chloride ions into hypochlorous acid<sup>76</sup>. MPO activity is an indirect marker of neutrophil activity, which means that the activity of this enzyme in the tissue is related to the infiltration of neutrophils. It is well known that the i.pl. injection of carrageenan elicits an increase in MPO activity in the plantar surface tissue due to the occurrence of an intense cellular recruitment<sup>77</sup>.

To evaluate the protective effect of the cocrystal on the inflammatory response induced by carrageenan, paw tissue samples from the animals submitted to the carrageenan-induced paw oedema test were collected, and the MPO activity in the tissue was verified (Figure 8). Vehicle-treated animals presented a significant ( $p < 0.01$ ) increase in the MPO activity in the right hind paw (carrageenan-injected) compared to the left hind paw (injected with 0.9% NaCl).



**Figure 9** Effect of the cocystal on the myeloperoxidase activity (optical density / mg protein) of carrageenan-injected (Right paw) and 0.9% NaCl-injected (Left paw) paw tissues. The animals were orally treated with vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80, 10 mL/kg); Indomethacin (20 mg / kg, positive control), n-acetylcysteine (Nac) at 0.3 mg / kg; curcumin at 50 mg/kg (Curc 50 mg / kg) or 0.3 mg / kg (Curc 0.3 mg / kg) or Cocystal (0.3 mg/kg), 1 h before the injection of carrageenan (in the right hind paw) or saline (in the left hind paw). Mean  $\pm$  S.E.M. Unpaired t-test, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

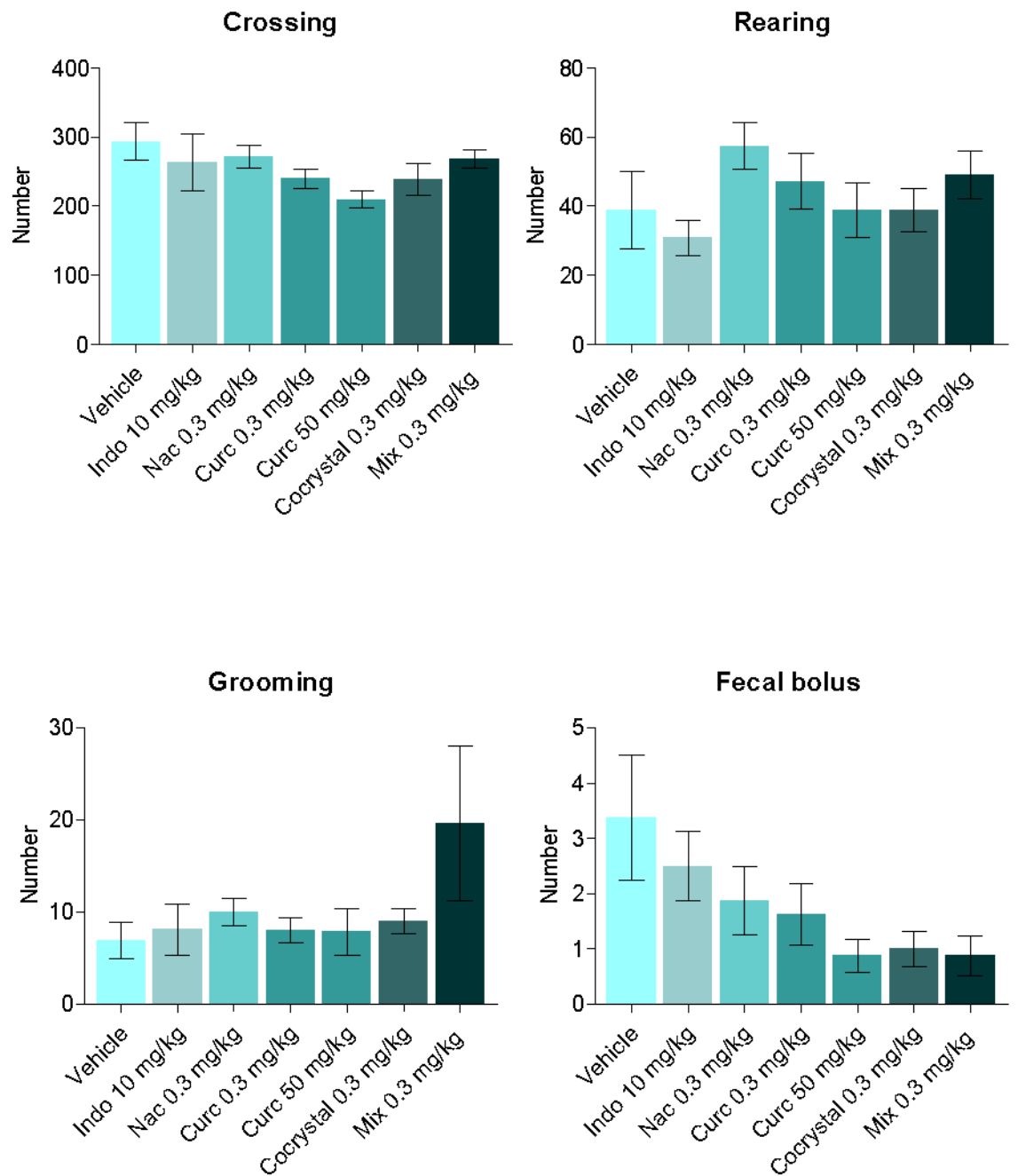
Indomethacin, as expected, prevented the increase in MPO activity induced by carrageenan. Nevertheless, Nac (0.3 mg / kg) was not able to inhibit the increase in MPO activity triggered by carrageenan injection. According to recent studies, curcumin decreases tissue MPO activity<sup>73-78</sup>. However, our findings demonstrate that curcumin at 0.3 mg/kg and 50 mg/kg was not able to reduce the MPO activity in the carrageenan-injected paw. The low solubility and rapid metabolism of curcumin<sup>73</sup> are probably related to this result, since the animals treated with the cocrystal did not show a significant increase in MPO levels in the carrageenan-injected paw when compared to the paw injected with 0.9% NaCl.

These results are in accordance with the antichemotactic *in vitro* assay, since the cocrystal was able to decrease the leukocyte migration at a lower concentration when compared to Nac and curcumin tested individually. Additionally, the cocrystallization of curcumin allowed a significant reduction in its minimum effective dose (~166 times) *in vivo*. Considering that the solubility of drugs directly influences their bioavailability<sup>79</sup>, we suggest that the increase in curcumin potency after cocrystallization is probably due to its greater solubility in acidic and neutral pH, which favors greater absorption in the gastrointestinal system and, consequently, greater bioavailability. Furthermore, Nac also presents anti-inflammatory<sup>24</sup> and antichemotactic activity *in vivo*<sup>69</sup>, which could contribute to the observed effects.

#### **4.10.9 Locomotor and exploratory activities and motor coordination**

Considering that a possible non-specific effect of the cocrystal on mice locomotor and exploratory activities and motor coordination could elicit false positive or negative results and, therefore, impact the results of the nociceptive tests<sup>80</sup>, we performed the open-field (Figure 9) and rota-rod (Table 2) tests.

The animals treated with indomethacin (10 mg / kg), Nac (0.3 mg / kg), curcumin at 0.3 and 50 mg/kg, cocrystal (0.3 mg / kg), or the physical mixture of curcumin+Nac (Mix, 0.3 mg/ kg) presented the same number of crossings, rearings, groomings and fecal bolus expelled as the vehicle-treated animals.



**Figure 10** Effect of the cocrystal on the locomotor activity of mice, assessed by the open field test.: number of crossings, number of rearings, number of groomings and number of fecal bolus. Mice ( $n = 8$  / group) were orally treated with curcumin in the effective dose of 50 mg/kg (Curc 50) and sub-effective dose of 0.3 mg/kg (Curc 0.3), n-acetylcysteine at 0.3 mg/kg (Nac 0.3), curcumin+N-acetylcysteine physical mixture in a 1:1 M ratio (Mix) at 0.3 mg/kg, and cocrystal at 0.3 mg/kg (Cocrystal 0.3), 1 h prior to the test. Indomethacin (10 mg/kg, p.o.) was used as the positive control and the negative control group received the vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80) used to dissolve the substances used (10 ml/kg, p.o.). Mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA.

Moreover, in the rota-rod test (Table 2), mice treated with indomethacin (10 mg / kg), Nac (0.3 mg / kg), curcumin at 0.3 and 50 mg/kg, cocrystal (0.3 mg / kg), or the physical mixture of curcumin+Nac (Mix, 0.3 mg/ kg) presented the same permanence time (s) and number of falls as the vehicle-treated animals. These results are particularly interesting, since none of the substances at the tested doses elicited an impairment in the locomotor activity neither in the motor coordination of mice, which could trigger false positive results in the behavioral tests <sup>41</sup>.

**Table 2** Effect of the cocrystal on the motor coordination of mice, assessed by the rota-rod test. The animals were treated orally with Vehicle (0.9% NaCl + 1% polysorbate 80), Indomethacin (10 mg / kg), curcumin (Curc 0.3) in the sub-effective dose (0.3 mg/kg), curcumin (Curc 50) at the effective dose (50 mg/kg), Cocrystal (0.3 mg/kg), n-acetylcysteine (Nac 0.3) (0.3 mg / kg) and Curc+Nac physical mixture (Mix) in a 1:1 M ratio (0.3 mg/kg) 1 h before the test. The results are shown as mean  $\pm$  S.E.M. and were analyzed by one-way ANOVA.

Group	Length of stay (s)	Number of falls
Vehicle	299.3 $\pm$ 0.75	0.12 $\pm$ 0.12
Indomethacin	299.3 $\pm$ 0.49	0.25 $\pm$ 0.16
Cocrystal	297.3 $\pm$ 1.46	0.37 $\pm$ 0.26
Curc 50	296.6 $\pm$ 2.36	0.25 $\pm$ 0.16
Curc 0.3	300.0	0.0
Nac	300.0	0.0
Mix	300.0	0.0

## CONCLUSIONS

In conclusion, our results show that the formation of curcumin-Nac cocrystal using GAS method with scCO<sub>2</sub> successfully occurred. The results demonstrate the improvement in

cocrystal solubility compared to pure curcumin, related to a new weaker crystalline structure. Consequently, an increase in curcumin anti-inflammatory potency was observed experimentally, which could be due to an improvement in its bioavailability and/or synergistic interaction with Nac. Our results point to the curcumin-Nac cocrystal as a promising new anti-inflammatory agent, considering the positive *in vitro* and *in vivo* results achieved.

**Declarations of interest:** none

#### **Author contributions**

ANNA M. SIEBEL, J. VLADIMIR OLIVEIRA AND LIZ G. MÜLLER CONCEIVED AND DESIGNED THIS STUDY. ALESSANDRO R. PAULAZZI, BIANCA O. ALVES, GABRIELA A. L. ZILLI, ALINE E. DOS SANTOS, FERNANDA PETRY, KRISSIE D. SOARES, LETÍCIA J. DANIELLI, JEFFERSON PEDROSO, MIRIAM A. APEL AND GEAN PABLO S. AGUIAR PERFORMED EXPERIMENTS AND ANALYZED THE DATA. ALESSANDRO R. PAULAZZI, GEAN PABLO S. AGUIAR, ANNA M. SIEBEL, J. VLADIMIR OLIVEIRA AND LIZ G. MÜLLER DRAFTED AND REVISED THE MANUSCRIPT. THE MANUSCRIPT HAS BEEN REVIEWED AND APPROVED BY ALL AUTHORS.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number 830346 / 1999-6) and Community University of Chapecó Region [Artigo 311 170-CE, grant number 013/2019; PIBIC-FAPE grant number 032/2019]. The authors thank CNPq and Unochapecó for the financial support and scholarships.

#### **REFERENCES**

1. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother.* 2004;58(3):173-182. doi:10.1016/j.biopha.2004.02.001
2. Kotbantao G, Charoenchaitrakool M. Processing of ketoconazole-4-aminobenzoic acid cocrystals using dense CO<sub>2</sub> as an antisolvent. *J CO<sub>2</sub> Util.* 2017;17:213-219. doi:10.1016/j.jcou.2016.12.007
3. Kavanagh ON, Croker DM, Walker GM, Zaworotko MJ. Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application. *Drug Discov Today.* 2019;24(3):796-804. doi:10.1016/j.drudis.2018.11.023



4. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* 2012;2012(100 mL):1-10. doi:10.5402/2012/195727
5. Charoenchaitrakool M, Polchiangdee C, Srinophakun P. Production of theophylline and polyethylene glycol 4000 composites using Gas Anti-Solvent (GAS) process. *Mater Lett.* 2009;63(1):136-138. doi:10.1016/j.matlet.2008.09.041
6. Liu Z, Smart JD, Pannala AS. Recent developments in formulation design for improving oral bioavailability of curcumin: A review. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020;60(September):102082. doi:10.1016/j.jddst.2020.102082
7. Kurien BT, Singh A, Matsumoto H, Scofield RH. Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. *Assay Drug Dev Technol.* 2007;5(4):567-576. doi:10.1089/adt.2007.064
8. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods.* 2017;6(10):92. doi:10.3390/foods6100092
9. Singh RK, Rai D, Yadav D, Bhargava A, Balzarini J, De Clercq E. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *Eur J Med Chem.* 2010;45(3):1078-1086. doi:10.1016/j.ejmech.2009.12.002
10. Shishu, Kaur IP. Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: The structural requirement. *Food Chem.* 2008;111(3):573-579. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.022
11. Tavaf Z, Dangolani SK, Yousefi R, Panahi F, Shahsavani MB, Khalafi-Nezhad A. Synthesis of new curcumin derivatives as influential antidiabetic  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors with anti-oxidant activity. *Carbohydr Res.* 2020;494(February):108069. doi:10.1016/j.carres.2020.108069
12. Sharma A, Yadav A, Gupta N, et al. Multifunctional mesoporous curcumin encapsulated iron-phenanthroline nanocluster: A new Anti-HIV agent. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2019;180(April):289-297. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.04.057
13. Kharat M, Skrzynski M, Decker EA, McClements DJ. Enhancement of chemical stability of curcumin-enriched oil-in-water emulsions: Impact of antioxidant type and concentration. *Food Chem.* 2020;320(December 2019):126653. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126653
14. Zhao X, Xu Y, Zhao Q, Chen CR, Liu AM, Huang ZL. Curcumin exerts antinociceptive effects in a mouse model of neuropathic pain: Descending monoamine system and opioid receptors are differentially involved. *Neuropharmacology.* 2012;62(2):843-854. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.050
15. Sorasitthyanukarn FN, Muangnoi C, Thaweeseest W, Rojsitthisak P, Rojsitthisak P. Enhanced cytotoxic, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin diethyl disuccinate using chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019;53(June):101118. doi:10.1016/j.jddst.2019.06.015
16. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(2):85-94. doi:10.1016/j.tips.2008.11.002
17. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis.* 2007;28(8):1765-1773. doi:10.1093/carcin/bgm123
18. Perpétuo GL, Chierice GO, Ferreira LT, et al. A combined approach using differential

- scanning calorimetry with polarized light thermomicroscopy in the investigation of ketoprofen and nicotinamide cocrystal. *Thermochim Acta*. 2017;651:1-10. doi:10.1016/j.tca.2017.02.014
19. Liu L, Zou D, Zhang Y, et al. Pharmaceutical salts/cocrystals of enoxacin with dicarboxylic acids: Enhancing in vitro antibacterial activity of enoxacin by improving the solubility and permeability. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020;154(May):62-73. doi:10.1016/j.ejpb.2020.06.018
  20. Teng R, Wang L, Chen M, et al. Amino acid based pharmaceutical cocrystals and hydrate cocrystals of the chlorothiazide: Structural studies and physicochemical properties. *J Mol Struct*. 2020;1217:128432. doi:10.1016/j.molstruc.2020.128432
  21. Imchalee R, Charoenchaitrakool M. Gas anti-solvent processing of a new sulfamethoxazole-l-malic acid cocrystal. *J Ind Eng Chem*. 2015;25:12-15. doi:10.1016/j.jiec.2014.11.009
  22. PDekhuijzen. N., van Beurden WJ. The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2006;1(2):99-106. doi:10.2147/copd.2006.1.2.99
  23. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(4):355-359. doi:10.1016/j.coph.2007.04.005
  24. Berk M, Malhi GS, Gray LJ, Dean OM. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(3):167-177. doi:10.1016/j.tips.2013.01.001
  25. Manniello MD, Del Gaudio P, Aquino RP, Russo P. Clarithromycin and N-acetylcysteine co-spray-dried powders for pulmonary drug delivery: A focus on drug solubility. *Int J Pharm*. 2017;533(2):463-469. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.079
  26. Neurohr C, Revelli AL, Billot P, et al. Naproxen-nicotinamide cocrystals produced by CO<sub>2</sub> antisolvent. *J Supercrit Fluids*. 2013;83:78-85. doi:10.1016/j.supflu.2013.07.008
  27. Coen EM, Quinn JF, Dehghani F, Foster NR, Davis TP. Molecular weight fractionation of poly(methyl methacrylate) using Gas Anti-Solvent techniques. *Polymer (Guildf)*. 2003;44(12):3477-3481. doi:10.1016/S0032-3861(03)00288-X
  28. Kim SJ, Lee BM, Lee BC, Kim HS, Kim H, Lee YW. Recrystallization of cyclotetramethylenetetranitramine (HMX) using gas anti-solvent (GAS) process. *J Supercrit Fluids*. 2011;59:108-116. doi:10.1016/j.supflu.2011.07.016
  29. Flaibani M, Elvassore N. Gas anti-solvent precipitation assisted salt leaching for generation of micro- and nano-porous wall in bio-polymeric 3D scaffolds. *Mater Sci Eng C*. 2012;32(6):1632-1639. doi:10.1016/j.msec.2012.04.054
  30. Dehghani F, Foster NR. Dense gas anti-solvent processes for pharmaceutical formulation. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2003;7(4-5):363-369. doi:10.1016/j.cossms.2003.11.001
  31. Moneghini M, Kikic I, Voinovich D, et al. Study of the solid state of carbamazepine after processing with gas anti-solvent technique. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003;56(2):281-289. doi:10.1016/S0939-6411(03)00092-4
  32. Douroumis D, Ross SA, Nokhodchi A. Advanced methodologies for cocrystal synthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;117:178-195. doi:10.1016/j.addr.2017.07.008
  33. Pessoa AS, Aguiar GPS, Vladimir Oliveira J, Bortoluzzi AJ, Paulino A, Lanza M. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent. *J Supercrit Fluids*. 2019;145(August 2018):93-102. doi:10.1016/j.supflu.2018.11.014
  34. Martello RH, Gallon C, Alijar Souza M, et al. Micronization of thymol by RESS and its larvicidal activity against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Ind Crops Prod*.

- 2019;139(February):111495. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111495
35. Lopes CW, Bertella F, Finger PH, Dallago RM, Pergher SBC, Penha FG. Synthesis and characterization of activated carbons derived from corn cob. *Perspectiva*. 2013;37(139):27-35.
  36. Ribas MM, Sakata GSB, Santos AE, et al. Curcumin cocrystals using supercritical fluid technology. *J Supercrit Fluids*. 2019;152:104564. doi:10.1016/j.supflu.2019.104564
  37. Dal Magro C, Aguiar GPS, Venerai JG, et al. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. *J Supercrit Fluids*. 2017;127(February):182-190. doi:10.1016/j.supflu.2017.03.025
  38. Aguiar GPS, Arcari BD, Chaves LMPC, et al. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. *Ind Crops Prod*. 2018;112(October 2017):1-5. doi:10.1016/j.indcrop.2017.11.008
  39. Suyenaga ES, Konrath EL, Dresch RR, et al. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. *Planta Med*. 2011;77(7):698-704. doi:10.1055/s-0030-1250516
  40. Brasil. Lei no 11794, de 8 de outubro de 2008. Constituição Federal. 2008.
  41. Scapinello J, Müller LG, Schindler MSZ, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae). *J Ethnopharmacol*. 2019;236(January):21-30. doi:10.1016/j.jep.2019.02.037
  42. SRIMAL RC, DHAWAN BN. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol*. 1973;25(6):447-452. doi:10.1111/j.2042-7158.1973.tb09131.x
  43. Souza MA, Guzatti JGG, Martello RH, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Aloysia gratissima* leaves and evaluation of anti-inflammatory activity. *J Supercrit Fluids*. 2020;159. doi:10.1016/j.supflu.2020.104753
  44. Trevisan G, Rossato MF, Walker CIB, et al. Identification of the plant steroid  $\alpha$ -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;343(2):258-269. doi:10.1124/jpet.112.195909
  45. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
  46. Bradley, Peter P; Priebat, Dennis A; Christensen, Robert D; Rothstein G. Metodo Bradley Para Verificar Mpo.Pdf. *J Invest Dermatol*. 1982;78:206-209.
  47. Müller LG, Salles LA, Stein AC, et al. Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2012;36(1):101-109. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.08.015
  48. Galeotti N, Ghelardini C, Caldari B, Bartolini A. Effect of potassium channel modulators in mouse forced swimming test. *Br J Pharmacol*. 1999;126(7):1653-1659. doi:10.1038/sj.bjp.0702467
  49. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Díaz-Alperi J, Ramírez A. The curcuma antioxidants: Pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Arch Gerontol Geriatr*. 2002;34(1):37-46. doi:10.1016/S0167-4943(01)00194-7
  50. Osol, A. (ed.). Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1980., p. 805.
  51. Zhang Q, Suntsova L, Chistyachenko YS, et al. Preparation, physicochemical and pharmacological study of curcumin solid dispersion with an arabinogalactan complexation agent. *Int J Biol Macromol*. 2019;128:158-166. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.079

52. Schultheiss N, Newman A. 2009 Reviews. 2009;9(6). doi:10.1021/cg900129f
53. de Almeida AC, Torquetti C, Ferreira PO, et al. Cocrystals of ciprofloxacin with nicotinic and isonicotinic acids: Mechanochemical synthesis, characterization, thermal and solubility study. *Thermochim Acta*. 2020;685(August 2019):178346. doi:10.1016/j.tca.2019.178346
54. Goud NR, Suresh K, Sanphui P, Nangia A. Fast dissolving eutectic compositions of curcumin. *Int J Pharm*. 2012;439(1-2):63-72. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.09.045
55. Onoue S, Takahashi H, Kawabata Y, Seto Y, Hatanaka J, Timmermann B, et al. 2010. Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. *J Pharma. Sci*. 99 (4). 1871-1881. <https://doi.org/10.1002/jps.21964>
56. Kurniawansyah F, Duong HTT, Luu TD, et al. Inhalable curcumin formulations: Micronization and bioassay. *Chem Eng J*. 2015;279:799-808. doi:10.1016/j.cej.2015.05.087
57. Sathisaran I, Devidas Bhatia D, Vishvanath Dalvi S. New curcumin-trimesic acid cocrystal and anti-invasion activity of curcumin multicomponent solids against 3D tumor models. *Int J Pharm*. 2020;587(June):119667. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119667
58. Ribas MM, Aguiar GPS, Muller LG, Siebel AM, Lanza M, Oliveira JV. Curcumin-nicotinamide cocrystallization with supercritical solvent (CSS): Synthesis, characterization and in vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities. *Ind Crops Prod*. 2019;139(July):111537. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111537
59. Waterbeemd HV, Testa B. Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability. 2<sup>nd</sup> Ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2008.
60. Murphy, P.M., Tiffany, H.L. 1991. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Sci*. 253. 1280-1283. <https://doi.org/10.1126/science.1891716>
61. Lelli D, Sahebkar A, Johnston TP, Pedone C. Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives. *Pharmacol Res*. 2017;115:133-148. doi:10.1016/j.phrs.2016.11.017
62. Khor PY, Mohd Aluwi MFF, Rullah K, Lam KW. Insights on the synthesis of asymmetric curcumin derivatives and their biological activities. *Eur J Med Chem*. 2019;183:111704. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111704
63. Rahardjo B, Widjajanto E, Sujuti H, Keman K. Curcumin decreased level of proinflammatory cytokines in monocyte cultures exposed to preeclamptic plasma by affecting the transcription factors NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$ . *Biomarkers Genomic Med*. 2014;6(3):105-115. doi:10.1016/j.bgm.2014.06.002
64. Woo MS, Jung SH, Kim SY, et al. Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(4):1017-1025. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.174
65. Tai CY, Cheng CS. Supersaturation and crystal growth in gas anti-solvent crystallization. *J Cryst Growth*. 1998;183(4):622-628. doi:10.1016/S0022-0248(97)00498-3
66. Hidaka H, Ishiko T, Furuhashi T, et al. Curcumin inhibits interleukin 8 production and enhances interleukin 8 receptor expression on the cell surface: Impact on human pancreatic carcinoma cell growth by autocrine regulation. *Cancer*. 2002;95(6):1206-1214. doi:10.1002/cncr.10812
67. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA. Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF- $\kappa$ B Activation and Proinflammatory Gene Expression by

- Inhibiting Inhibitory Factor I-  $\kappa$  B Kinase Activity. Published online 2020.
68. Takahashi, M., Ishiko, T., Kamohara, H., Hidaka, H., Ikeda, O., Ogawa, M., Baba, H. 2007. Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) blocks the chemotaxis of neutrophils by inhibiting signal transduction through IL-8 receptors. *Mediators Inflamm.* 2007. <https://doi.org/10.1155/2007/10767>
  69. Mottahedin A, Blondel S, Ek J, et al. N-acetylcysteine inhibits bacterial lipopeptide-mediated neutrophil transmigration through the choroid plexus in the developing brain. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):1-16. doi:10.1186/s40478-019-0877-1
  70. Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2016). Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?. *Front. Immunol.* 7 (160). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>
  71. Ngkelo, A., Meja, K., Yeadon, M., Adcock, I., Kirkham, P.A. 2012. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and  $G_{i\alpha}$  dependent PI-3kinase signalling. *J. Inflamm.* 9 (1). <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-1>.
  72. Cunha FVM, do Nascimento Caldas Trindade G, da Silva Azevedo PS, et al. Ethyl ferulate/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex inhibits edema formation. *Mater Sci Eng C.* 2020;115(March):111057. doi:10.1016/j.msec.2020.111057
  73. Rocha BA da, Francisco CRL, Almeida M de, et al. Antiinflammatory activity of carnauba wax microparticles containing curcumin. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020;59(April). doi:10.1016/j.jddst.2020.101918
  74. Carvalho AMR. Study of the antinociceptive and antiinflammatory activity of riparina II (O-methyl-N-2-hydroxy-benzoyl tyramine) in experimental models. Master Thesis. 2011 (accessed on september 12<sup>th</sup>, 2020) <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/2192>
  75. Al-Rohaimi AH. Comparative anti-inflammatory potential of crystalline and amorphous nano curcumin in topical drug delivery. *J Oleo Sci.* 2015;64(1):27-40. doi:10.5650/jos.ess14175
  76. Shaw SA, Vokits BP, Dilger AK, et al. Discovery and structure activity relationships of 7-benzyl triazolopyridines as stable, selective, and reversible inhibitors of myeloperoxidase. *Bioorganic Med Chem.* 2020;28(22):115723. doi:10.1016/j.bmc.2020.115723
  77. De Almeida M, Da Rocha BA, Francisco CRL, et al. Evaluation of the: In vivo acute antiinflammatory response of curcumin-loaded nanoparticles. *Food Funct.* 2018;9(1):440-449. doi:10.1039/c7fo01616f
  78. Franck T, Aldib I, Zouaoui Boudjeltia K, et al. The soluble curcumin derivative NDS27 inhibits superoxide anion production by neutrophils and acts as substrate and reversible inhibitor of myeloperoxidase. *Chem Biol Interact.* 2019;297(June 2018):34-43. doi:10.1016/j.cbi.2018.10.008
  79. Pindelska E, Sokal A, Kolodziejcki W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;117:111-146. doi:10.1016/j.addr.2017.09.014
  80. Rodrigues, A.L.S., Rocha, J.B., Mello, C.F., Souza, D.O.. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. Toxicol.* 1996;79. 150-156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00259.x>

## CAPÍTULO 5

### 5 CONCLUSÃO E SUGESTÕES

#### ■ CONCLUSÃO

A cocristalização utilizando tecnologia supercrítica com uso de dióxido de carbono supercrítico como antissolvente pela metodologia GAS foi realizada com sucesso. A confirmação se deu pelos testes de DSC, DRX e SEM, onde é possível concluir que ocorreu a formação de um cocristal. Este cocristal demonstrou aumento significativo na solubilidade em todos as soluções testadas, o que pode aumentar a biodisponibilidade da curcumina.

No teste de atividade anti-quimiotóxica *in vitro*, o cocristal demonstrou atividade superior à curcumina pura e ao coformador em todas as concentrações testadas, indicando um potencial anti-inflamatório superior à curcumina pura.

A partir dos testes *in vivo*, é possível concluir que a atividade anti-inflamatória da curcumina foi potencializada pela cocristalização, uma vez que a dose mínima efetiva do cocristal nos testes foi menor (~166 vezes) que a dose efetiva de curcumina pura. Adicionalmente, no teste de edema de pata induzido por carragenina, o efeito anti-inflamatório do cocristal manteve-se significativo por um período maior que o da curcumina pura, o que indica que a cocristalização resulta em uma melhoria no perfil farmacocinético da curcumina, possivelmente associada à maior biodisponibilidade e tempo de meia vida. Esse resultado é corroborado pela atividade da enzima mieloperoxidase (indicativa de infiltração neutrofílica) no tecido plantar dos animais tratados com o cocristal, que não apresentaram o aumento significativo na atividade enzimática observado no grupo de animais tratados com a curcumina pura.

#### ■ SUGESTÕES

Verificar os perfis de dissolução *in vitro* dos cocristais em fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulado;

Verificar perfis de dissolução *in vivo*;

Realizar estudo farmacocinético completo do cocristal;

Testar o potencial do cocristal sobre parâmetros de estresse oxidativo *in vivo*;

Verificar o efeito do cocrystal em modelos de doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson e Alzheimer.

Verificar o potência antioxidante do cocrystal;

## REFERÊNCIAS

AAKERÖY, C. B.; FORBES, S.; DESPER, J. Cocrystals to Systematically Modulate Aqueous Solubility and Melting Behavior Behavior of an Anticancer Drug. 2009.

AGUIAR, G. P. S. et al. 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.

AGUIAR, G. P. S. et al. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. October 2017, p. 1–5, 2018.

AKBARI, S. et al. Curcumin as a preventive or therapeutic measure for chemotherapy and radiotherapy induced adverse reaction: a comprehensive review. **Food and chemical toxicology**. 2020, 111699

ALMEIDA, M. C. et al. Effect of gamma radiation processing on turmeric: Antioxidant activity and curcumin content. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 152, n. June, p. 12–16, 2018.

ANAND, P. et al. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics** v. 4, n. 6, p. 807–818, 2017

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.

ANTONY, B. et al. 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.

ARULSELVAN, P. et al. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

BAHAMONDE, S. M. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliodendron diffusum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 699-705, 2013.

BATISTA, E. K. F. et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433–441, 2016.

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

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

CUNHA, F. V. M. et al. Ethyl ferulate/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex inhibits edema formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 115, n. March, p. 111057, 2020.

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

DAL MAGRO, C. et al. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, n. February, p. 182–190, 2017.

DAVIES N. M. et. al. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? Not as easy as 1, 2, 3. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v.7, n.2, p. 217-226, 2004.

DESIRAJU, G. R. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering-A. *Angrn. Clwm In/ Ed. Engl.*, v. 31, p. 2311-2321, 1995.

DOUROUMIS, D.; ROSS, S. A.; NOKHODCHI, A. Advanced methodologies for cocrystal synthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 178–195, 2017.

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.

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



GOEL, A.; BOLAND, C. R.; CHAUHAN, D. P. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 ( COX-2 ) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells q. v. 172, p. 111–118, 2001.

GOLAN, DAVID E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GOUD, N. R. et al. Fast dissolving eutectic compositions of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1–2, p. 63–72, 2012.

GUERAIN, M. et al. Polymorphism and stability of ibuprofen/nicotinamide cocrystal: The effect of the crystalline synthesis method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 584, n. May, 2020.

HAMAGUCHI, T.; ONO, K.; YAMADA, M. Curcumin and Alzheimer ' s Disease. v. 16, p. 285–297, 2010.

HE, Y. et al. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: How are they linked? **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9183–9213, 2015.

HEMAMALINI, M. et al. Investigation of supramolecular synthons and structural characterisation of aminopyridine-carboxylic acid derivatives. p. 1–9, 2014.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-  $\kappa$  B signaling in inflammation and cancer. p. 1–15, 2013.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of high pressure homogenization on physicochemical properties of curcumin nanoparticles prepared by antisolvent crystallization using HPMC or PVP. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, n. September 2018, p. 185–196, 2019.

IKEDA, K. et al. Infection of the inguinal region treated by musculocutaneous flaps. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 9, n. 1, p. 51-56, 2001

IZUTSU, K. et al. Characterization and Quality Control of Pharmaceutical Cocrystals. p. 1–12, 2016.

JAIN, A.; YANG, G.; YALKOWSKY, S. H. Estimation of Melting Points of Organic Compounds. v. 3, n. V, p. 7618–7621, 2004.

JAVIDI, M. A. et al. Investigating curcumin potential for diabetes cell therapy, in vitro and in vivo study. **Life Sciences**, v. 239, p. 116908, 2019.

JONES, W.; MOTHERWELL, W. D. S.; TRASK, A. V. Pharmaceutical Cocrystals : An Emerging Approach to Physical Property. v. 31, n. November, p. 875–879, 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.

KAVANAGH, O. N. et al. Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 3, p. 796–804, 2019.

KELANY, M. E.; HAKAMI, T. M.; OMAR, A. H. **Curcumin improves the metabolic syndrome in high-fructose diet-fed rats: Role of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and oxidative stress.** [s.l: s.n.]. v. 95

KHARAT, M. et al. Enhancement of chemical stability of curcumin-enriched oil-in-water emulsions: Impact of antioxidant type and concentration. **Food Chemistry**, v. 320, n. December 2019, p. 126653, 2020.

KHOR, P. Y. et al. Insights on the synthesis of asymmetric curcumin derivatives and their biological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 111704, 2019.

KIM, S. J. et al. Recrystallization of cyclotetramethylenetetranitramine (HMX) using gas anti-solvent (GAS) process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 59, p. 108–116, 2011.

KOSTER R.; ANDERSON M.; DE-BEER E J. Ácido acético para rastreamento analgésico Fed Proc. 1959; 18; 412 – 418.

KURIEN, B. T. et al. Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 5, n. 4, p. 567–576, 2007.

KURNIAWANSYAH, F. et al. Improving the dissolution properties of curcumin using dense gas antisolvent technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 521, n. 1–2, p. 239–248, 2017.

LEE, G. et al. Analgesic effects of eucalyptus essential oil in mice. **Korean Journal of Pain**, v. 32, n. 2, p. 79–86, 2019.

LELLI, D. et al. Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives. **Pharmacological Research**, v. 115, p. 133–148, 2017.

LIN, H. L.; WU, T. K.; LIN, S. Y. Screening and characterization of cocrystal formation of metaxalone with short-chain dicarboxylic acids induced by solvent-assisted grinding approach. **Thermochimica Acta**, v. 575, p. 313–321, 2014.

LIU, L. et al. Pharmaceutical salts/cocrystals of enoxacin with dicarboxylic acids: Enhancing in vitro antibacterial activity of enoxacin by improving the solubility and permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 154, n. May, p. 62–73, 2020.

LIU, Z.; SMART, J. D.; PANNALA, A. S. Journal of Drug Delivery Science and Technology Recent developments in formulation design for improving oral bioavailability of curcumin : A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, n. September, p. 102082, 2020.

LONG, B.; RYAN, K. M.; PADRELA, L. European Journal of Pharmaceutical Sciences From batch to continuous — New opportunities for supercritical CO<sub>2</sub> technology in pharmaceutical manufacturing. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 137, n. December 2018, p. 104971, 2019.

LOPES, C. W. et al. Synthesis and characterization of activated carbons derived from corn cob. **Perspectiva**, v. 37, n. 139, p. 27–35, 2013.

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

MARTELLO, R. H. et al. Micronization of thymol by RESS and its larvicidal activity against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. February, p. 111495, 2019.

MATOS, R. L. et al. Chemical Engineering & Processing : Process Intensification Dense CO<sub>2</sub> technology : Overview of recent applications for drug processing / formulation / delivery. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 140, n. April, p. 64–77, 2019a.

MATOS, R. L. et al. Dense CO<sub>2</sub> technology: Overview of recent applications for drug processing/formulation/delivery. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 140, n. March, p. 64–77, 2019b.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. v. 454, n. July, 2008.

MONEGHINI, M. et al. Study of the solid state of carbamazepine after processing with gas anti-solvent technique. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 281–289, 2003.

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

MÜLLER, L. G. et al. Diene valepotrites from *Valeriana glechomifolia* prevent lipopolysaccharide-induced sickness and depressive-like behavior in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

MYTHRI, R. B.; BHARATH, M. M. S. Curcumin : A Potential Neuroprotective Agent in Parkinson ' s Disease. p. 91–99, 2012.

NELSON, K. M. et al. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 2017.

NENNIG, S. E.; SCHANK, J. R. The Role of NFκB in Drug Addiction : Beyond Inflammation. p. 1–8, 2017.

NEUROHR, C. et al. Naproxen-nicotinamide cocrystals produced by CO<sub>2</sub> antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 78–85, 2013.

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

PARVATHY, K. S.; NEGI, P. S.; SRINIVAS, P. Curcumin-amino acid conjugates: Synthesis, antioxidant and antimutagenic attributes. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 523–530, 2010.

PATOMCHAIWAT, V.; PAERATAKUL, O.; KULVANICH, P. Formation of inhalable rifampicin-poly(l-lactide) microparticles by supercritical anti-solvent process. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1119–1129, 2008.

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

PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability , Absorption and Metabolism of Curcumin : the Golden Pigment from Golden Spice. v. 46, n. 1, p. 2–18, 2014.]

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

RADU, B. M. et al. Neurovascular unit in chronic pain. Mediators inflammatory. v. 2013, n. 648268, p. 1-18, 2013.

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

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Rang e Dale: **farmacologia**. ed. 7, Rio de Janeiro, 2012.

RAO, P. E; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, ed.2, p. 81-110, 2008.

REICHARDT, C. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. 3. Weinheim: **WILEY-VCH**, 2006. 653

REN, S. et al. The effects of pH, surfactant, ion concentration, coformer, and molecular arrangement on the solubility behavior of myricetin cocrystals. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 1, p. 59–73, 2019.

RIBAS, M. M. et al. Curcumin cocrystals using supercritical fluid technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, p. 104564, 2019.

ROCHA, B. A. DA et al. Antiinflammatory activity of carnauba wax microparticles containing curcumin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, n. April, 2020.

RODRIGUES A. L. S. et. al. Effect of Perinatal Lead Exposure on Rat Behaviour in Open-Field and Two-My Avoidance Tasks. **Pharna. & Toxi.**, 1996; 79; 150-156.

RODRIGUES, M. et al. Pharmaceutical cocrystallization techniques. Advances and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 404–420, 2018.

RODRIGUES, M. et al. Considerations on high-throughput cocrystals screening by ultrasound assisted cocrystallization and vibrational spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 229, p. 117876, mar. 2020.

SARDO, M. et al. Diazole-based powdered cocrystal featuring a helical hydrogen-bonded network: Structure determination from PXRD, solid-state NMR and computer modeling. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 65, p. 49–63, 2015.

SARKAR, A.; ROHANI, S. Cocrystals of Acyclovir with Promising Physicochemical Properties. v. 2014, n. September 2014, p. 98–105, 2015.

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

SCHULTHEISS, N.; NEWMAN, A. 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.

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. et al. Pharmaceutical Cocystal Drug Products: An Outlook on Product Development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 12, p. 1033–1048, 2018.

SHAN, N. et al. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology Impact of pharmaceutical cocrystals : the effects on drug pharmacokinetics Impact of pharmaceutical cocrystals : the effects on drug pharmacokinetics. v. 5255, 2014.

SHARMA, A. et al. Multifunctional mesoporous curcumin encapsulated iron-phenanthroline nanocluster: A new Anti-HIV agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, n. April, p. 289–297, 2019.

SHAW, S. A. et al. Discovery and structure activity relationships of 7-benzyl triazolopyridines as stable, selective, and reversible inhibitors of myeloperoxidase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 22, p. 115723, 2020.

SHEKHAWAT, P. B.; POKHARKAR, V. B. Understanding peroral absorption : regulatory aspects and contemporary approaches to tackling solubility and permeability hurdles. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 3, p. 260–280, 2017.

SHISHU; KAUR, I. P. Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: The structural requirement. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 573–579, 2008.

SINGH, R. K. et al. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 1078–1086, 2010.

SINJARI, B. et al. Curcumin/liposome nanotechnology as delivery platform for anti-inflammatory activities via NFkB/ERK/pERK pathway in human dental pulp treated with 2-HydroxyEthyl MethAcrylate (HEMA). **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. June, p. 1–11, 2019.

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

SORASITTHIYANUKARN, F. N. et al. Enhanced cytotoxic, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin diethyl disuccinate using chitosan-tripolyphosphate

nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, n. June, p. 101118, 2019.

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

SU, H. et al. Syntheses and characterizations of two curcumin-based cocrystals. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 55, p. 92–95, 2015.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. *Quim. Nova.*, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

SUYENAGA, E. S. et al. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Medica**, v. 77, n. 7, p. 698–704, 2011.

TAVAF, Z. et al. Synthesis of new curcumin derivatives as influential antidiabetic  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors with anti-oxidant activity. **Carbohydrate Research**, v. 494, n. February, p. 108069, 2020.

TENG, R. et al. Amino acid based pharmaceutical cocrystals and hydrate cocrystals of the chlorothiazide: Structural studies and physicochemical properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1217, p. 128432, 2020.

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.

VERMA, P. R. et al. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 102, n. 2, p. 298–301, 2005.

WALSH, D. et al. Production of cocrystals in an excipient matrix by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 536, n. 1, p. 467–477, 2018.

WANG, Y. J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 1867-1876, 1997.

WATSON, N. et al. Chronic inflammation – inflammaging – in the ageing cochlea : A novel target for future presbycusis therapy. v. 40, n. October, p. 142–148, 2017.

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.

ZHAO, X. et al. Curcumin exerts antinociceptive effects in a mouse model of neuropathic pain: Descending monoamine system and opioid receptors are differentially involved. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 843–854, 2012.

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



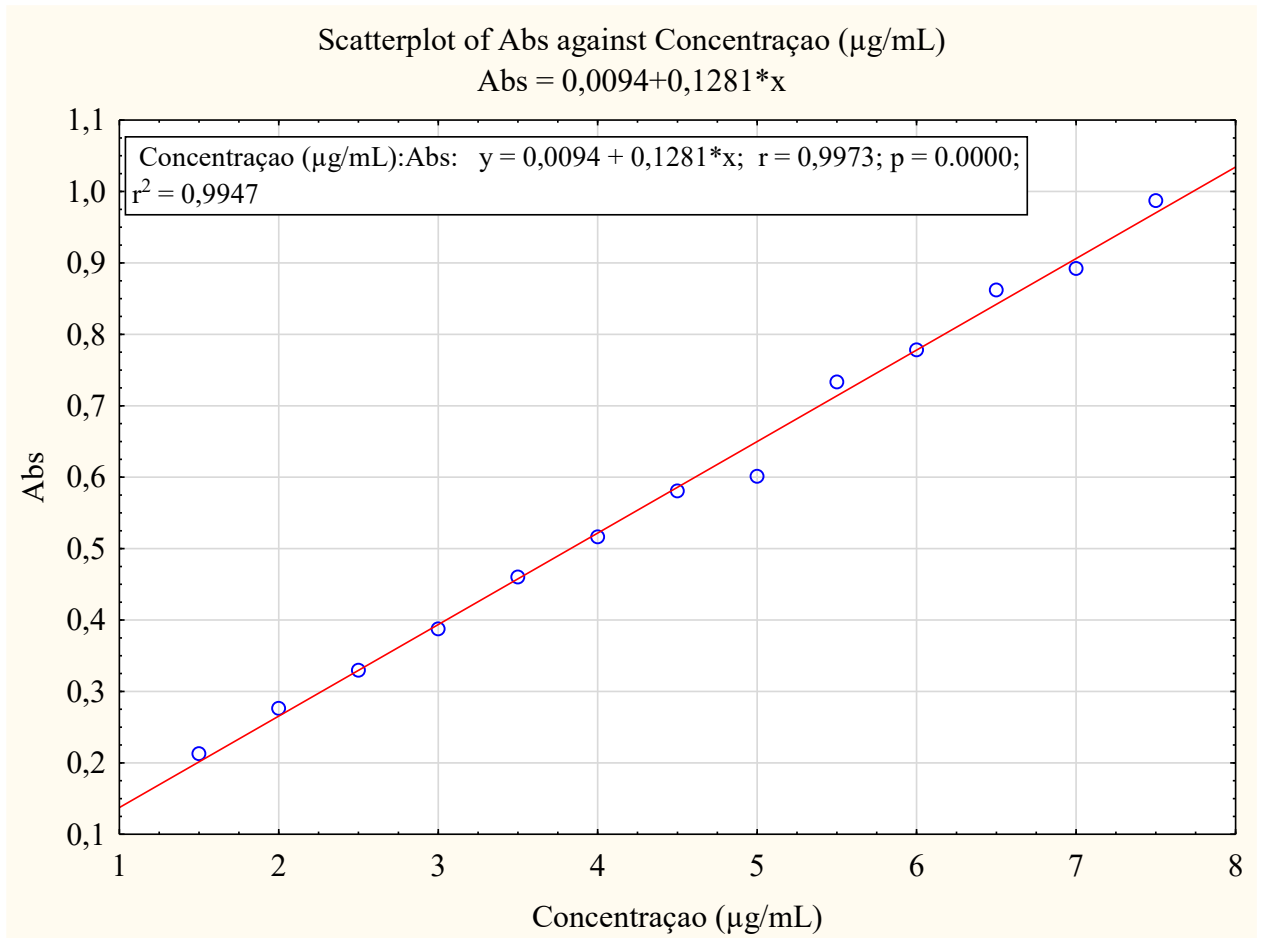


Figura 1 – Curva de calibração média da curcumina obtida por espectrofotometria UV.

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).