

Filipa Isabel Ferreira Galego

CONTRIBUTO PARA O DESIGN DE FORMAS FARMACÊUTICAS: POLIMORFISMO E CO-CRISTAIS DO FLAVONÓIDE LUTEOLINA

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica Industrial,
orientada pelos Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage e Professora Doutora Maria Ermelinda da
Silva Eusébio e submetida à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Filipa Isabel Ferreira Galego

**Contributo para o design de formas farmacêuticas:
polimorfismo e co-cristais do flavonóide Luteolina**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelos Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage e Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e submetida à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2014

Eu, Filipa Isabel Ferreira Galego, estudante do Mestrado em Química Farmacêutica Industrial com o nº 2012108902, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Projecto.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Dissertação, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à excepção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 de Setembro de 2014

O estudante,

(Filipa Isabel Ferreira Galego)

“The most fruitful basis for the discovery of a new drug is to start with an old drug.”

James W. Black (Nobel da medicina em 1988).

“Doubt is the beginning of wisdom.”

Aristóteles

Agradecimentos

Um enorme obrigado aos Professores Ermelinda Eusébio e João Canotilho, meus orientadores, que foram um grande pilar, tanto em conhecimento transmitido, como em dedicação, compreensão, disponibilidade e orientação.

Um obrigado aos Doutores Ricardo Castro e Teresa Roseiro, pela partilha de conhecimentos e pela disponibilidade sempre demonstrada.

Aos colegas do grupo de Investigação que, de uma certa forma, foi um cruzamento de conhecimentos e partilhas. Um especial obrigado ao Osvaldo, foi sem dúvida um excelente companheiro.

À Doutora Manuela Ramos Silva (Raios-X), ao Doutor Rui Carvalho (RMN) e às colegas Liliana e Ana (MW), que de alguma forma contribuíram para que o meu trabalho fosse mais completo.

Agradeço, ainda, aos meus amigos, em especial à Filipa, Joana e Hugo, que sempre me apoiaram incondicionalmente e principalmente por estarem presentes em todos os meus momentos, bons ou maus.

Ao meu namorado, Diogo, pelo amor e amizade e que sempre me deu força para continuar.

Ao meu pai e à minha mãe, que eles são o meu maior suporte e estão presentes em todos os momentos da minha vida. Obrigada por tudo.

Índice geral

Índice de figuras.....	i
Índice de tabelas.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Acrónimos e Abreviaturas.....	xi
I. Introdução.....	I
1.1 Polimorfismo	1
1.2 Co-cristais	4
1.3 Luteolina	8
1.4 Co-formadores	12
2. Materiais e Métodos	17
2.1 Materiais	17
2.2 Métodos de preparação	18
2.3 Métodos de análise	21
3. Resultados e Discussão.....	27
3.1 Estudo sobre a amostra de partida	27
3.2 Screening de novas formas sólidas por cristalização em solventes	33
3.3 Investigação da formação de co-cristais de Luteolina	45
4. Conclusão	63
5. Referências Bibliográficas.....	65

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema de dois empacotamentos cristalinos distintos de um activo farmacêutico.	2
Figura 2- Estrutura química do antirretroviral, ritonavir.	2
Figura 3 - Representação esquemática de um sistema cristalino multicomponente.	4
Figura 4 – Sintões supramoleculares mais comuns em co-cristais.	5
Figura 5 – Polimorfos (FI, FII, FIII e FIV) do co-cristal de cafeína:ácido mesacónico (2:1).	7
Figura 6 – Co-cristal de 4,4'-bipiridina e 4-hidroxibenzóico, forma I e 2.	7
Figura 7 – Forma I e forma II do co-cristal de isonicotinamida e luteolina.	7
Figura 8 - Estrutura química dos flavonóides e numeração.	9
Figura 9 - Estrutura química de diferentes subclasses de flavonóides.	9
Figura 10 – a) Ortep da Estrutura do flavonóide Luteolina, mostrando os elipsoides de probabilidade para os diferentes átomos; b) estrutura cristalina e diferentes ligações intermoleculares; c) e d) representação da estrutura cristalina com indicação de volume vazio.	11
Figura 11 - Estrutura química de a) (<i>S</i>)-naproxeno e b) (<i>S</i>)-ibuprofeno.	13
Figura 12 – Sintões supramoleculares possíveis entre os anti-inflamatórios não esteróides estudados neste trabalho e a luteolina.	13
Figura 13 - Estrutura química de a) isonicotinamida e b) pirazinamida.	14
Figura 14 – Sintões supramoleculares possíveis entre as carboxamidas e a luteolina.	14
Figura 15 – Estrutura química da a) teofilina e da b) cafeína.	15
Figura 16 – Sintões supramoleculares possíveis entre as xantinas e a luteolina.	15
Figura 17 – Curva típica de DSC de compensação de potência; A: transição vítrea, B: transição exotérmica; C: transição endotérmica e D: reacção química exotérmica.	22
Figura 18 – Curvas de DSC de vários aquecimentos da LUT; a1= primeiro aquecimento - amostra comercial, a2= segundo aquecimento após fusão de LUT e arrefecimento até 25°C, a3= aquecimento após a2 e arrefecimento até 25°C, b1= primeiro aquecimento até T=250°C – luteolina comercial, b2= segundo aquecimento da LUT, após b1, e arrefecimento até 25°C; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	28
Figura 19 – Imagens obtidas por Termomicroscopia com luz polarizada no aquecimento dum amostra de luteolina comercial. $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, ampliação de 200X.	29
Figura 20 - Curvas de TG-DTA registadas no aquecimento da LUT comercial; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, atmosfera de N ₂ .	30
Figura 21 - Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida e LUT forma 2.	31

Figura 22 – Difractogramas de raios-X de pó experimentais da amostra de luteolina de partida, LUT e da forma 2. Difractograma de raios-X de pó simulado para a estrutura cristalina descrita na referência; *contaminante.....	32
Figura 23 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização em THF, 1,4-dioxano e em 2-butanol – espectro (a).....	36
Figura 24 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e das partículas microcristalinas obtidas em 1,4-dioxano – espectro (b).	36
Figura 25 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização em acetona, etanol e 2-butanol – espectro (c).	37
Figura 26 - Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização em misturas de etanol/água – espectro (d).....	37
Figura 27 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e do sólido obtido por cristalização em metanol – espectro (e), idêntico ao de luteolina de partida.....	38
Figura 28 – Resumo dos espectros de FTIR-ATR dos vários sólidos obtidos por cristalização em solventes e da LUT de partida.....	38
Figura 29 – Difractogramas experimentais da LUT de partida hemi-hidrato, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização da LUT em metanol, THF e etanol/água; *contaminante.	39
Figura 30 - Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado em THF e da LUT de partida; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	41
Figura 31 – Imagens de PLTM do aquecimento num intervalo entre 25°C e 295°C de LUT cristalizada em THF, $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$; ampliação 200x.....	41
Figura 32 – Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado em 1,4-dioxano (partículas finas de pequenas dimensões) e da LUT de partida; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	42
Figura 33 - Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado em acetona e da LUT de partida; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	42
Figura 34 – Imagens de PLTM do aquecimento de LUT cristalizada em acetona, num intervalo entre 25°C e 334°C. $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$; ampliação 200x.....	43
Figura 35 - Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado numa mistura etanol/água e da LUT de partida; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.....	43
Figura 36 – Imagens de PLTM do aquecimento de LUT cristalizada em etanol/água, num intervalo entre 25°C e 327°C. $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$; ampliação 200x.....	44
Figura 37 - Espectros de FTIR-ATR da LUT forma 2 e do sólido obtido por aquecimento até 200°C da amostra cristalizada em etanol/água.	44

Figura 38 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, do (S)-NPX e das várias misturas obtidas em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	45
Figura 39 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e (S)-NPX, e das misturas LUT: (S)-NPX (1:1), (1:2) e (2:1) obtidas no moinho de bolas.	46
Figura 40 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, do (S)-ibuprofeno e da mistura 1:1 obtida em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	47
Figura 41 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e (S)-ibuprofeno, e da mistura (1:1), obtida no moinho de bolas.	47
Figura 42 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da PZA e da mistura 1:1 obtida em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	48
Figura 43 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e PZA, e da mistura (1:1), obtida no moinho de bolas.	49
Figura 44 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e INA, e da mistura (1:1), obtida no moinho de bolas.	49
Figura 45 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da INA e da mistura 1:1 obtida em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	50
Figura 46 – Curvas de DSC obtidas num ciclo de aquecimento/arrefecimento da mistura equimolar de luteolina:isonicotinamida obtida por mecanoquímica; a) aquecimento; b) arrefecimento (após a); c) aquecimento (após b); curva de DSC de aquecimento do sólido obtido por irradiação com micro-ondas da mistura equimolar LUT:INA; curvas de DSC de aquecimento dos compostos de partida.	51
Figura 47 - Espectros de FTIR-ATR da forma 2 da LUT, da INA após processo de aquecimento/arrefecimento, da mistura obtida por moagem seguida de aquecimento em DSC, até 220°C , e de uma mistura (1:1) irradiada com micro-ondas a 220°C	51
Figura 48 – Difractograma experimental do sólido luteolina:isonicotinamida gerado por irradiação de uma mistura equimolar com micro-ondas, e espectro simulado para a LutInam 2.	53
Figura 49 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da TEF e das várias misturas obtidas em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada. a: amostra analisada pela segunda vez, 20 dias depois.	54
Figura 50 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e TEF, e das várias misturas obtidas no moinho de bolas.	55

Figura 51 – Curvas de DSC de aquecimento de misturas equimolares LUT:TEF, obtida por mecanoquímica e submetida a irradiação com micro-ondas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	56
Figura 52 - Espectros de FTIR-ATR de LUT, TEF após aquecimento até 240°C e da mistura $x_{LUT} = 0,5$, após aquecimento até 240°C , ou irradiação com micro-ondas.....	57
Figura 53 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da CAF e das várias misturas obtidas em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada; a: amostra varrida em cápsula fechada.....	58
Figura 54 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e CAF, e das várias misturas obtidas no moinho de bolas.....	59
Figura 55 - Difractogramas da CAF, experimental e simulado, da LUT hemi-hidrato e forma 2; *contaminante.....	59
Figura 56 – Curvas de DSC de aquecimento de misturas equimolares LUT:CAF, obtida por mecanoquímica e submetida a irradiação com micro-ondas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.	60
Figura 57 - Espectros de FTIR-ATR da LUT forma 2, da CAF e das várias misturas 1:1, submetidas a diferentes processos.....	61

Índice de tabelas

Tabela 1 - Origem dos compostos utilizados neste trabalho e informações do fornecedor..	18
Tabela 2 – Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.....	18
Tabela 3 – Padrões para calibração em DSC.....	22
Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do 1º aquecimento de LUT comercial.....	28
Tabela 5 – Algumas propriedades dos solventes utilizados nas experiências de cristalização da luteolina.....	34
Tabela 6 – Caracterização dos sólidos obtidos nos processos de cristalização da luteolina em vários solventes.....	34
Tabela 7 – Temperaturas de onset dos eventos endotérmicos registados nas curvas de DSC da figura 49, sistema LUT:TEF.....	54
Tabela 8 – Temperatura de onset do primeiro pico endotérmico registado nas curvas de DSC na figura 53 da LUT, CAF e misturas dos dois compostos.....	58

Resumo

A eficácia terapêutica de activos farmacêuticos, APIs, para administração oral, a estabilidade físico-química, a processabilidade, são, com frequência, condicionadas pelas características estruturais da forma sólida. A investigação de ocorrência de polimorfos e, recentemente, a pesquisa de co-cristais são de elevada relevância para o avanço da ciência e em pré-formulação farmacêutica.

O trabalho desenvolvido nesta tese incide sobre um flavonóide, a luteolina. Trata-se um composto de origem natural, de uma família que tem vindo a ganhar destaque pelas suas potenciais aplicações farmacológicas.

Foi efectuada a pesquisa de polimorfos/solvatos por cristalização em solução e a investigação de formação de co-cristais com co-formadores que têm capacidade de formar diferentes sintões supramoleculares com a luteolina. Para a análise dos sólidos obtidos recorreu-se a espectroscopia de infravermelho, a vários métodos de análise térmica, calorimetria diferencial de varrimento, termogravimetria e termomicroscopia, e ainda a difracção de raios-X de pó.

O estudo preliminar dos sólidos obtidos por cristalização em solventes permitiu identificar quatro novas formas sólidas, duas das quais se propõe serem solvatos. Foi identificado e caracterizado um outro polimorfo de luteolina, forma 2, obtido por aquecimento do hemi-hidrato comercial e dos sólidos obtidos por cristalização em solução.

Obtiveram-se novas entidades cristalinas, co-cristais (1:1) com os co-formadores isonicotinamida, teofilina e cafeína, utilizando métodos de síntese com recurso a quantidades diminutas de solvente ou mesmo na ausência deste. Com os dois anti-inflamatórios não-esteróides estudados, ácidos carboxílicos, e com a pirazinamida não ocorreu formação de novas estruturas cristalinas, nas condições utilizadas.

Palavras-chave: Luteolina; polimorfismo; co-cristal farmacêutico; ibuprofeno, naproxeno, carboxamidas, cafeína, teofilina; FTIR-ATR; DSC; TG; PLTM; XRPD.

Abstract

The therapeutic efficacy of active pharmaceutical ingredients, APIs, for oral administration, their physicochemical stability and processability are often constrained by the structural characteristics of the solid form. The investigation of polymorphs and, recently, the research of co-crystals are of high relevance to science and also in the context of applications in pharmaceutical pre-formulation.

The work presented in this thesis focuses on a flavonoid, luteolin. It is a compound of natural origin, from a family that has been gaining prominence for its potential pharmacological applications.

In this work, research on polymorphs/solvates of luteolin by crystallization from solution, and on co-crystal formation with co-formers which are able of giving rise to different supramolecular heterosynthons, was performed. The solids obtained were analysed by infrared spectroscopy, thermal analysis methods, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and thermomicroscopy, and also by X-ray powder diffraction.

The preliminary study of the solids obtained by crystallization from solvents allowed the identification of four new solid forms, two of which are proposed to be solvates. Another luteolin polymorph, Form 2, was identified and characterized. It is obtained by heating the commercial hemihydrate or the solid formss obtained by crystallization from solution.

Novel crystal entities, (1:1) co-crystals, were obtained with the co-formers, isonicotinamide, theophylline and caffeine. In the methods used for their synthesis only small quantities of solvent were used or no solvent at all. With both anti-inflammatory non-steroidal drugs used, carboxylic acids, and with pyrazinamide there was no formation of new crystalline structures, in the experimental conditions used.

Keywords: Luteolin; polymorphism; pharmaceutical co-crystal; ibuprofen, naproxen, carboxamides, caffeine, teophylline FTIR-ATR; DSC; TG; PLTM; XRPD.

Acrónimos e Abreviaturas

API – Activo farmacêutico

ATR – Refletância total atenuada

BCS – Sistema de classificação biofarmacêutica

CAF – Cafeína

CCDC – Centro de dados cristalográficos de Cambridge

CIF – Ficheiro com informação cristalográfica

CSD – Base de dados de estruturas de Cambridge

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento

DTA – Análise térmica diferencial

FDA – Agência Americana reguladora de medicamentos e alimentos

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

GRAS – Substâncias geralmente conhecidas como seguras

INA- Isonicotinamida

LUT – Luteolina

NPX – Naproxeno

PLTM – Termomicroscopia de luz polarizada

PZA – Pirazinamida

RTVMS – Sistema vídeo de análise em tempo real

S – Solvente

THF – Tetra-hidrofurano

TG – Termogravimetria

TEF – Teofilina

XRPD – Difraccção de raios-X de pó

I. Introdução

1.1 Polimorfismo

A administração de medicamentos por via oral por recurso a formulações sólidas tem conquistado as preferências dos clínicos de todo o mundo pelo facto de serem convenientes, eficazes, seguras, de baixo custo, e, portanto, mais comuns. A eficácia terapêutica, pretendida, dos activos farmacêuticos (APIs) está directamente relacionada com as características estruturais da forma sólida do activo (polimorfismo), do hábito cristalino (morfologia) e do tamanho de partícula [1, 2]. Significa, que o controlo da estrutura cristalina de activos sólidos ou das suas formas polimórficas é uma das exigências das farmacêuticas [1, 3]. Actualmente, o polimorfismo é considerado um desafio em investigação da química do estado sólido e, conseqüentemente, uma propriedade a estudar durante a fase de pré-formulação. [4, 5] Geralmente, com composições químicas idênticas, os polimorfos mostram propriedades físico-químicas distintas como a solubilidade, a velocidade de dissolução, a estabilidade física e química, cor e ponto de fusão [2, 3, 6, 7].

Referido pela primeira vez em 1821, pelo químico alemão Eilhard Mitscherlich, o polimorfismo é definido por McCrone [8] como a capacidade de uma molécula existir em mais de uma forma ou estrutura cristalina, ou seja, aquela mostrar características no espaço tridimensional de empacotamento cristalino muito distintas, figura 1.

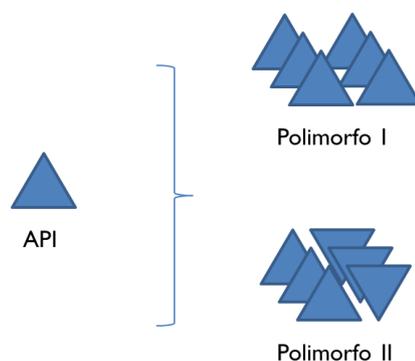


Figura 1 - Esquema de dois empacotamentos cristalinos distintos de um activo farmacêutico.

Esta evidência obriga a um programa exaustivo e exigente de identificação, caracterização e controlo eficiente das fases sólidas de um activo farmacêutico [7] o que se traduz em conhecimento específico e estratégico assegurando a garantia de qualidade dos medicamentos produzidos, e como tal, a possibilidade de protecção de propriedade intelectual por via de registo de patente da forma sólida utilizada na formulação do medicamento [9].

Conhecemos, hoje, uma realidade que ocorreu em virtude de falta de controlo da forma sólida de ritonavir, figura 2, um activo utilizado como inibidor da protease do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e utilizado no tratamento do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

Introduzido no mercado pela empresa Abbott, em 1996 sob a marca Norvir[®], a sua formulação continha, apenas, um polimorfo. Em 1998, mesmo utilizando o processo idêntico de síntese, o Norvir[®] falhou os ensaios de dissolução, mostrando graves problemas de solubilidade do activo em virtude do aparecimento de um segundo polimorfo menos solúvel e mais estável. Assim, a Abbott foi notificada para que retirasse do mercado o medicamento, até encontrar uma nova formulação em que o polimorfo original não mostrasse transição de fase [10, 11].

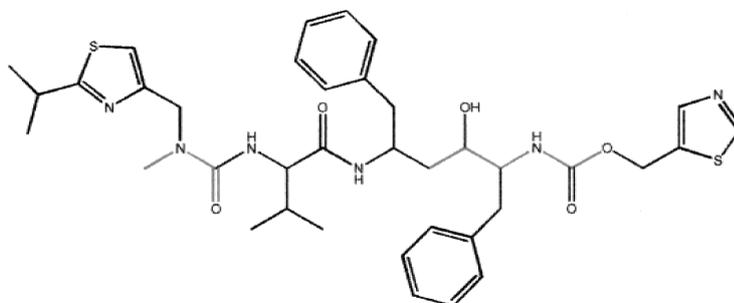


Figura 2- Estrutura química do antirretroviral, ritonavir [11].

O problema exemplificado forçou, de forma decisiva, a introdução da exigência regulamentar de pesquisa de polimorfismo em activos farmacêuticos. E, apesar do rigor na investigação de polimorfos e dos grandes recursos disponibilizados pela indústria farmacêutica, neste domínio, não é possível prever todos os polimorfos estáveis de um API. Esta dificuldade deve-se à impossibilidade de impedir por completo a conversão/transição de fases termodinamicamente instáveis em fases mais estáveis e menos solúveis [2, 6]. Assim, o primeiro passo a encetar para a pesquisa de polimorfismo é o recurso à conhecida operação unitária – cristalização. A cristalização a partir de soluções é, normalmente, o método de escolha preferencial para a purificação de sólidos orgânicos na indústria farmacêutica [4]. Geralmente, este processo ocorre em duas fases: primeira, os núcleos cristalinos são gerados/formados (nucleação) e, em seguida, observa-se a agregação e crescimento daqueles núcleos (crescimento cristalino) dando origem aos cristais [6, 12, 13]. Os cristais (forma única ou polimorfos) podem ser obtidos recorrendo-se ao uso de diferentes solventes de cristalização, ao uso de aditivos, à manipulação da relação de sobressaturação da solução ou através de modificações da geometria dos cristalizadores e a factores externos como arrefecimento brusco da temperatura da solução, adição de antissolvente, radiação infravermelha e ultra-sons [6, 12, 14, 15].

Por outro lado, a escolha de diferentes solventes e/ou misturas de solventes é uma metodologia muito útil para a obtenção de diferentes formas cristalinas [4, 15]. No entanto, a relação de sobressaturação da solução é fundamental para esse controlo, o que não é sempre eficaz. Soluções com diferentes graus de sobressaturação podem gerar diferentes polimorfos ou não [6]. Uma outra estratégia é o recurso a monocristais (sementes) com o objectivo de induzir a formação de determinado tipo de polimorfo em soluções saturadas. Outros aditivos de natureza diversa podem, de igual forma, ser utilizados para induzir a formação de uma fase cristalina desejada [6, 12].

Hoje em dia, é possível identificar e monitorizar a formação das diferentes formas polimórficas [3, 15]. No entanto, a pesquisa de polimorfismo é hoje, por via regulamentar, de carácter obrigatória desde o início do desenvolvimento de novos candidatos bioactivos sob pena de, no final do processo de desenvolvimento farmacêutico, obter-se uma forma do activo que mostre diferente solubilidade aquosa que influenciará, decisivamente, a biodisponibilidade oral do medicamento, alterando, assim, a sua eficácia e segurança terapêutica [6, 16].

1.2 Co-cristais

Os co-cristais representam uma nova oportunidade para a síntese de sólidos cristalinos de activos farmacêuticos, exibindo propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas mais adequadas como sejam a solubilidade aquosa, a estabilidade física e química, a velocidade de dissolução, uma maior biodisponibilidade oral, baixa toxicidade e melhor eficiência terapêutica, quando veiculado em medicamentos sólidos para a via oral [17, 18].

Os co-cristais são definidos como um sistema cristalino multicomponente, *vide* figura 3, constituído por duas ou mais moléculas neutras, de estequiometria bem definida, no estado sólido, à temperatura e pressão normal, estabelecendo entre si interacções não covalentes (principalmente interacção por ligação de hidrogénio, interacções π - π e interacções de Van der Waals) [17, 19-21]. A formação de co-cristais farmacêuticos envolve a incorporação de um dado API com uma outra molécula, farmacêuticamente aceitável (substâncias que constam da lista GRAS, flavonóides e nutracêuticos, conservantes, excipientes, vitaminas, minerais, aminoácidos, biomoléculas e outros APIs), na estrutura de cristal, designando-se esta última por co-formador [17, 20], mantendo-se a actividade farmacológica intrínseca do API, embora as propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas sejam distintas das do API, *vide* figura. 3 [12, 19, 21-23].

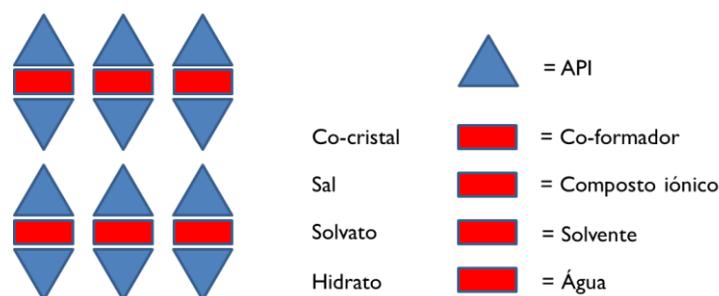


Figura 3 - Representação esquemática de um sistema cristalino multicomponente.

Assim, os co-cristais são passíveis de serem sintetizados através de abordagens de reconhecimento molecular racional [19].

A selecção do co-formador e a preparação de co-cristais apropriados é feita, frequentemente, com base em fragmentos moleculares específicos das moléculas componente com vista ao estabelecimento, entre elas, de sintões supramoleculares [19, 21]. A abordagem de sintão sugere que os grupos funcionais específicos presentes no API e no

co-formador irão desempenhar um papel importante na formação do co-cristal e para que ocorra co-cristalização com êxito, os co-formadores devem mostrar grupos funcionais complementares aos do API em causa [19, 20]. Alguns exemplos típicos de sintões supramoleculares que podem ser utilizados, são o produto de síntese de ácido carboxílico-ácido carboxílico, o sintão amida-amida, o heterossintão ácido carboxílico-piridina e o ácido carboxílico-amida (vide figura 4) [24, 25].

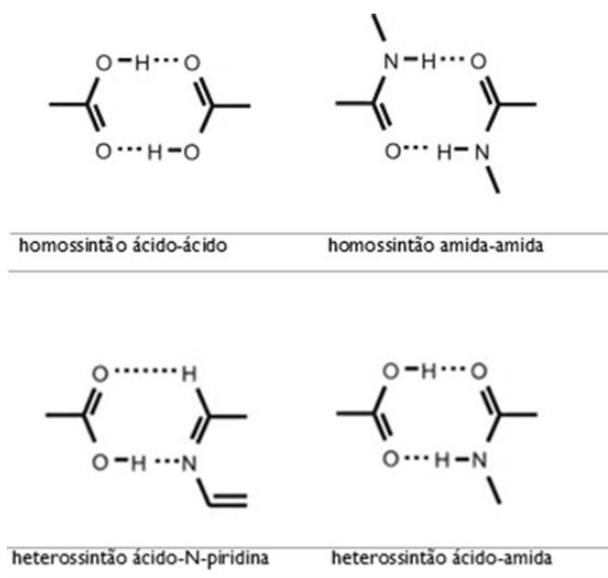


Figura 4 – Sintões supramoleculares mais comuns em co-cristais [24, 25].

Contudo, uma desvantagem que se observa na abordagem via formação de sintão, é que esta não é quantitativa na medida em que, embora a formação do sistema multicomponente possa ser favorável, a própria supermolécula pode não empacotar numa estrutura cristalina que, como se sabe, é ordenada. Além disso, a abordagem não considera factores como a competição entre os diferentes grupos funcionais presentes no API ou o co-formador, nem o impedimento estéreo em torno do dador ou aceitador de protão [20].

Por outro lado, com alternativa a polimorfos e co-cristais, a formação de sais é uma outra abordagem à síntese de candidatos no estado sólido utilizados, também, para a modificação das propriedades físicas dos APIs, resolvendo a fraca solubilidade aquosa e baixa biodisponibilidade oral [26], estimando-se que mais de metade dos medicamentos disponíveis no mercado são administrados sob a forma de sais. No entanto, uma limitação importante, no âmbito desta abordagem, é que o API deve possuir um local ionizável (básico ou ácido) apropriado [12]. Como diferença, a associação molecular nos co-cristais, entre o API e o co-formador, que ocorre na célula unitária do cristal é regida por interações de natureza não-iónica [12, 23]. Esta particularidade ajuda a complementar os métodos

existentes, reintroduzindo moléculas que tinham perfis farmacêuticos limitados com base nos seus grupos funcionais não-ionizáveis. Além disso, o número de potenciais formadores de co-cristal não tóxicos (ou co-formadores) que podem ser incorporados numa reacção de co-cristalização é abundante [12] contrariando o pequeno número de ácidos e bases considerados como aceitáveis no desenvolvimento de formulações [20].

Uma outra particularidade, em sistemas cristalinos, é a possibilidade de formação de solvatos e muitos activos já no mercado encontram-se sob esta forma [27].

A principal diferença entre solvatos e co-cristais é o estado físico das substâncias puras: se uma das substâncias se apresenta líquida à temperatura ambiente, os cristais são designados como solvatos; se ambas as substâncias são sólidas à temperatura ambiente, os cristais são designados por co-cristais. Esta diferença, porventura, insignificante, é suficiente para afectar profundamente a estabilidade do API [21, 28]. Os co-cristais tendem a ser mais estáveis do que solvatos ou hidratos, pois os solventes tendem a plasticizar os sistemas, tornando-os mais dinâmicos, e mostram uma pressão de vapor mais elevada, não sendo invulgar observar desidratação/dessolvatação em formas farmacêuticas sólidas. Assim, a perda de solvente conduz, frequentemente, ao aparecimento de fases amorfas, que quimicamente, são menos estáveis podendo evoluir para formas cristalinas menos solúveis. Por oposição, a maioria dos formadores de co-cristal não são susceptíveis de se evaporar a partir das formas sólidas, evitando-se a separação de fases e outras alterações físicas menos desejáveis [29].

Tal como no caso dos sistemas de um único componente (polimorfos), os co-cristais também podem exibir polimorfismo, e assim possuir diferentes propriedades físico-químicas, entre as diferentes formas cristalinas [20, 30, 31].

Como exemplos de polimorfismo em co-cristais, citam-se: co-cristais de cafeína:ácido mesacónico (2:1) formando quatro formas, FI, FII, FIII e FIV (solvato), figura 5 [32], o co-cristal (2:1) 4,4'-bipiridina:4-hidroxibenzóico que mostra dois polimorfos, figura 6 [33] e o sistema isonicotinamida com a luteolina que apresenta, também, polimorfismo em co-cristal, obtendo-se 2 formas cristalinas, dependendo do solvente seleccionado para a cristalização, figura 7 [34]. Muitos mais exemplos são descritos na literatura [31].

Em conclusão, os co-cristais representam um novo paradigma no domínio da formulação de medicamentos possibilitando a protecção da propriedade intelectual com a possibilidade de registo de novas patentes [12, 30, 35]. É pois, no domínio da química farmacêutica Industrial, um campo de investigação que sempre evolui na medida do investimento dedicado [36].

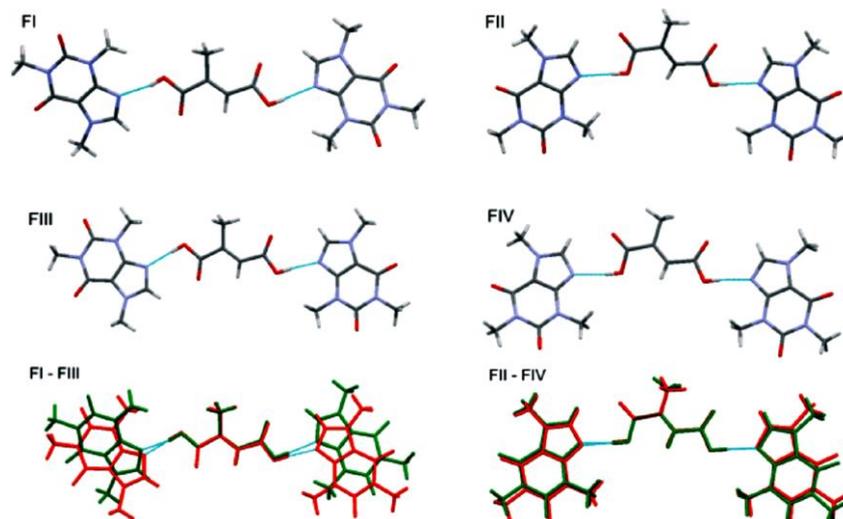


Figura 5 – Polimorfos (FI, FII, FIII e FIV) do co-cristal de cafeína:ácido mesacónico (2:1) [32].

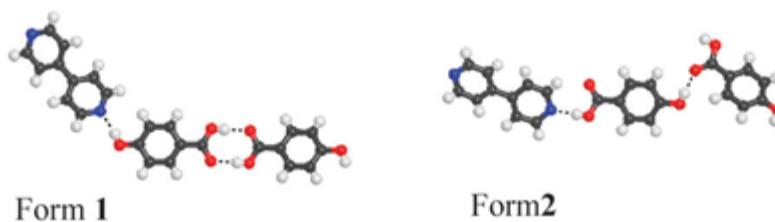


Figura 6 – Co-cristal de 4,4'-bipiridina e 4-hidroxibenzoico, forma 1 e 2 [33].

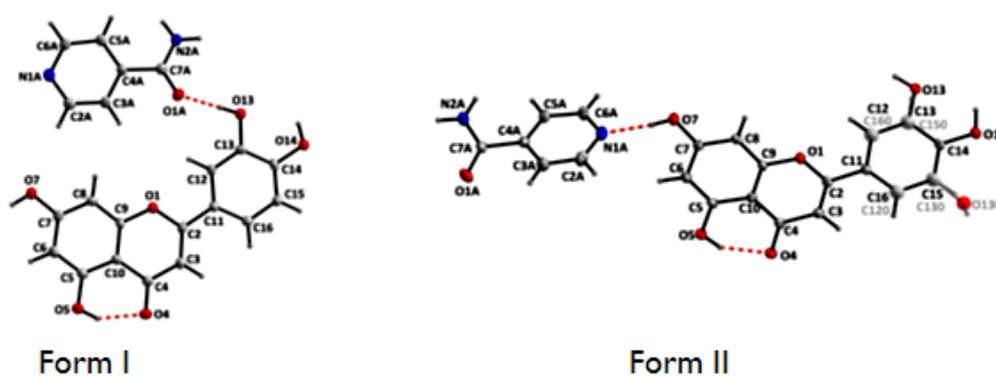


Figura 7 – Forma I e forma II do co-cristal de isonicotinamida e luteolina [34].

1.3 Luteolina

A investigação realizada, hoje em dia, sobre produtos naturais mostra dimensão e expressão universal com orçamentos dedicados de elevado montante, dado que aqueles compostos bioactivos possuem grande interesse para a indústria farmacêutica [37].

Apesar de as matrizes mostrarem complexidade, o conhecimento de novas estruturas e a sua bioactividade são determinantes para a definição de novas linhas orientadoras do Design de activos farmacêuticos [38].

Também, o interesse na pesquisa de flavonóides provenientes de fontes alimentares resulta da crescente evidência dos ganhos em saúde demonstrados por estudos epidemiológicos. Como o interesse de flavonóides está directamente associado à ingestão humana diária de antioxidantes, é importante avaliar as fontes de flavonóides em alimentos [39, 40]. Por outro lado, muitos flavonóides são apresentados como possuindo actividade antioxidante, capacidade de captura de radicais livres, úteis na prevenção da doença cardíaca coronária, e na actividade anticancerígena, enquanto outros apresentam potencial antivírico na imunodeficiência humana [39]. Como tal, a pesquisa avança em direcção a uma nova era dos flavonóides, a dos suplementos farmacêuticos – nutracêuticos [41]. No entanto, existe ainda, a dificuldade em medir com precisão a dose diária de flavonóides, devido à complexidade da existência de flavonóides a partir de várias fontes alimentares, da diversidade de cultura alimentar, e da ocorrência de uma grande quantidade de flavonóides provenientes da natureza [39, 40, 42].

Assim, é fácil encontrar a justificação para a escolha de um membro do grupo dos flavonóides - Luteolina, para a investigação desenvolvida, como co-formador/API de sistemas multicomponente.

Em detalhe, os flavonóides são metabolitos secundários das plantas pelo que não podem ser sintetizados por seres humanos. Estes não estão presentes nos alimentos de origem animal [43, 44]. Encontram-se distribuídos nas folhas, sementes, cascas, flores de plantas, e, ainda, no mel e no cacau [41]. Os flavonóides estão amplamente distribuídos em alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, legumes, chá, cacau e vinho [40].

A estrutura química base dos flavonóides é apresentada na figura 8.

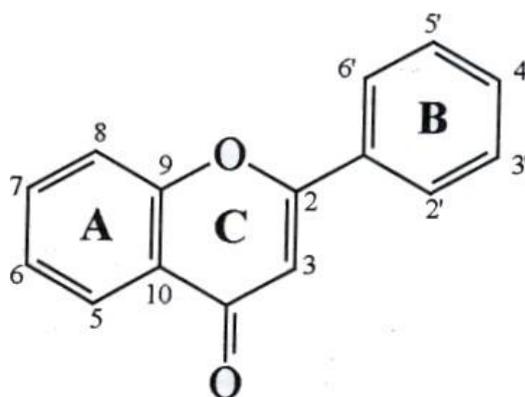


Figura 8 - Estrutura química dos flavonóides e numeração [42].

Existem várias subclasses de flavonóides, por exemplo: flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas, catequinas e isoflavonas, que variam de acordo com as substituições devido a reacções de oxigenação, metilação, prenilação e glicosilação, estas catalisadas por diversas enzimas orientadas para a posição específica do substrato. Os flavonóides, podem ainda diferir nas diversas classes de acordo com o número e natureza dos grupos substituintes, ligados aos anéis. Contabilizando todas as suas modificações, os flavonóides incluem mais de 10000 estruturas [40-43, 45, 46].

A figura 9 exhibe algumas das subclasses dos flavonóides.

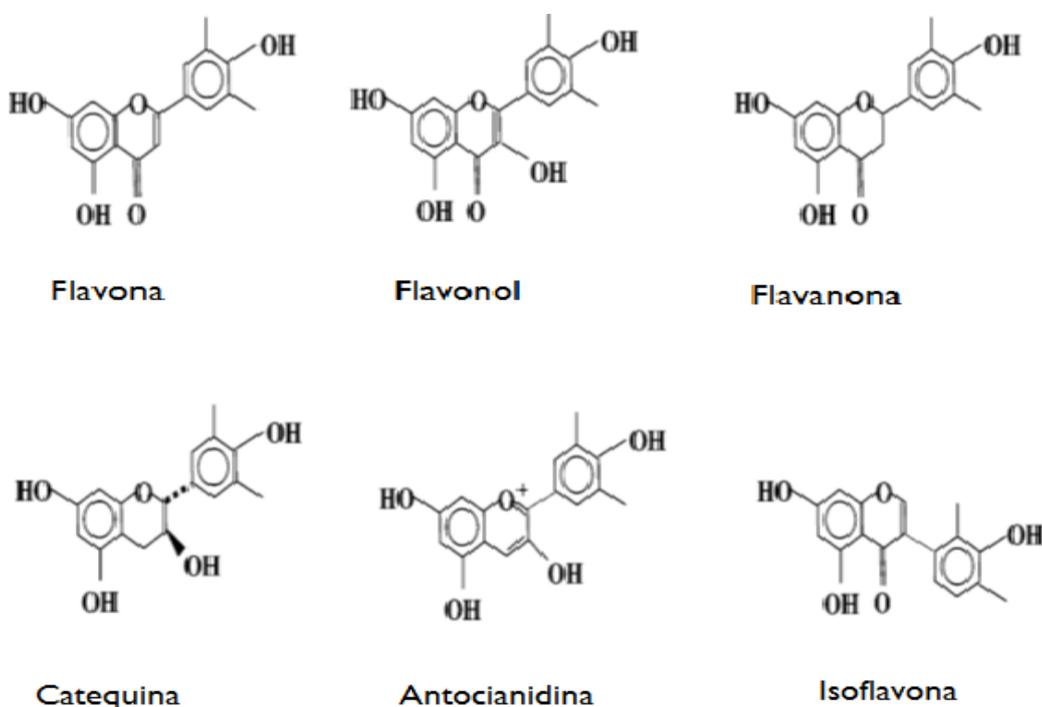


Figura 9 - Estrutura química de diferentes subclasses de flavonóides [40].

A luteolina, o flavonóide alvo de estudo, pertence à subclasse das flavonas, 5,7,3',4'-tetrahidroxilflavona, está representada figura 10.

Esta flavona apresenta vários benefícios para as plantas, mas também a nível da saúde do ser humano (e restantes mamíferos). Vários estudos realçam o benefício deste flavonóide a vários níveis [47]: tem propriedades antioxidantes [48, 49], actua na prevenção e na terapia tumoral, em vários tipos de cancro [50-53], possui efeito cardioprotector [54, 55], na diabetes [56], no colesterol [57], como neuroprotector em várias doenças, como Alzheimer [58-60], actividade antiviral contra HIV-1 [61], propriedades anti-inflamatórias [62] e, ainda, como potencial protector solar [63].

Em tempos remotos, a luteolina foi utilizada como pigmento natural [64, 65] na indústria de lanifícios.

Este flavonóide está amplamente distribuído no reino vegetal, sendo que se pode encontrar-se em cebolas (*Allium fistulosum*), brócolos (*Brassica oleracea*), pimentão verde (*Capsicum annum*), feijão-verde (*Phaseolus vulgaris*), cenoura (*Daucus carota*), rabanete branco (*Raphanus sativus*), aipo (*Apium graveolens*) [66], *Dracocephalum rupestre* [67], *Reseda luteola* L. [68], *Cynodon dactylon* (L.) [56], *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) [60], *Leontopodium alpinum* [63], encontra-se, ainda, em azeite [69] e no propólis/mel [44].

Apesar de a luteolina ser praticamente insolúvel em água, o que limita, em muito, a sua biodisponibilidade oral, é bastante solúvel em solventes orgânicos (como etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, acetona, hexano e DMSO), e esta propriedade aumenta com a temperatura [70, 71].

Conforme referido, o trabalho apresentado nesta dissertação, visa o estudo do polimorfismo da luteolina e a síntese de sistemas multicomponente utilizando esta como co-formador/API.

Até ao momento, não foram citadas quaisquer referências a polimorfos deste flavonóide, deixando uma maior margem de pesquisa nesta área,

Existe apenas uma estrutura cristalina resolvida, um hemi-hidrato de luteolina que se mostra na figura 10. Nesta estrutura cristalina, sistema monoclinico, a molécula de luteolina possui uma ligação de hidrogénio intramolecular, estabelecida entre o grupo carbonilo, C4 e o grupo hidroxilo O3, figura 10 a) [72].

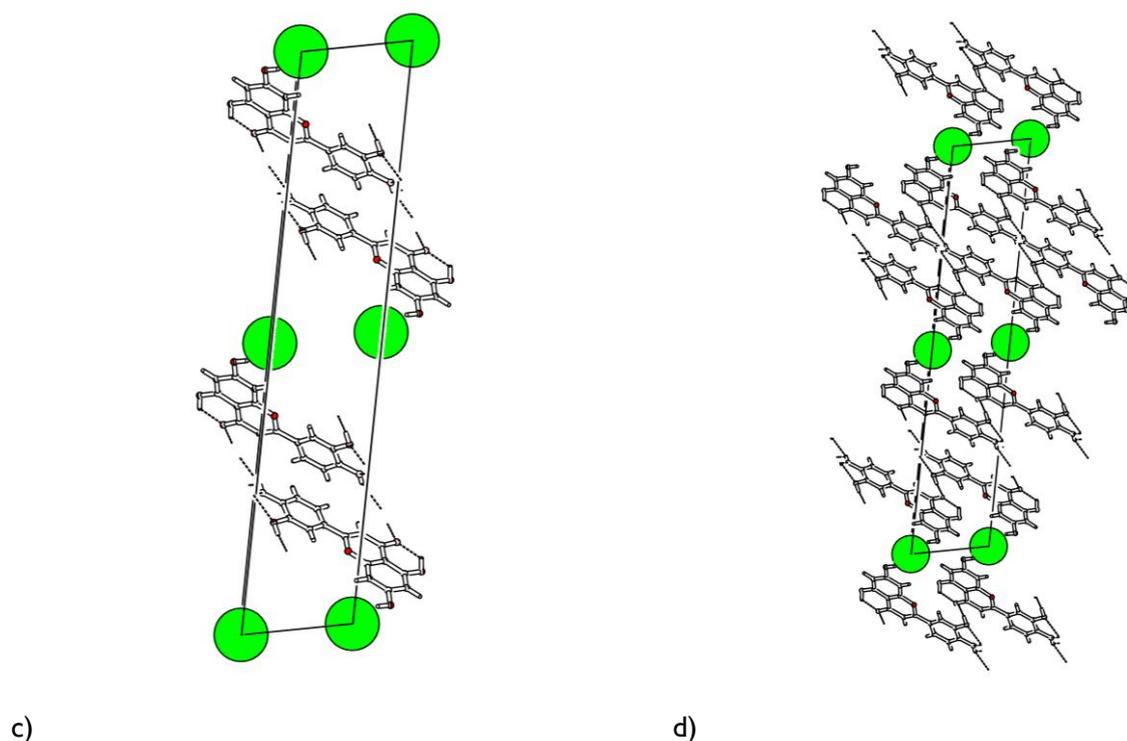
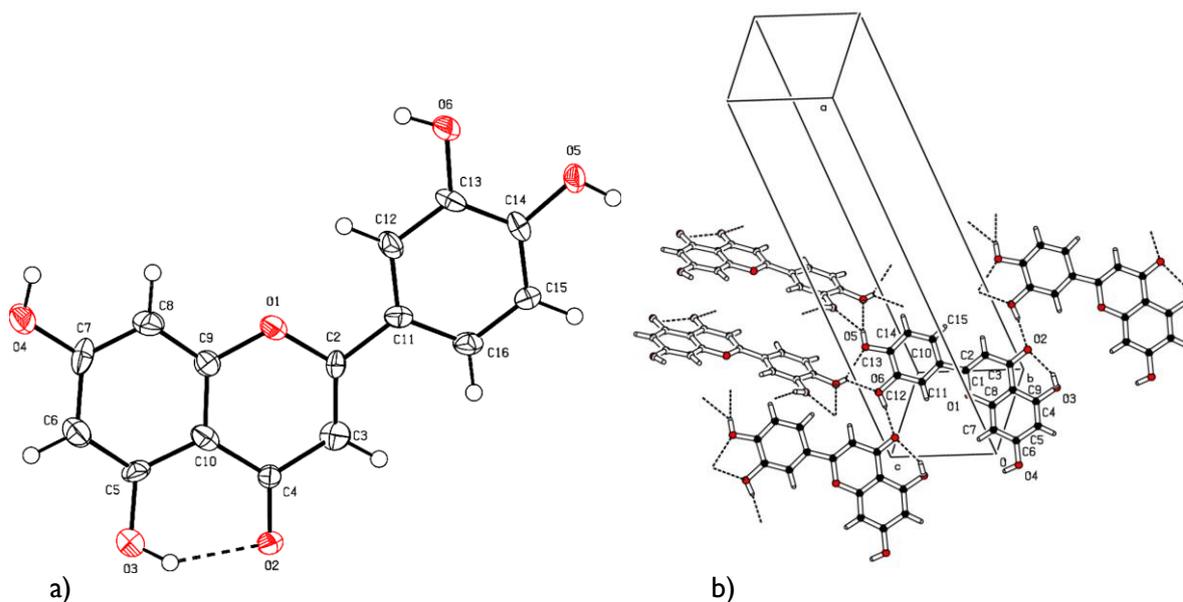


Figura 10 – a) Ortep da Estrutura do flavonóide Luteolina, mostrando os elipsoides de probabilidade para os diferentes átomos; b) estrutura cristalina e diferentes ligações intermoleculares; c) e d) representação da estrutura cristalina com indicação de volume vazio [72].

Várias ligações intermoleculares estão presentes na estrutura, figura 10 b), sendo de registrar que o grupo $-O_4H$ não participa em qualquer uma destas interações. É referido que o sólido seá provavelmente um hemi-hidrato, no qual as moléculas de água estarão desordenadas e provavelmente na vizinhança deste grupo (figura 10 c) e 10 d) evidenciando a disponibilidade espacial na vizinhança de $-O_4H$) [72].

Estão descritos na literatura, co-cristais da luteolina com dois co-formadores. Com a isonicotinamida há formação de dois co-cristais polimorfos 1:1, LutInam, forma 1, e LutInam2, forma 2, dependendo do método utilizado para a sua formação, diferindo no solvente utilizado: para obtenção da forma 1, a mistura dos sólidos é solubilizada numa mistura de álcool etílico e acetona (50:50 v/v); para a forma 2 o solvente utilizado é o álcool isopropílico. Os co-cristais são obtidos por evaporação do solvente [34].

Mais recentemente, um outro co-cristal de luteolina API-API foi desenhado. Neste caso, o outro API é a Dapsona (DAP), utilizada para combater a tuberculose, a lepra, a malária, o sarcoma de Kaposi, as dermatoses e pneumonias relacionadas com a SIDA. Este co-cristal foi obtido por cristalização por evaporação lenta do solvente, a partir de etanol/acetona 1:1 (v/v) [73].

1.4 Co-formadores

Um dos principais desafios no desenvolvimento de um co-cristal farmacêutico é a selecção adequada de um co-formador que seja compatível com o API e que promova o incremento das propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade aquosa, a compressibilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade oral [21]. A escolha do co-formador é feita, geralmente, recorrendo à triagem de co-cristais, a partir de uma biblioteca de compostos farmacologicamente aceitáveis e seguros, muito usados em co-cristalização [74, 75]. Recentemente, esta selecção seguiu o caminho da formação de sintões supramoleculares, numa certa extensão, o que facilitou a síntese de novos co-cristais. Especificamente, a abordagem “via sintão supramolecular” conduz à engenharia de cristais necessária para análise dos possíveis arranjos supramoleculares que um API pode originar [74]. É, assim, uma análise estatística que utiliza a base de dados de Cambridge (CSD) para estabelecer uma hierarquia de probabilidades de ocorrência das interações, via formação de sintão, entre o API e o co-formador, observada em estruturas de co-cristais depositadas [17, 21].

Os sintões supramoleculares envolvem, como se viu, tipicamente ligações de hidrogénio entre grupos complementares, figura 4.

Para este estudo, foram seleccionados, como co-formadores, dois anti-inflamatórios não esteróides, o (S)-naproxeno e o (S)-ibuprofeno, figura 11, que têm em comum a capacidade de controlar a inflamação, a analgesia (reduzir a dor) e de combater a

hipertermia (febre). Apesar da maioria dos activos deste grupo serem ácidos orgânicos, a sua estrutura química é diversa [76, 77]. De referir que quer para o (S)-naproxeno quer para o (S)-ibuprofeno são mais eficazes do ponto de vista farmacológico que as misturas recémicas [77].

Ambos os compostos pertencem à classe 2 do BCS [78].

Foi descrito recentemente a existência de quatro polimorfos do naproxeno [76].

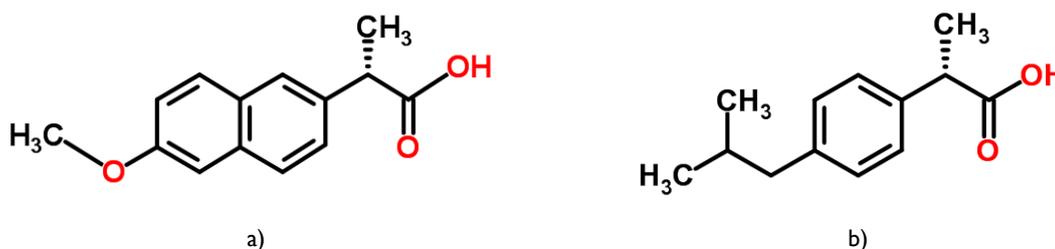


Figura 11 - Estrutura química de a) (S)-naproxeno e b) (S)-ibuprofeno.

Observa-se que ambos os compostos podem estabelecer interações por ligação de hidrogénio com a luteolina, do tipo O-H...O e O...H-O.

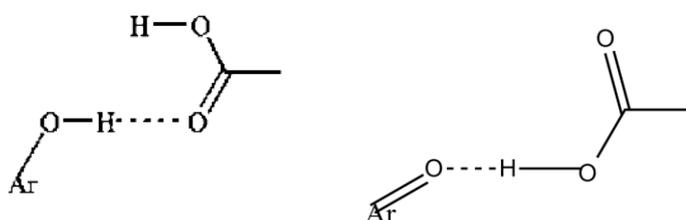


Figura 12 – Síntões supramoleculares possíveis entre os anti-inflamatórios não esteróides estudados neste trabalho e a luteolina.

Um outro grupo escolhido para a função de co-formador foi o das carboxamidas, dado que está descrito a formação de um co-cristal com a isonicotinamida [34], membro conhecido e importante desta família de compostos.

Efectuou-se, de acordo com o procedimento descrito para a síntese, uma tentativa de replicação do sistema luteolina:isonicotinamida (LUT:INA) e seleccionou-se, ainda, um novo co-formador, a pirazinamida. As estruturas dos co-formadores referidos são mostradas na figura 13.

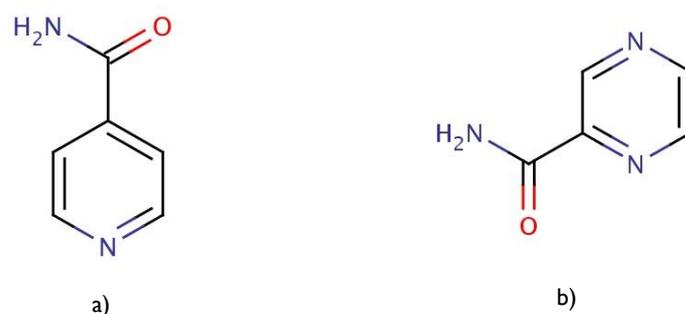


Figura 13 - Estrutura química de a) isonicotinamida e b) pirazinamida.

Para as duas carboxamidas, as interações intermoleculares por ligação de hidrogénio com a luteolina podem ser do tipo $O-H \cdots N_{\text{arom}}$, $O-H \cdots O$, $H-O \cdots H-N$ e $O \cdots H-N$, vide figura 14.

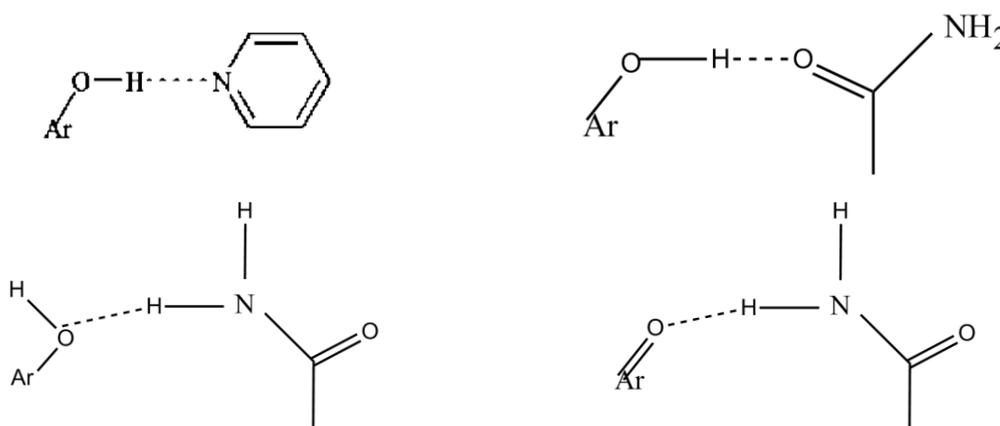


Figura 14 – Síntões supramoleculares possíveis entre as carboxamidas e a luteolina.

No que diz respeito à isonicotinamida, esta é considerada um composto seguro, e o seu isómero, nicotinamida, participa como componente da coenzima NAD. Esta carboxamida, isonicotinamida, tem actividade inibidora da PARP-I (poli (ADP-ribose) polimerase-I), que tem um papel importante na reparação dos danos no DNA [79] e ainda apresenta actividade anti-inflamatória e antenociceptiva [80]. Estão descritos cinco polimorfos da isonicotinamida [81].

A pirazinamida é um tuberculostático, derivado da pirazina, com efeito bactericida sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, utilizado como medicamento alternativo ou de segunda escolha para terapia em casos de resistência ou intolerância à isoniazida, rifampicina, etambutol ou estreptomicina [82]. A característica clínica mais conhecida é a sua acção em meio ácido e intracelular em macrófagos e, também, contra bactérias em crescimento lento. Por isso, integra o grupo (isoniazida + rifampicina + estreptomicina + pirazinamida) de

antibióticos utilizados actualmente para esquemas de tratamento curto durante os primeiros dois meses. Exibe quatro polimorfos, α , β , δ e γ [83]. Este composto pertence à classe 3 do BCS e classe I do BDDCS [78].

Por último, foram escolhidas, também, duas xantinas como co-formadores, a teofilina e a cafeína (vide estruturas químicas na figura 15).

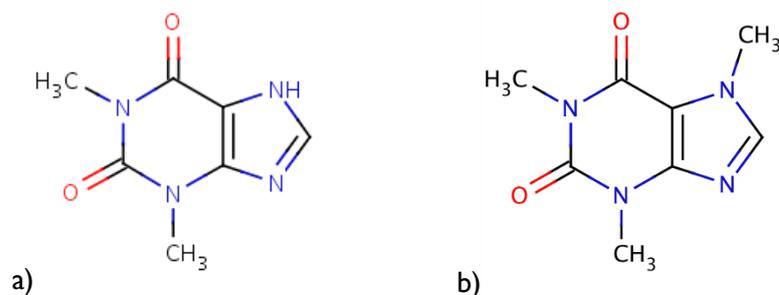


Figura 15 – Estrutura química da a) teofilina e da b) cafeína.

Estes compostos permitem o estabelecimento de interações por ligação de hidrogénio com a luteolina do tipo O-H---N, O-H---O para a cafeína, e ainda H-O---H-N e O---H-N, para a teofilina. A figura 16 mostra os sintões resultantes da interacção complementar dos diferentes grupos presentes nas referidas xantinas, com a luteolina.

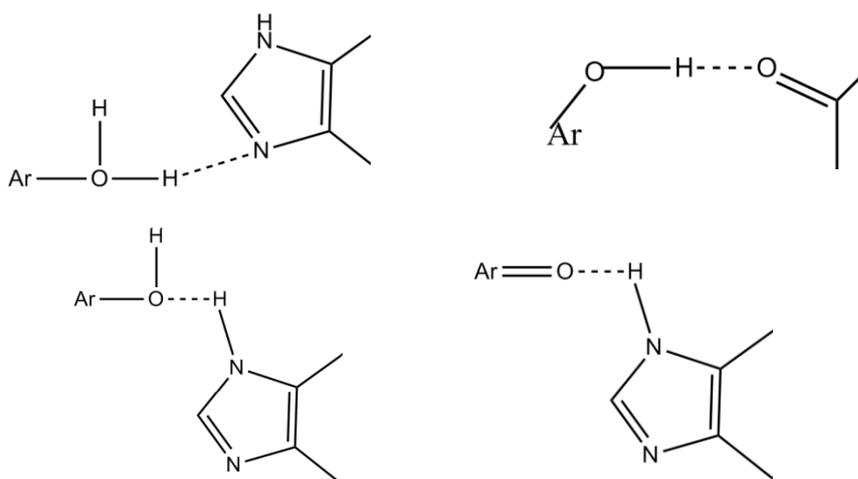


Figura 16 – Sintões supramoleculares possíveis entre as xantinas e a luteolina.

A teofilina é uma dimetilxantina, relacionada com a cafeína, que está presente no chá. É também um fármaco do grupo dos antiasmáticos. Usada no tratamento da asma e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), possui seis polimorfos descritos [84].

A cafeína, classificada como alcalóide do grupo das xantinas é, quimicamente, a 1,3,7-trimetilxantina. Presente em certas plantas é usada em bebidas, sob a forma de infusão, como estimulante do sistema nervoso central [85]. A cafeína possui três polimorfos descritos [85]. De salientar, que este composto sublima a cerca de 160°C [86] em condições normais de pressão.

Ambos os compostos pertencem à classe 3 do BCS e classe I do BDDCS [78].

2. Materiais e Métodos

2.1 *Materiais*

Os compostos utilizados nas diferentes experiências estão resumidos na tabela 1, onde se refere a sua proveniência, o peso molecular, o ponto de fusão e o grau de pureza, mencionados pelo fornecedor.

A amostra da luteolina foi caracterizada por difracção de raios-X de pó, confirmando tratar-se da estrutura descrita por Cox e colaboradores [72], que é referida como contendo moléculas de água desordenadas, correspondendo, segundo os autores, “provavelmente a um hemi-hidrato”.

Foram ainda utilizados diversos solventes nas experiências de cristalização, realizadas com o objectivo de pesquisar novas formas sólidas e/ou monocristais. Na tabela 2 apresenta-se uma compilação dos solventes utilizados, com a indicação da respectiva origem e o grau de pureza. Utilizou-se, ainda, água proveniente de um sistema Millipore, Milli-Q Academic, com resistência específica $\geq 18\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$.

Tabela 1 - Origem dos compostos utilizados neste trabalho e informações do fornecedor.

Composto	Laboratório	M /g.mol ⁻¹	T _{fusão} /°C	Pureza / %
Luteolina	TCI	286,24	333-338	>98
(S)-Naproxeno	Fluka	230,27	152 -154	98
(S)-Ibuprofeno	Sigma - Aldrich	206,28	49 - 53	99
Pirazinamida	Fluka	123,12	189 - 191	≥99
Isonicotinamida	Sigma - Aldrich	122,13	156	99
Teofilina	Sigma - Aldrich	180,16	271	99
Cafeína	Fluka	194,19	233 – 238 234 – 236,5	≥99

Tabela 2 – Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.

Solvente	Lab	Pureza /%
Tetra-hidrofurano	Panreak	99,5
1,4-Dioxano	Lab-Scan	99,8
Acetona	Lab-Scan	99,5
Metanol	Fluka	≥99
Etanol	Fisher Chemical	95
2-Butanol	May & Barker	99

2.2 Métodos de preparação

Foram utilizados vários métodos para o *screening* de polimorfos e de co-cristais: cristalização por evaporação lenta do solvente, mecanoquímica, ensaios assistidos por micro-ondas (MW). Foram usadas, também, várias técnicas analíticas por forma a identificar/caracterizar as diferentes formas sólidas obtidas: calorimetria diferencial de varrimento (DSC), termomicroscopia (PLTM), termogravimetria (TG), espectroscopia de infravermelho – refletância total atenuada (FTIR-ATR), difracção de raios-X de pó (XRPD).

- **Cristalização em solventes**

O método de cristalização em solvente é o método mais frequentemente seleccionado para a purificação, em particular para compostos farmacêuticos. Este processo ocorre em duas fases, nucleação seguida de crescimento cristalino.

Os polimorfos mostram uma diferente taxa de nucleação e de crescimento em solução e a sua forma metaestável precipita em primeiro lugar, seguida de transformação

para a forma mais estável, segundo a regra de fases de Ostwald. Assim, os processos mais rápidos dão origem a polimorfos metaestáveis [6].

Vários factores podem influenciar o resultado do processo de cristalização do polimorfo, como o solvente usado, a temperatura ou, ainda, se são adicionados aditivos (ou impurezas), bem como o pH. É, ainda, importante, no *screening* de polimorfos, a selecção de vários solventes, de forma a obter uma maior gama de diversidade de características/propriedades, para o sucesso de descoberta de novas formas [3].

As amostras que se submeteram a evaporação do solvente foram colocadas em caixas de *Petri* e deixadas tapadas, em repouso, à temperatura ambiente (temperatura constante do laboratório, de aproximadamente 24°C).

A relação do volume de solvente e massa de luteolina era de aproximadamente de 2mL para 7mg. No caso da luteolina cristalizada dos co-solvente etanol/água, (1:1) e (4:6), foi utilizado maior volume de solvente, devido à sua menor solubilidade.

- **Mecanoquímica**

Métodos mecanoquímicos de moagem (dos componentes puros e assistida por líquido) aparecem como uma abordagem alternativa e eficiente a outros métodos de formação de co-cristais, nomeadamente à evaporação lenta do solvente. É um método muito utilizado de pesquisa de co-cristais [87].

O método de moagem pura (sem solvente) consiste em misturar os componentes de partida e triturá-los manualmente, utilizando-se um almofariz e pilão, ou mecanicamente, utilizando um moinho de esferas ou um moinho vibratório. Em alternativa, pode efectuar-se adição de solvente à mistura quando esta é sujeita à moagem.

A mecanoquímica assistida por solvente foi, originalmente, introduzida como um processo para aumento da taxa de formação de co-cristal no estado sólido. Vários estudos, mostram que adicionalmente proporciona vários benefícios, incluindo maior rendimento, maior cristalinidade do produto e maior capacidade para controlo na formação de polimorfos [88].

A primeira referência de um co-cristal obtido por moagem diz respeito ao co-cristal equimolar quinona:hidroquinona, obtido por Wöhler em 1844.

Neste trabalho, foram preparados misturas binárias com diferentes proporções molares de luteolina com cada um dos potenciais co-formadores. As misturas foram submetidas a moagem num moinho de esferas Retsch MM400 em células de 1,5ml em aço inoxidável, com duas esferas de 4mm de diâmetro, também em aço inoxidável. As

experiências realizaram-se durante 30 min, com uma frequência de vibração de 15 Hz. A massa total utilizada foi cerca de 20mg. Não se efectuou qualquer adição de solvente.

- **Micro-ondas**

A radiação micro-ondas (MW) é um tipo de onda electromagnética, cuja sua frequência varia entre 300 MHz e 300 GHz. Esta região situa-se no espectro electromagnético entre a região de infravermelho e de ondas rádio [89].

O aquecimento por micro-ondas é também designado de aquecimento dieléctrico, e os dois mecanismos principais para a transformação de energia electromagnética em calor que existem são polarização de dipolo e condução iónica [90]. O primeiro mecanismo (polarização dipolar) é responsável pela maioria do efeito de aquecimento de micro-ondas. O campo aplicado interage com o alinhamento dos dipolos eléctricos moleculares de uma amostra, e esta interacção é responsável pelo aquecimento produzido por micro-ondas [91]. No segundo mecanismo o calor gerado é devido à irradiação micro-ondas que faz aumentar a mobilidade molecular por excitação das rotações moleculares através da interacção da radiação de micro-ondas, convertendo a energia cinética em calor [89].

O aquecimento dieléctrico depende das propriedades dieléctricas do material, tais como, a constante dieléctrica, ϵ , perda dieléctrica, ϵ' , factor de perda, $\tan\delta$, e a polaridade [92]. O factor de perda, $\tan\delta$, caracteriza-se por ser a capacidade que uma substância tem em converter energia de micro-ondas em calor, numa dada temperatura e frequência. Define-se por ser a razão entre a perda dieléctrica, ϵ' , que indica a eficácia com que a energia electromagnética é convertida em calor e a constante dieléctrica, ϵ , que indica a capacidade de um material ser polarizado sob a influência de um campo eléctrico. Assim, o aquecimento por micro-ondas de uma substância é tanto maior quanto maior for o valor de $\tan\delta$ [91].

A polaridade do solvente influencia a capacidade de interacção das moléculas com a energia do micro-ondas. Em geral, substâncias polares absorvem melhor a radiação de micro-ondas, enquanto substâncias menos polares ou substâncias com dipolo nulo têm uma absorção mais fraca [89].

A técnica de micro-ondas foi utilizada de forma a substituir os métodos de preparação habituais, de modo a tirar-se vantagens daquele. Revela ser um método de Química Verde, sem recurso a solventes bastante selectivo e rápido, em comparação com os métodos convencionais [93].

Bastante usado já em síntese orgânica, [89] este método foi utilizado até ao momento na síntese de um número limitado de co-cristais, por exemplo o do co-cristal cafeína:ácido maleico (1:1), [92]. Um outro exemplo de formação de co-cristal pelo método de síntese assistida por MW é indometacina:nicotinamida, [94].

A síntese de co-cristais assistida por radiação de micro-ondas foi realizada recorrendo ao equipamento Discover S-Class da CEM. A massa total das amostras rondava os 150mg. Para o caso do sistema da luteolina com a isonicotinamida não foi adicionado qualquer solvente. Para o sistema luteolina com teofilina e luteolina/cafeína foi utilizado 20µL de etanol, para cada sistema. Os sistemas foram sujeitos à temperatura de $T = 220^{\circ}\text{C}$, 250°C e 200°C , respectivamente. A potência utilizada para cada experiência foi de 300W. O tempo de permanência total de 12, 14 e 20 minutos foi o resultado da maior ou menor rapidez com que se atingiu a temperaturas programadas.

2.3 Métodos de análise

- **DSC**

A análise térmica é muito utilizada para a caracterização de sólidos farmacêuticos, fornecendo informação qualitativa e quantitativa, permitindo acompanhar as alterações de propriedades físicas e/ou químicas de uma determinada amostra [95].

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica utilizada para a detecção de polimorfos e uma ferramenta para o *screening* rápido de co-cristais [17].

A calorimetria diferencial de varrimento de compensação de potência, regista o fluxo de energia calorífica associado a transições observadas nos materiais em função da temperatura. A amostra em estudo e a referência são submetidas a um mesmo programa de aquecimento/arrefecimento, rigorosamente controlado, e o diferencial de temperaturas permanece nulo ($T_{amostra} = T_{ref}$). Assim, quando é detectada uma diferença nas temperaturas é adicionada energia térmica ($\partial H/\partial t$) a uma das células. São estas diferenças de energia calorífica que são usadas para o cálculo da variação entálpica.

As transições, exemplificadas na figura 17, surgem como picos endotérmicos, se o calor é absorvido pela amostra (por exemplo para a transição de fusão) ou como picos exotérmicos se o calor é produzido pela amostra (por exemplo para a transição de recristalização) [95].

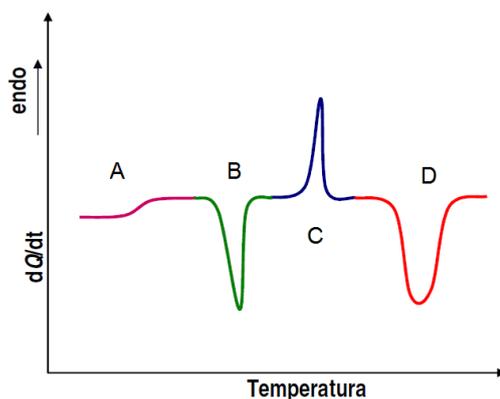


Figura 17 – Curva típica de DSC de compensação de potência; A: transição vítrea, B: transição exotérmica; C: transição endotérmica e D: reacção química exotérmica.

Neste trabalho foi utilizado o calorímetro de potência compensada, Perkin-Elmer DSC7, com refrigeração ajustada a $-7,8^{\circ}\text{C}$ (*intracooler* com circulação da mistura etilenoglicol/água (1:1) (v/v)). O azoto, utilizado como gás de purga, circulou com um fluxo de 20mL/min. Todas as amostras, com massa aproximada de 2mg, foram seladas em cápsulas de alumínio perfuradas e como referência foi utilizada uma cápsula igual, mas vazia. Todos os varrimentos efectuados ocorreram a uma velocidade de aquecimento de $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Utilizaram-se vários compostos para a calibração, que se encontram mencionados na tabela 3.

Tabela 3 – Padrões para calibração em DSC.

Calibrante	$T_{\text{fusão}} / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta H / \text{J.g}^{-1}$
Bifenilo (CRM LGC 2610)	68,7	120,2
Índio (Padrão Perkin-Elmer)	156,6	28,5
Estanho (Padrão Perkin-Elmer)	231,9	59,5
Chumbo (Padrão Perkin-Elmer)	327,5	23,1
Zinco (Padrão Perkin-Elmer)	419,6	112,0

• Termomicroscopia

A técnica de termomicroscopia (PLTM) é um método de grande utilidade na medida que complementa a informação obtida por calorimetria diferencial de varrimento.

As informações obtidas, aquando do aquecimento da amostra, podem ser importantes por fornecerem indicações de transição no sólido e no líquido, que de outro

modo poderiam passar despercebidas. Estes eventos podem incluir fusão, cristalização, sublimação, dessolvatação e outras transições de fase.

Este processo utiliza a luz polarizada que ao atravessar a amostra põe em evidência diversos aspectos relacionados com a estrutura. É possível distinguir se se está perante meios anisotrópicos (apresentam cor quando sujeitos a luz polarizada) ou isotrópicos (líquidos, vidros e cristais cúbicos, em que as propriedades são idênticas em qualquer direcção) [96, 97].

No entanto, é difícil determinar se as diferenças na morfologia são causadas por polimorfismo ou se são, simplesmente, o resultado de alterações nas condições de crescimento ou do solvente seleccionado [98].

Os sólidos obtidos foram caracterizados por PLTM utilizando uma placa de aquecimento de Linkam, modelo DSC600, com um bloco central, constituído por uma unidade CI94, cuja função é controlar a temperatura nas etapas de aquecimento/arrefecimento, uma unidade LNP94/2 que controla a refrigeração, uma unidade VTO232 e um computador, que controla todo o sistema. A temperatura do forno é controlada por sensores de Pt100.

É ainda utilizado, para observação óptica, um microscópio Leica DMRB, uma câmara de vídeo Sony CCD-IRIS/RB de modelo DXC-151 AP, um monitor Sony HR Trinitron modelo PVM-2053MD e um DVDR 520H/00. Na análise de imagem utilizou-se o software da Linkam systems com RTVMS (sistema de medição em tempo real).

As imagens foram obtidas por utilização combinada de luz polarizada e de compensadores, o que confere à imagem de fundo uma cor única e não negra, utilizando ampliação de 200X.

Os ensaios foram realizados à velocidade de 10°C/min.

- **Termogravimetria**

Neste método a variação de massa da amostra é quantificada em função da temperatura enquanto a amostra é sujeita a um programa controlado de aquecimento, numa atmosfera bem definida [95]. Assim, para medir esta variação de massa, o método de TG utiliza o calor para activar reacções e mudanças físicas nos materiais [99].

A TG prevê informação quantitativa da variação da massa de materiais associados a uma transição [95], a uma degradação térmica (que normalmente é acompanhada por libertação de produtos voláteis) [98]. O método de TG pode ser utilizado, por exemplo, para medir taxas de sublimação [96].

As amostras foram analisadas numa balança termogravimétrica da Perkin-Elmer STA 600m, um sistema TG/DTA, com banho a 15°C. Neste equipamento TG encontra-se hifenado com DTA e, deste modo, para a mesma temperatura, foi possível a visualização de fenómenos de perda de massa, conjuntamente com os fenómenos observados nas curvas de DTA.

Com massa de cerca de 10mg, numa atmosfera de N₂, as amostras foram sujeitas a uma velocidade de 10°C/min ou de 20°C/min, numa gama de temperatura entre 15°C e 800°C.

- **Espectroscopia de Infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho é um método de estudo muito usado na indústria farmacêutica para a caracterização do estado sólido [12, 100].

Neste método, as transições vibracionais desde o estado fundamental e, normalmente, até o primeiro estado vibracional excitado ocorrem com a absorção de radiação, pelos compostos, na região do infravermelho do espectro. Observar-se-á uma banda no espectro se o momento vibracional resultar em mudança do momento dipolar [12, 96, 98].

Deste modo, cada molécula possui um espectro de absorção único, funcionando como uma “impressão digital” [12, 96].

Pela posição e intensidade das bandas no espectro de infravermelho, esta técnica oferece informações sobre a estrutura e a conformação molecular no estado sólido [12, 98].

Com o método de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é possível uma aquisição de grande qualidade de espectros, o que aumenta a relação sinal/ruído. Ainda, diminui o tempo de aquisição do espectro, medindo todas as frequências da região do infravermelho, simultaneamente [100].

De modo a não ser induzida a formação de qualquer outra forma polimórfica, resultante da preparação de pastilhas de KBr, [96] é utilizado o método de espectroscopia de infravermelho de refletância total atenuada (ATR), não sendo necessária a moagem da amostra para recolha do espectro. No entanto, é necessário uma baixa pressão sobre o sólido a analisar, que se encontra em contacto com um elemento reflector de Diamante, de modo a obter um bom espectro [101].

O espectro da luteolina comercial, a de partida, foi a referência perante as demais amostras obtidas, quer para detecção de polimorfismo, como de compostos multicomponentes.

Espectros dos sólidos foram registados à temperatura ambiente num ThermoNicolet FT-IR 380, resolução de 1cm^{-1} , entre os comprimentos de onda de 4000 a 400cm^{-1} . Foi usado um acessório ATR SmartOrbit, modelo ATR Diamond.

- **Difracção de Raios-X**

A técnica de Difracção de raios-X (XRD) corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de estruturas cristalinas [102].

Esta técnica abrange duas possibilidades de análise de sólidos moleculares, distinguindo-se entre métodos de cristal único e métodos de pó. O método de cristal único diferencia-se na medida que proporciona detalhes acerca da estrutura molecular cristalina, no entanto é necessário um cristal com tamanho e características propícias à observação, nem sempre capaz de se reproduzir [103].

Evidenciando a difracção de raios-X de pó (PXRD), este método consiste na detecção de uma série de picos identificados em vários ângulos de espalhamento. Estes ângulos e as suas intensidades relativas estão correlacionados com as distâncias interplanares, d , calculadas para proporcionar uma caracterização cristalográfica completa da amostra em pó.

A técnica baseia-se na lei de Bragg, $n \lambda = 2 d \sin \theta$, onde n é a ordem de reflexão, λ é o comprimento de onda dos raios-X, d é o espaço interplanar num cristal e θ é o ângulo de incidência dos raios-X. Esta descreve a difração de feixe de raios-X monocromático que colidem num plano de átomos (do material cristalino) [100, 104].

As experiências de difracção de raios-X de pó foram realizadas num difractómetro INEL CPS ($\lambda\text{CuK}\alpha 1 = 1,54056\text{\AA}$) equipado com um detector sensível a uma posição de curvatura de 120° . As amostras foram colocadas em capilares de vidro ($\varnothing = 0,3\text{mm}$). De modo a garantir uma correta intensidade relativa das reflexões, a ausência de orientação preferencial o capilar é colocado sob rotação, sendo a recolha de dados efectuada por períodos que podem ir até às 24h.

Na preparação de algumas amostras, colocou-se o material no exterior do capilar envolto em vaselina, a fim de se evitar a manipulação da amostra.

3. Resultados e Discussão

3.1 Estudo sobre a amostra de partida

- **Caracterização por DSC**

A investigação da luteolina iniciou-se pelo estudo termodinâmico, realizando-se ciclos de aquecimento e arrefecimento por calorimetria diferencial de varrimento, sobre o composto de partida.

Na figura 18 apresentam-se curvas de DSC de aquecimento, exemplificativas do comportamento da luteolina em ciclos de aquecimento / arrefecimento diferentes. As curvas de aquecimento a2 e a3 foram obtidas após fusão do composto e arrefecimento a 10°C/min até 25°C.

Na Tabela 4 indicam-se os parâmetros termodinâmicos das transições observadas no primeiro aquecimento do composto de partida.

No primeiro aquecimento da luteolina (a1), registam-se vários eventos, num comportamento semelhante ao observado, mas não discutido, anteriormente. [105] Este primeiro aquecimento (a1) exhibe um pico endotérmico de maior energia com $T_{onset} = (338,4 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, o qual corresponde ao processo de fusão do composto. A $T = (59,2 \pm 8,3)^\circ\text{C}$ inicia-se um processo endotérmico, que se estende por uma gama relativamente larga de temperatura e que é compatível com um processo de dessolvatação –

perda de água existente no hidrato [72]. A $T = (215,3 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ observa-se uma transição exotérmica, sugerindo uma transição sólido-sólido do composto. Após cristalização do fundido, nos aquecimentos a2 e a3 não se observam os dois processos iniciais e é ainda de realçar o facto da temperatura de fusão ser inferior aos valores registados no primeiro aquecimento e da entalpia de fusão diminuir. Estes resultados sugerem degradação do composto e contaminação do composto fundido imediatamente a seguir à fusão, o que se confirma por análise termogravimétrica, (resultados são apresentados mais à frente, nesta tese). Assim, apenas se considerará o primeiro aquecimento (a1) para os restantes estudos.

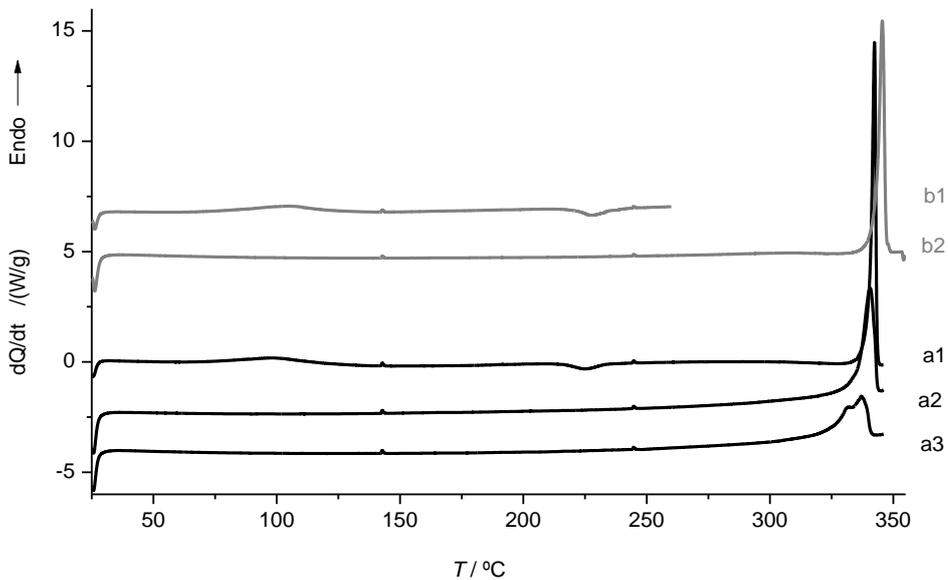


Figura 18 – Curvas de DSC de vários aquecimentos da LUT; a1= primeiro aquecimento - amostra comercial, a2= segundo aquecimento após fusão de LUT e arrefecimento até 25°C, a3= aquecimento após a2 e arrefecimento até 25°C, b1= primeiro aquecimento até $T=250^\circ\text{C}$ – luteolina comercial, b2= segundo aquecimento da LUT, após b1, e arrefecimento até 25°C; $\beta = 10^\circ\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do 1º aquecimento de LUT comercial.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$
1ª transição endotérmica	$59,2 \pm 8,3$	$13,9 \pm 7,3$
1ª transição exotérmica	$215,3 \pm 2,0$	$-3,9 \pm 0,7$
2ª transição endotérmica	$338,4 \pm 0,5$	$56,2 \pm 0,9$

Número de ensaios $n=6$

A transição exotérmica observada a $T = 215^\circ\text{C}$ foi tida em conta de modo a confirmar a obtenção de uma nova forma sólida do composto. Deste modo procedeu-se a um outro ciclo de aquecimento/arrefecimento (processo b), figura 18. A amostra comercial foi aquecida até $T = 250^\circ\text{C}$ (b1), temperatura à qual o processo exotérmico está completo. De seguida procedeu-se ao arrefecimento até ao ponto de partida, e novamente a

aquecimento até à fusão (curva b2, figura 18) No primeiro aquecimento (b1) repetem-se as observações registadas no processo a1. No arrefecimento não se registou qualquer ocorrência. No segundo aquecimento (b2) apenas é observado um processo, o de fusão, não se verificando nem a desidratação nem a transição sólido-sólido, processos observados nos aquecimentos a1 e b1 a $T = (59,2 \pm 8,3)^\circ\text{C}$ e $T = (215,3 \pm 2,0)^\circ\text{C}$, respectivamente. A fusão ocorre à mesma temperatura da experiência a1. Estes ensaios comprovam que a forma sólida obtida após a transição a $T = 215^\circ\text{C}$, que denominaremos como forma 2, se mantém estável, mesmo após arrefecimento até à temperatura ambiente, o que nos permitiu fazer a sua caracterização por XRPD, FTIR-ATR como se mostra noutra secção desta tese.

- **Caracterização por PLTM**

Utilizou-se a técnica de PLTM com o objectivo de visualizar as transformações da LUT com a variação da temperatura até ao processo de fusão. As imagens obtidas no processo de aquecimento da amostra comercial estão ilustradas na figura 19.

O composto de partida, de natureza policristalina, com partículas de dimensões reduzidas, permitiu ainda assim a observação de transformações sólido-sólido, com início a cerca de $T = 211^\circ\text{C}$, ocorrendo, concomitantemente sublimação do composto. Este fenómeno é comprovado por perda progressiva de nitidez da imagem e acumulação de composto sublimado no topo da célula do aparelho.

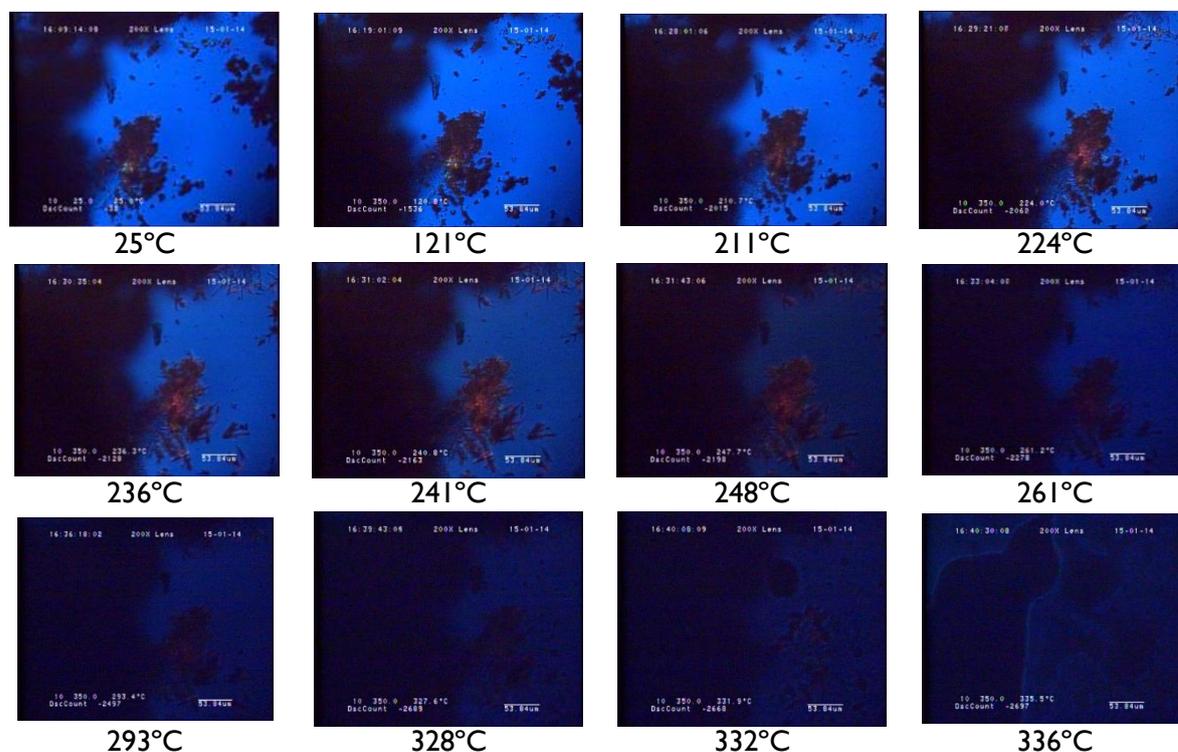


Figura 19 – Imagens obtidas por Termomicroscopia com luz polarizada no aquecimento duma amostra de luteolina comercial. $\beta = 10^\circ\text{C min}^{-1}$, ampliação de 200X.

• Caracterização por TG

A amostra de partida foi também investigada pela técnica hifenada Termogravimetria/DTA por forma a registar possíveis perdas de massa ao longo do processo de aquecimento.

Na figura 20 está ilustrada a curva de TG obtida, juntamente com a curva de DTA, esta última em tudo semelhante ao resultado apresentado na figura 18, a I.

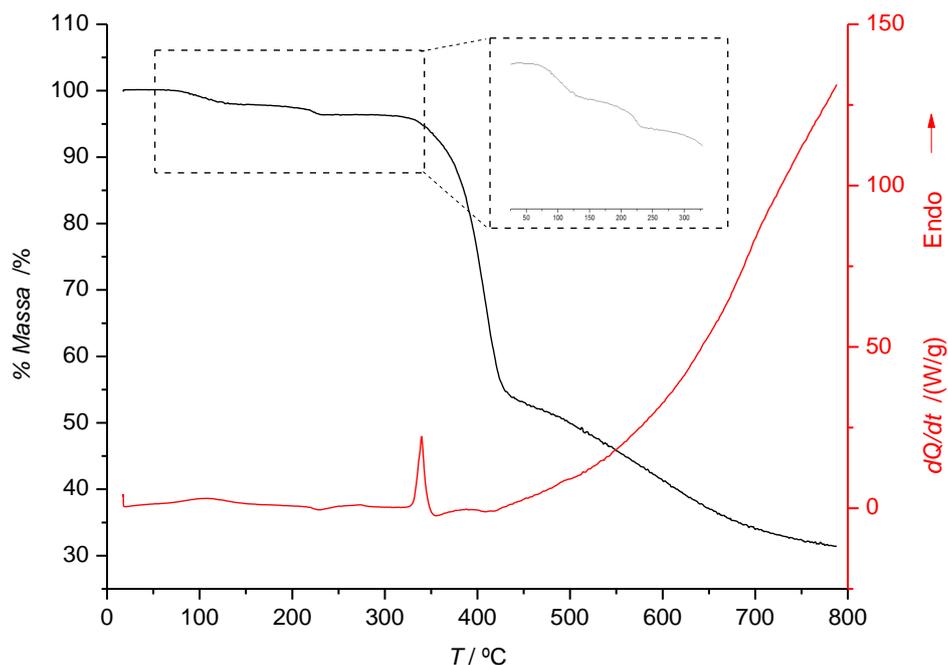


Figura 20 - Curvas de TG-DTA registadas no aquecimento da LUT comercial; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, atmosfera de N_2 .

Da análise destes resultados verifica-se que há registo de dois processos de perda de massa, antes da fusão. O primeiro com início a cerca de $T = 66^{\circ}\text{C}$ estendendo-se até cerca de $T = 140^{\circ}\text{C}$, envolve perda de massa de $(2,2 \pm 0,1)\%$ - média de 3 ensaios, (2 efectuados a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e 1 a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Esta perda de massa, que se atribuiu à dessolvatação do hidrato, corresponde a uma estequiometria do hidrato de LUT. $0,4 \text{ H}_2\text{O}$.

Por volta dos 215°C é registado um segundo processo de perda de massa de $(0,8 \pm 0,5)\%$ - média de 3 ensaios, mais influenciado pela velocidade de aquecimento, que se atribui à sublimação já registada por PLTM, concomitante com a transição do sólido desidratado para uma nova forma.

A integridade da amostra de luteolina submetida a aquecimento até $T = 250^{\circ}\text{C}$ - depois de transição exotérmica a $T = 215^{\circ}\text{C}$, foi confirmada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C .

Imediatamente após a fusão ocorre abruptamente perda de massa devido à degradação do composto.

- **Caracterização por FTIR-ATR e XRPD**

É importante referir que não se conhecem até agora polimorfos deste flavonóide. Os resultados descritos nas secções anteriores – dessolvatação, transição sólido-sólido, registados em DSC (figura 18) e alterações observadas pela técnica de PLTM (figura 19), indicam a formação de novas formas sólidas deste composto.

A fim de avaliar/confirmar a existência de novas formas sólidas, efectuaram-se espectros de infravermelho e de difracção de raios-X de pó da luteolina de origem e da forma 2, o sólido resultante do aquecimento até uma temperatura de 250°C, temperatura superior à da transição exotérmica verificada na curva de DSC (figura 18).

Os espectros de infravermelho evidenciam claramente a existência de diferenças estruturais entre o composto de partida, hemi-hidrato, e a forma 2 de luteolina (figura 21).

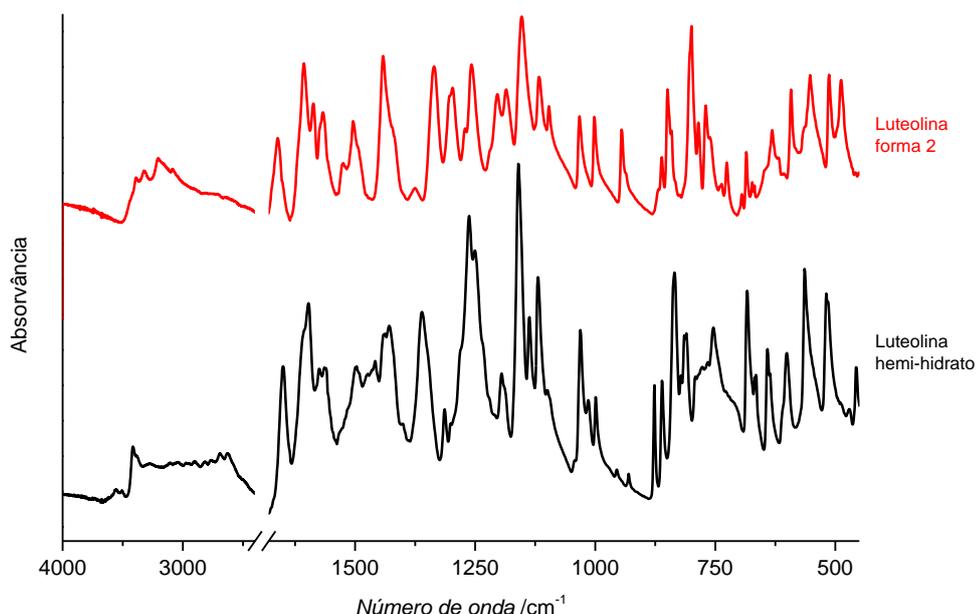


Figura 21 - Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida e LUT forma 2.

As diferenças são notórias em toda a gama espectral, nomeadamente, como se esperaria, na região de alongação dos grupos OH que originam bandas complexas com início a cerca de 3500cm⁻¹. A diferença mais substancial ocorre na região abaixo de 3100cm⁻¹, atribuída por Machado *et al.* [106] à alongação do grupo OH que na luteolina de partida se encontra envolvido em ligações de H intramoleculares, ver figura 10. Na estrutura cristalina do hemi-hidrato de luteolina descrita na literatura [72], o grupo -O₃H está envolvido em

ligação de H intramolecular com o oxigênio do grupo $C_4=O_2$, figura 10. É também observada na luteolina de partida uma banda bifurcada entrada em 3526cm^{-1} que não é visível na forma 2. Também a elongação do grupo carbonilo sofre um deslocamento de 1650cm^{-1} na LUT de partida para 1661cm^{-1} na forma 2. Os modos normais de vibração dos anéis aromáticos, a cerca de 1610 , 1568 , 1515 e 1448cm^{-1} [105, 106] são também deslocadas na luteolina forma 2.

De salientar ainda as alterações substanciais, por exemplo, na banda bifurcada que na luteolina de partida se centra a 1260 , 1245cm^{-1} para a qual contribuem, segundo a atribuição feita por Machado *et al.* [106], os modos de deformação angular dos grupos $-O_3H$ e $-O_4H$ (ver figura 10). A banda centrada em 1194cm^{-1} na LUT original, que também tem contribuição da deformação angular $-O_4H$, tem também alterações substanciais.

Na figura 22 é feita a comparação do difractograma experimental da amostra de luteolina de partida, do obtido por simulação para a estrutura resolvida na referência [72] e ainda do difractograma experimental da forma 2.

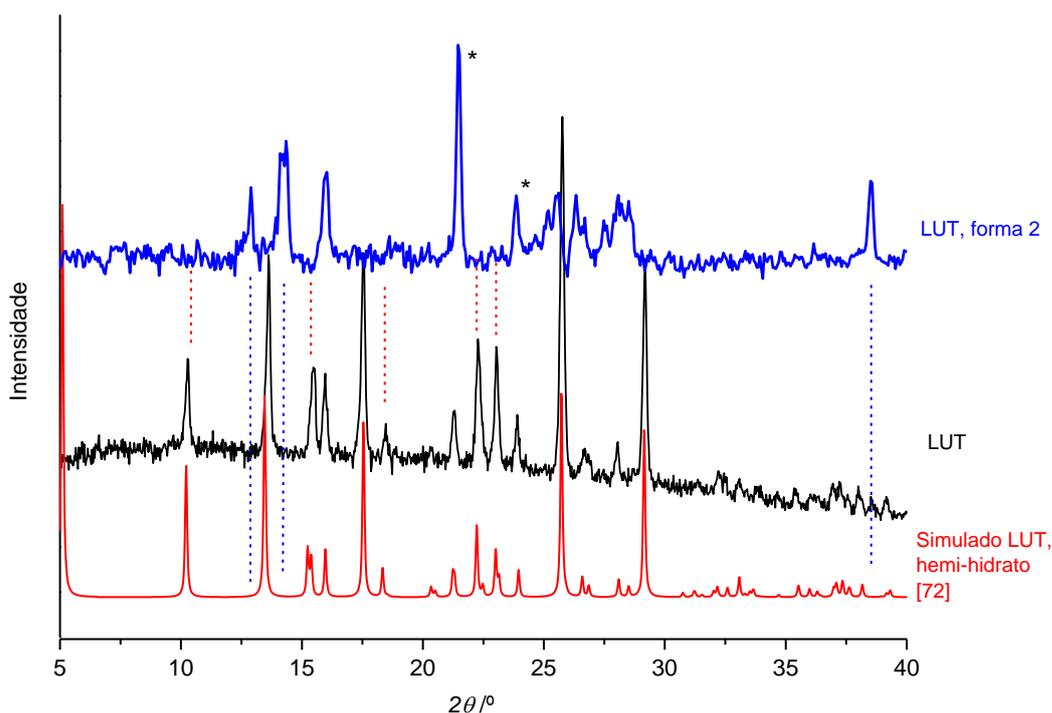


Figura 22 – Difractogramas de raios-X de pó experimentais da amostra de luteolina de partida, LUT e da forma 2. Difractograma de raios-X de pó simulado para a estrutura cristalina descrita na referência [72]; *contaminante.

Conforme referido anteriormente, o difractograma obtido experimentalmente para a amostra de partida é idêntico ao simulado a partir dos dados depositados na CCDC [72] podendo-se assim confirmar que se trata da mesma estrutura cristalina de LUT.

O difractograma de pó da forma 2 difere significativamente do da amostra de partida, confirmando tratar-se de uma estrutura cristalina diferente da luteolina. Assinalaram-se no difractograma da LUT forma 2 algumas das reflexões nomeadamente a $12,9^\circ$, $14,1^\circ$, $38,5^\circ$ que não se encontram presentes na luteolina de partida.

3.2 Screening de novas formas sólidas por cristalização em solventes

Com o intuito de gerar possíveis novas formas sólidas da luteolina, foram efectuados vários ensaios de cristalização por evaporação de solvente em vários solventes, indicados na tabela 5. Todos estes solventes pertencem às classes 2 ou 3 da classificação de solventes residuais da USP [107]. Deste modo, pretendia-se que a luteolina cristalizasse no seio da solução com novo arranjo molecular. Os resultados esperados destes ensaios poderão ser novas formas polimórficas ou solvatos cristalinos.

Usaram-se solventes polares apróticos como THF, 1,4-dioxano e acetona, e polares próticos, álcoois, metanol, etanol e 2-butanol e água. [108] Na tabela 5 são também apresentadas algumas propriedades destes solventes de modo que seja mais fácil perceber o que os distingue nas interações com o composto em estudo, as quais poderão condicionar os sólidos formados na cristalização. As propriedades apresentadas são a temperatura de ebulição, o momento dipolar, μ , a polarizabilidade electrónica, a constante dieléctrica, ϵ , e os parâmetros de Kamlet e Taft, π^* , parâmetro de polaridade/polarizabilidade, e α e β relativos à capacidade dos solventes actuarem como dador e aceitador em ligação de hidrogénio, respectivamente.

A solubilidade do composto de partida, luteolina, em alguns dos solventes é referida por outros autores: em acetona o valor referido é $0,0269 \text{ mol/kg}$, em metanol de $0,0169 \text{ mol/kg}$, em etanol de $0,0403 \text{ mol/kg}$, valores a 25°C [70], água de $1,93 \times 10^{-5} \text{ mol/kg}$ e no caso da mistura de etanol e água com $x_{\text{et}} = 0,2$ é de $2,33 \times 10^{-3} \text{ mol/kg}$, valor a 20°C [71].

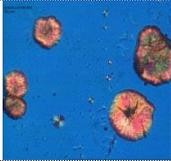
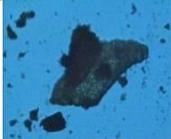
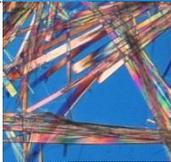
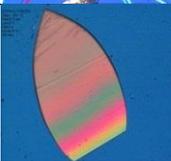
Após evaporação dos solventes, os sólidos resultantes foram analisados. Numa primeira abordagem, foi feita observação em microscópio sob luz polarizada e análise por espectroscopia de infravermelho, FTIR-ATR. Estes resultados encontram-se explanados na tabela 6.

Tabela 5 – Algumas propriedades dos solventes utilizados nas experiências de cristalização da luteolina. [108]

Solvente	Tebulição /°C	μ / D	Polarizabilidade eletrónica / (10 ⁻³⁰ m ³)	ϵ^a	α	β	π^*
THF	66	1,75	7,9	7,58	0,00	0,55	0,55
1,4-Dioxano	101,3	0,45	8,6	22,21	0,00	0,37	0,49
Acetona	56	2,69	20,56	4,72	0,08	0,48	0,62
Água	100	1,85	1,5	78,36	1,17	0,47	1,09
Metanol	64,7	2,87	3,3	32,66	0,98	0,66	0,60
Etanol	78,4	1,66	5,1	24,55	0,86	0,75	0,54
2-Butanol	99	1,66	8,8	16,56	0,69	0,80	0,40

^aT = 298,15K

Tabela 6 – Caracterização dos sólidos obtidos nos processos de cristalização da luteolina em vários solventes.

Solvente	Imagem*	Hábito cristalino	FTIR-ATR**
THF		Aglomerado de acículas	a
1,4-Dioxano		Esferulites + aglomerados microcristalinos	a (+ b)
Acetona		Placas + aglomerado microcristalino	c
Etanol/água (1:1 v/v)		Acículas	d
Etanol/água (4:6 v/v)		Acículas	d
Metanol		Lamelas com contorno em arco gótico	e
Etanol		Partículas de pequenas dimensões	c
2-Butanol		Aglomerado de acículas + aglomerados microcristalinos	c (+ a)

*Observação sob luz polarizada; ampliação: 200X; **Foram registados espectros de infravermelho diferentes, identificados por letras de a a e.

Os sólidos obtidos nos diferentes solventes apresentam hábitos cristalinos distintos. A forma mais comum são as acículas ou aglomerado de acículas; no entanto há casos de cristais lamelares com contorno em arco gótico (sólidos obtidos em metanol) e ainda sólidos constituídos por partículas de pequenas dimensões (1,4-dioxano, acetona, etanol e 2-butanol).

Os espectros de infravermelho dos sólidos obtidos a partir dos diferentes solventes podem agrupar-se em cinco tipos distintos. No caso dos cristais obtidos em THF, dos cristais obtidos de 1,4-dioxano e dos aglomerados de acículas de 2-butanol, o espectro repete-se – espectro (a), exemplificado na figura 23. As partículas microcristalinas obtidas em 1,4-dioxano têm espectro diferente do dos cristais obtidos, concomitantemente, no mesmo solvente – espectro (b), figura 24. Os espectros referentes às partículas microcristalinas obtidas em acetona, etanol e 2-butanol são semelhantes entre si - (c), figura 25. Os cristais aciculares obtidos de misturas de etanol/água (1:1) e (4:6) (v/v), são idênticos entre si e distintos de qualquer um dos anteriores - espectro (d), figura 26. Apenas para o caso dos cristais obtidos em metanol o espectro é análogo ao da LUT hemi-hidrato, (e), figura 27.

Nenhum dos sólidos gerados é a forma 2 da luteolina, como é confirmado pela dissemelhança dos espectros de infravermelho mostrados nas figuras 23 a 27.

Nos dois solventes polares apróticos THF e 1,4-dioxano foi obtido o mesmo tipo de forma sólida, com espectro (a). O espectro (c) foi registado para sólidos gerados em solventes polares próticos, etanol e 2-butanol e também na acetona, a qual tem um valor de parâmetro de Kamlet e Taft, α baixo, mas não nulo [108] (dá conta da capacidade do solvente actuar como dador em ligação de hidrogénio). No entanto, os processos de nucleação e crescimento cristalino são muito complexos, com influência de variados factores e não é seguro, com base nos resultados disponíveis, procurar tirar ilações adicionais.

O facto de os espectros de infravermelho (a) e (c), terem sido obtidos para sólidos cristalizados em solventes diferentes, indica que se está na presença ou de novos polimorfos ou de novos solvatos, no último caso, certamente hidratos.

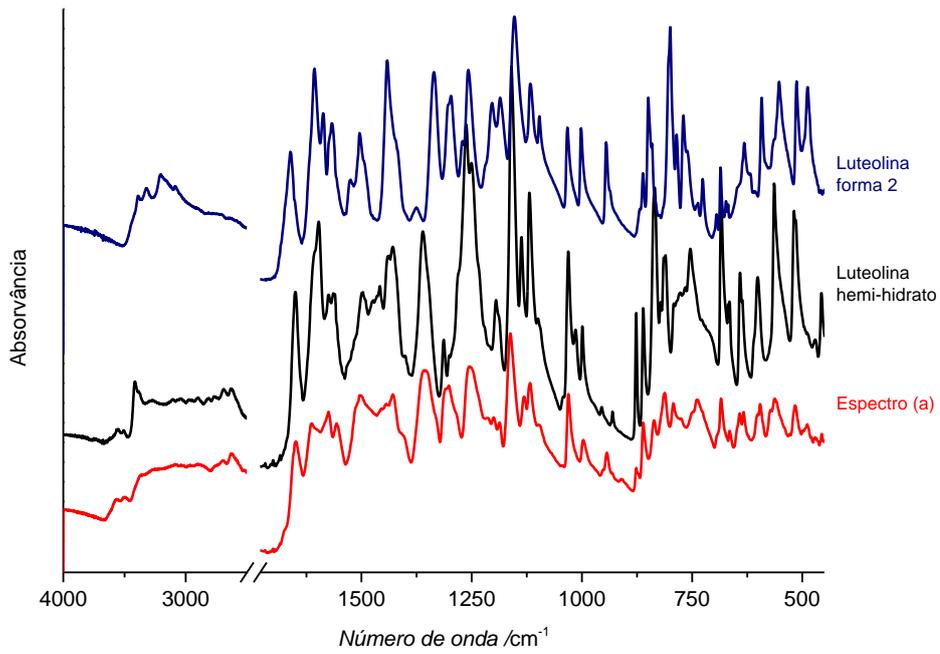


Figura 23 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização em THF, 1,4-dioxano e em 2-butanol – espectro (a).

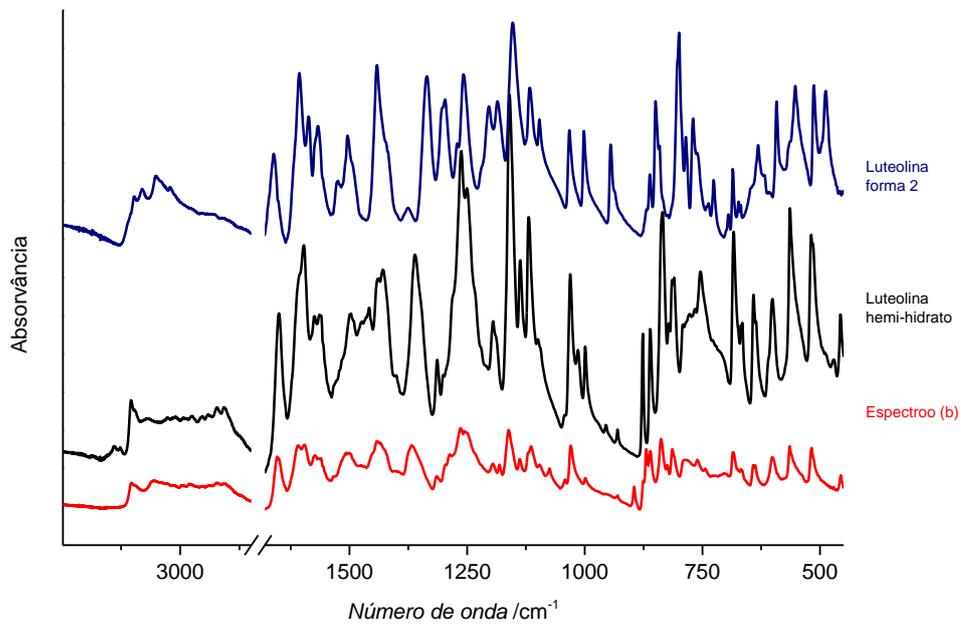


Figura 24 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e das partículas microcristalinas obtidas em 1,4-dioxano – espectro (b).

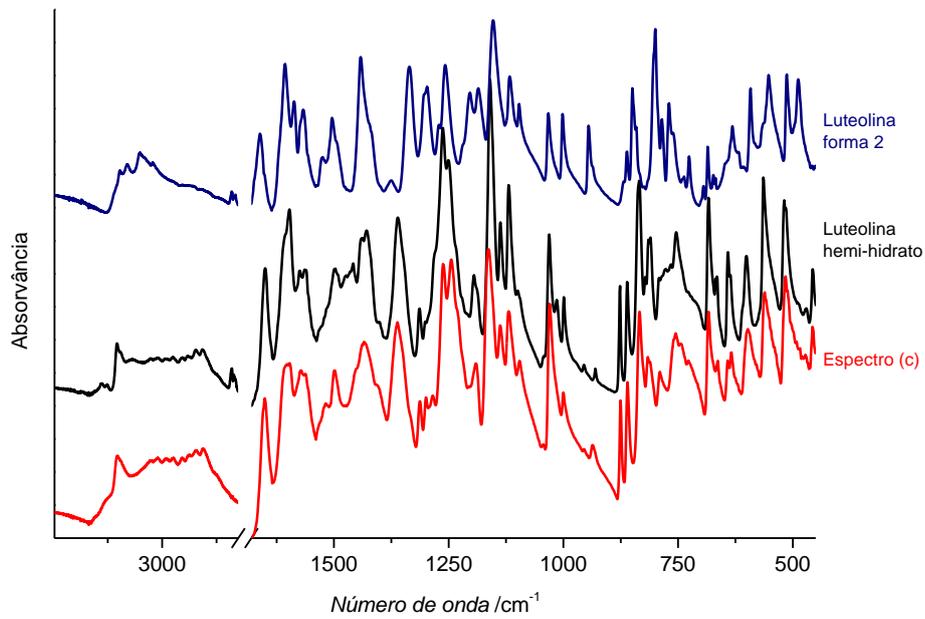


Figura 25 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização em acetona, etanol e 2-butanol – espectro (c).

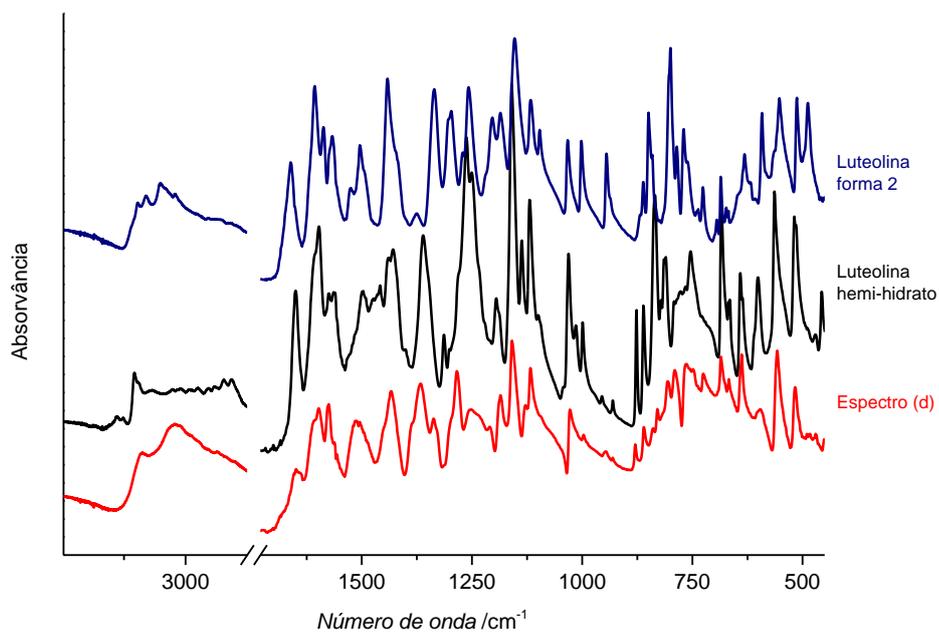


Figura 26 - Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização em misturas de etanol/água – espectro (d).

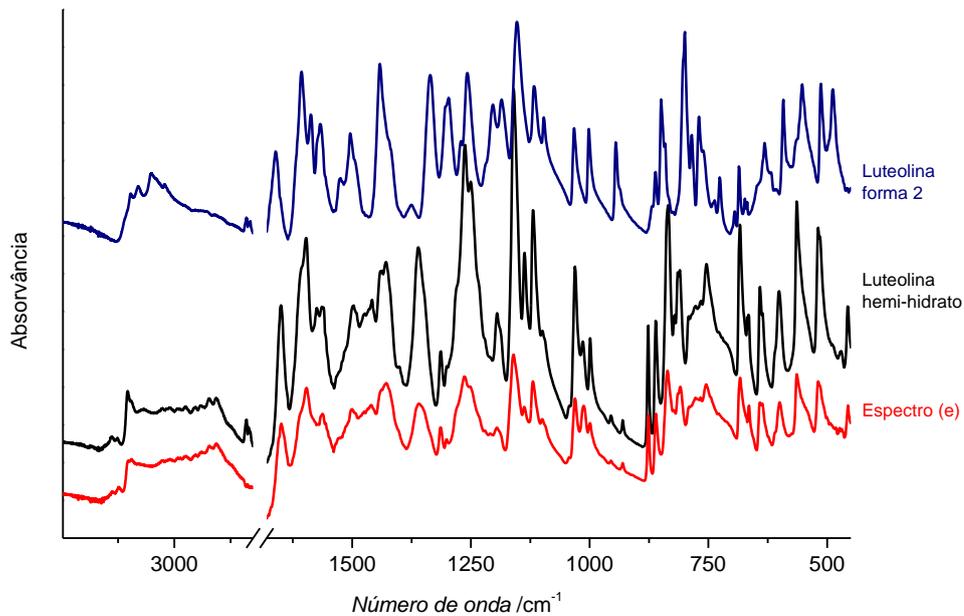


Figura 27 – Espectros de FTIR-ATR da luteolina de partida, da LUT forma 2 e do sólido obtido por cristalização em metanol – espectro (e), idêntico ao de luteolina de partida.

Na figura 28 reúnem-se os diferentes espectros de infravermelho obtidos. As diferenças entre eles são notórias.

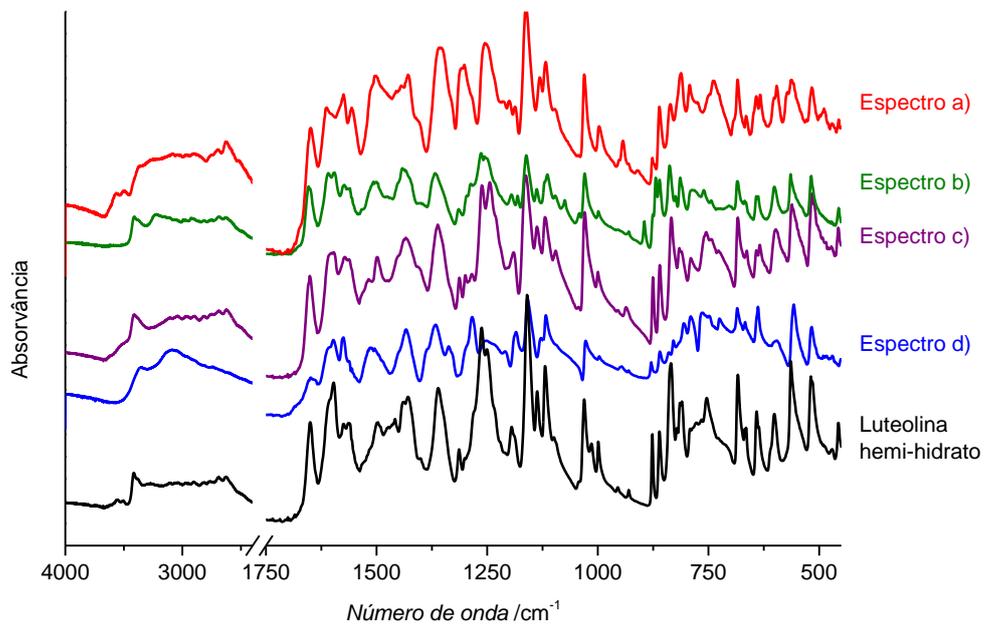


Figura 28 – Resumo dos espectros de FTIR-ATR dos vários sólidos obtidos por cristalização em solventes e da LUT de partida.

Em todos os espectros há alterações na banda que na luteolina aparece bifurcada e centrada em 3526cm^{-1} .

Na zona de 1600cm^{-1} , para o espectro (a) há deslocamento da banda e para a zona entre 1500cm^{-1} e 1460cm^{-1} . Nas bandas presentes entre 1314cm^{-1} e 1200cm^{-1} há deslocamento e formas diferentes para todos os espectros (a), (b), (c) e (d). Para o caso do espectro (a) e (d) estes apresentam a banda aos 1137cm^{-1} deslocada. O pico aos 1014cm^{-1} suprime-se para todos os casos. Na zona entre 820cm^{-1} e 720cm^{-1} os espectros apresentam diferenças em relação ao composto de partida.

Foram registados difractogramas de raios-X de pó, quando se dispunha de quantidade suficiente de amostra, figura 29. Para evitar alteração da forma sólida, aquando do enchimento dos capilares, o sólido foi colocado no exterior do capilar com auxílio de vaselina, procedimento também seguido no estudo da forma 2.

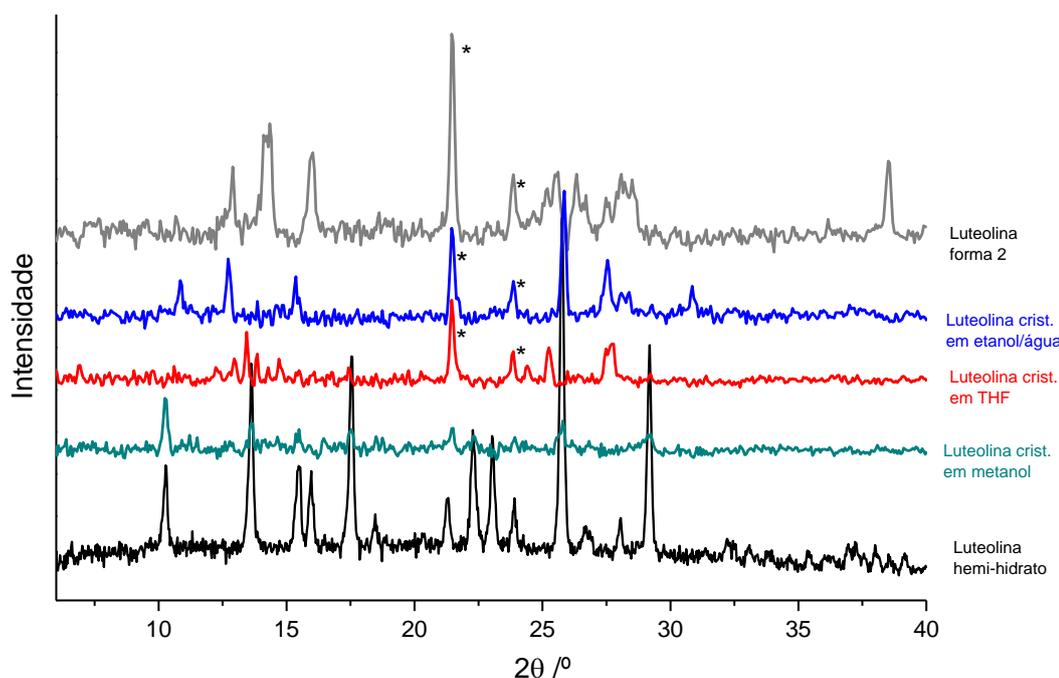


Figura 29 – Difractogramas experimentais da LUT de partida hemi-hidrato, da LUT forma 2 e dos sólidos obtidos por cristalização da LUT em metanol, THF e etanol/água; *contaminante.

Apesar da qualidade dos difractogramas não ser a melhor, pode-se verificar que, para o caso do metanol, as reflexões observadas são coincidentes com as da LUT hemi-hidrato, como se esperaria com base na semelhança dos espectros de infravermelho.

No caso dos sólidos gerados em etanol/água e THF os difractogramas diferem entre si, do da luteolina de partida e da LUT, forma 2. Por exemplo, os picos a $2\theta = 10,3^\circ$, $16,0^\circ$,

17,5°, 22,3°, 23,0° e 29° da LUT, hemi-hidrato, estão ausentes em ambos os casos. Os picos a $2\theta = 14,2^\circ$ e $38,6^\circ$ da luteolina 2 não se observam em ambos os novos sólidos.

No caso do sólido obtido em THF existe um pico extra a $2\theta = 14,7^\circ$ e no sólido obtido em etanol/água a $2\theta = 11^\circ$ e $30,9^\circ$, que estão ausentes nos difractogramas das outras duas formas.

Estes resultados confirmam a obtenção de formas sólidas novas da luteolina.

- **Investigação exploratória por análise térmica**

Foram ainda realizados estudos preliminares por análise térmica dos diferentes sólidos obtidos por cristalização por evaporação do solvente, de forma a compreender o seu comportamento ao nível de transformações/transições de fase. Utilizaram-se dois métodos de análise térmica – DSC e PLTM.

Nas figuras 30 a 38 apresentam-se as curvas de DSC de aquecimento dos sólidos obtidos e as imagens registadas por PLTM, também no aquecimento.

Para o sólido cristalizado em THF, que tem espectro FTIR-ATR, (a), por DSC obteve-se uma curva de aquecimento com um pico endotérmico inicial com temperatura máxima de 75°C. Aos 299°C ocorre uma transição exotérmica. A fusão tem lugar a cerca de 340°C, figura 30. A primeira transição endotérmica tem o perfil que se espera quando ocorre dessolvatação de solvatos, o que, pelas razões referidas atrás, apontaria para que se estivesse na presença de um hidrato. São necessários estudos complementares para confirmar esta hipótese.

Das imagens de PLTM, figura 31, é visível a ocorrência de uma transição sólido-sólido com início a cerca de 295°C, com aparecimento de um cristal de dimensões apreciáveis.

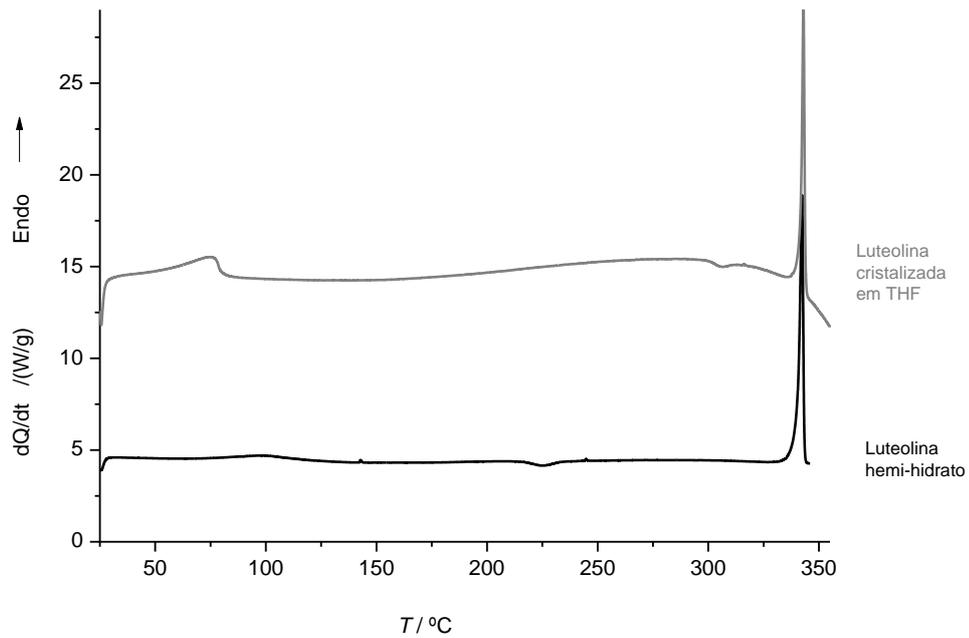


Figura 30 - Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado em THF e da LUT de partida; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

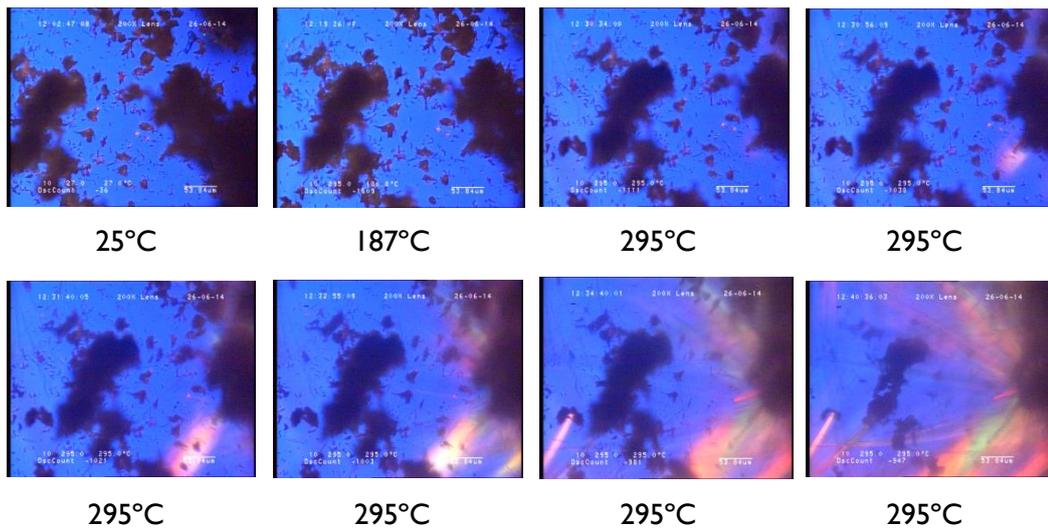


Figura 31 – Imagens de PLTM do aquecimento num intervalo entre 25°C e 295°C de LUT cristalizada em THF, $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$; ampliação 200x.

As partículas microcristalinas obtidas em 1,4-dioxano, com espectro FTIR-ATR (b), dão origem a uma curva de DSC, figura 32, com um pico endotérmico inicial com temperatura máxima de 178°C. A fusão ocorre a uma temperatura de 330,5°C. O comportamento é diferente do registado para as outras amostras.

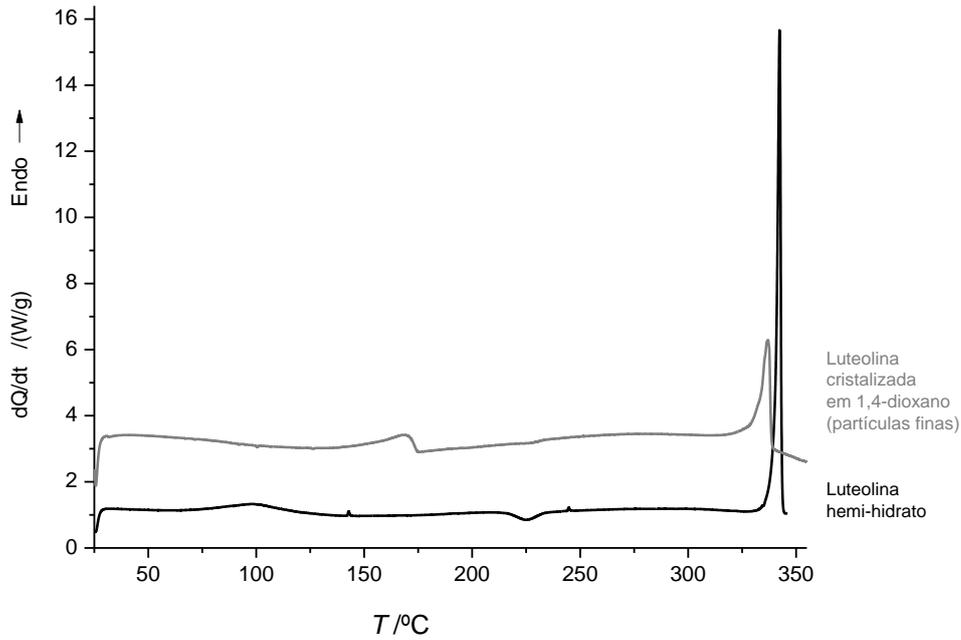


Figura 32 – Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado em 1,4-dioxano (partículas finas de pequenas dimensões) e da LUT de partida; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

Para o sólido cristalizado em acetona, espectro de FTIR-ATR (c), são observados eventos térmicos complexos, entre 100 e 220°C e fusão por volta de 336°C, figura 33 (a).

Das imagens recolhidas por PLTM, figura 34, vê-se um processo de transição de fase com início a cerca de 130°C.

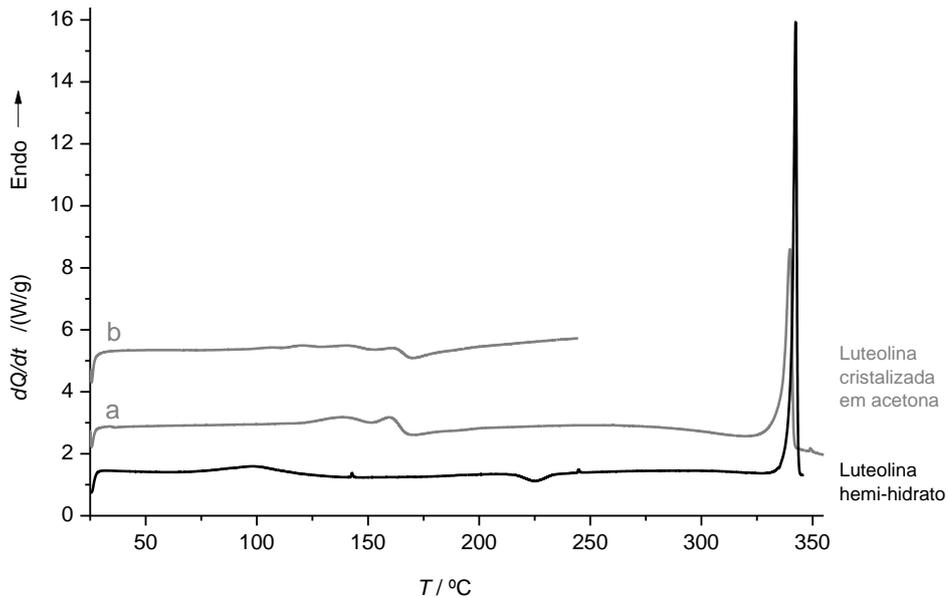


Figura 33 - Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado em acetona e da LUT de partida; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

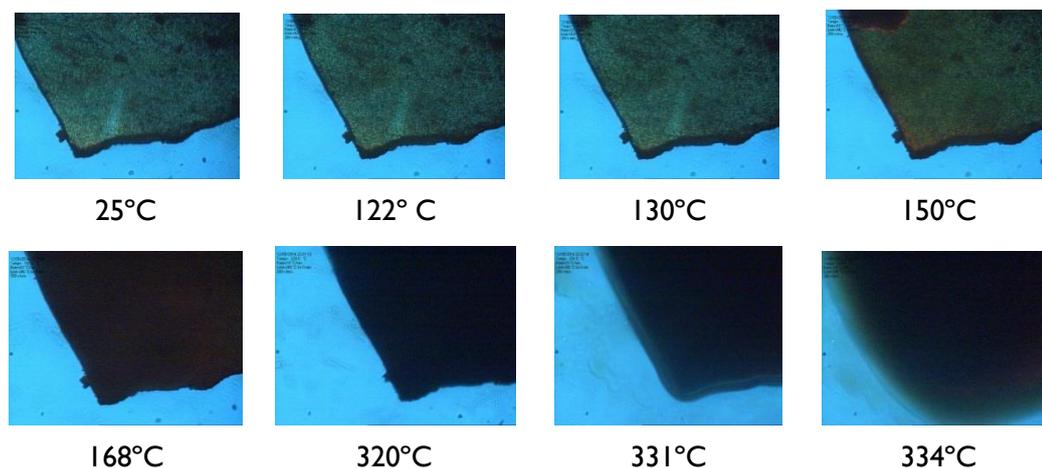


Figura 34 – Imagens de PLTM do aquecimento de LUT cristalizada em acetona, num intervalo entre 25°C e 334°C. $\beta = 10^\circ\text{C min}^{-1}$; ampliação 200x.

Os resultados obtidos para o sólido obtido nas cristalizações em misturas etanol/água (1:1 e 4:6 v/v), com espectro de FTIR-ATR (d), indicam a presença de um solvato. Na curva de DSC, figura 35, (a), observa-se um processo endotérmico de elevada energia com $T_{onset} = 92^\circ\text{C}$, seguido de um evento exotérmico por volta dos 150°C e de fusão a cerca de 335°C . A primeira transição não é muito evidente nas imagens de termomicroscopia, figura 36, apesar de algumas modificações serem notórias a partir de 69°C . A partir de 147°C é nítida uma transição sólido-sólido. O processo de fusão não é observado devido à sublimação do composto.

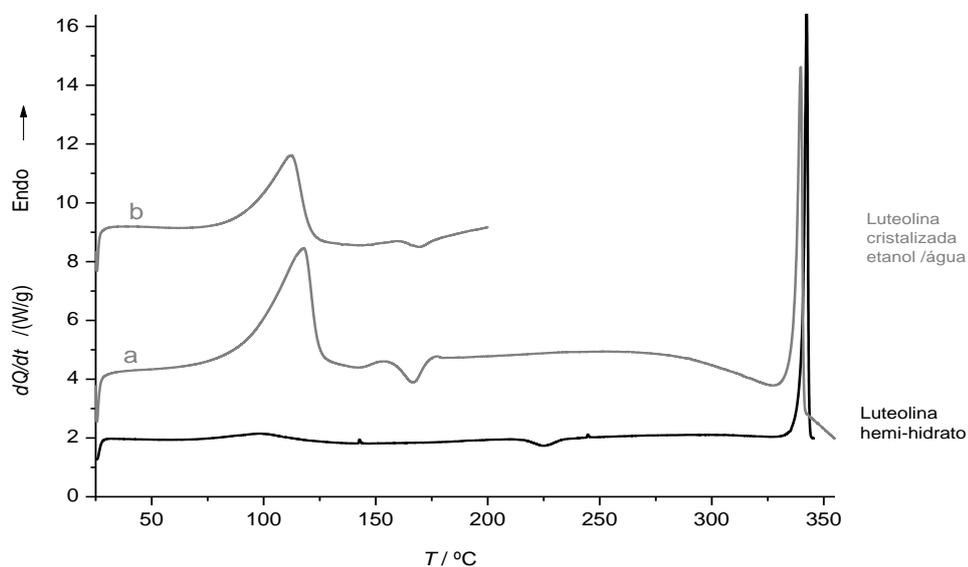


Figura 35 - Curvas de DSC de aquecimento do sólido cristalizado numa mistura etanol/água e da LUT de partida; $\beta = 10^\circ\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

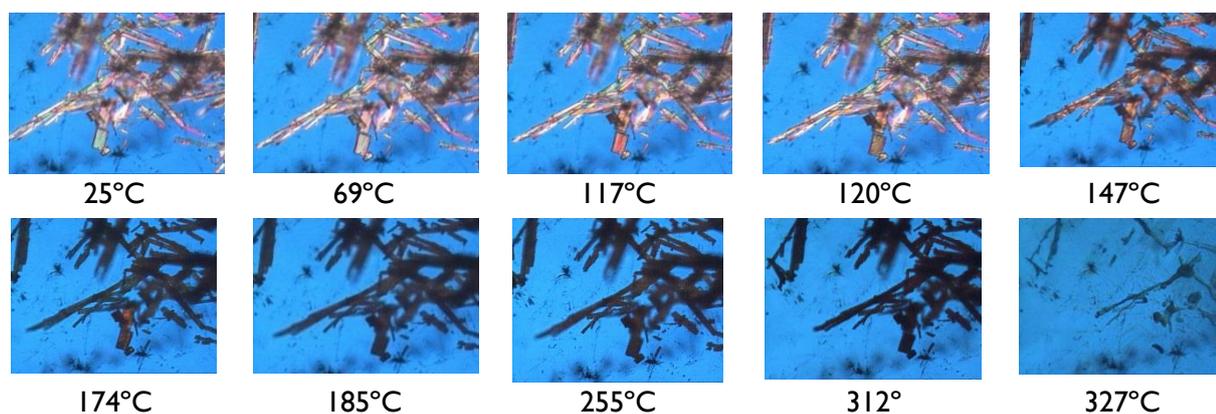


Figura 36 – Imagens de PLTM do aquecimento de LUT cristalizada em etanol/água, num intervalo entre 25°C e 327°C. $\beta = 10^\circ\text{C min}^{-1}$; ampliação 200x.

Assim, para todos os casos estudados verifica-se a ocorrência de uma transição sólido-sólido antes da fusão. Para os cristais obtidos por cristalização em THF, acetona e etanol/água foi realizado o estudo por FTIR-ATR do composto obtido após a transição sólido-sólido verificada, quer por DSC quer por PLTM. No caso do THF a amostra obteve-se a partir da experiência de aquecimento em PLTM, com crescimento visível de uma nova forma (figura 31); nos outros casos, a amostra foi gerada por aquecimento em DSC até temperatura superior à da transição, figura 33 (b) e 35 (b), seguida de arrefecimento até à temperatura ambiente.

Nos três casos, para os cristais obtidos por aquecimento obteve-se o espectro de FTIR-ATR igual ao da forma 2 da luteolina, figura 37. Assim, mesmo que diferente a forma inicial, após o aquecimento o composto transita para a forma 2 da luteolina.

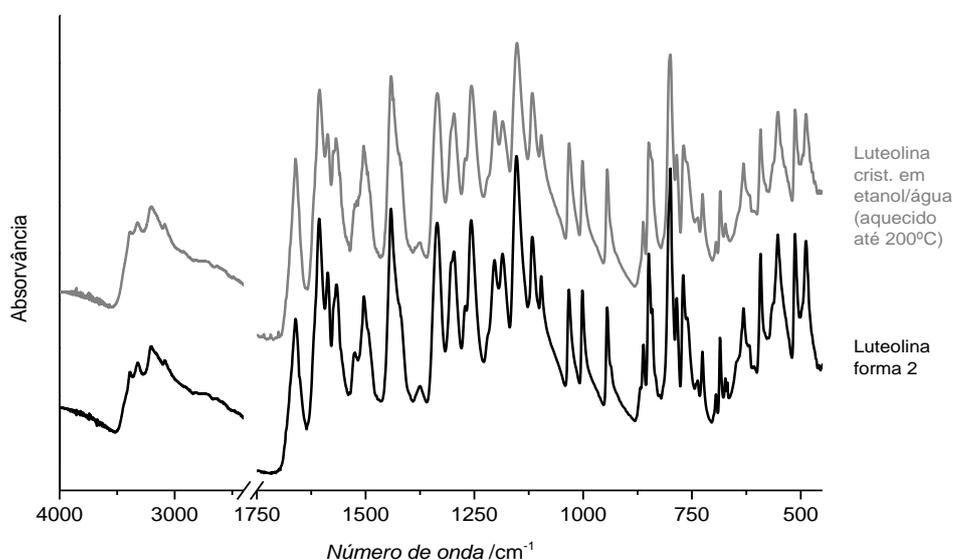


Figura 37 - Espectros de FTIR-ATR da LUT forma 2 e do sólido obtido por aquecimento até 200°C da amostra cristalizada em etanol/água.

3.3 Investigação da formação de co-cristais de Luteolina

Co-formadores: anti-inflamatórios não esteróides

Na investigação de formação de co-cristais de luteolina foram inicialmente usados como potenciais co-formadores dois anti-inflamatórios não esteróides, o (S)-naproxeno e o (S)-ibuprofeno. Com ambos os compostos é possível a formação, com a luteolina, do mesmo tipo de sintões supramoleculares, figura 12.

Na figura 38 estão representadas as curvas de DSC referentes aos aquecimentos da luteolina e do (S)-naproxeno e das misturas com proporção molar LUT:NPX 1:1, 2:1 e 1:2.

Da interpretação das curvas para as várias misturas pode-se concluir que se trata de uma mistura física dos compostos, com reduzida miscibilidade na fase líquida. Os vários fenómenos endotérmicos ocorridos coincidem, ou são muito próximos das temperaturas de fusão dos compostos puros, $T_{\text{fusão}}$ (S)-naproxeno = 155°C. Assim, não há formação de co-cristal nem de eutético por parte destes dois compostos.

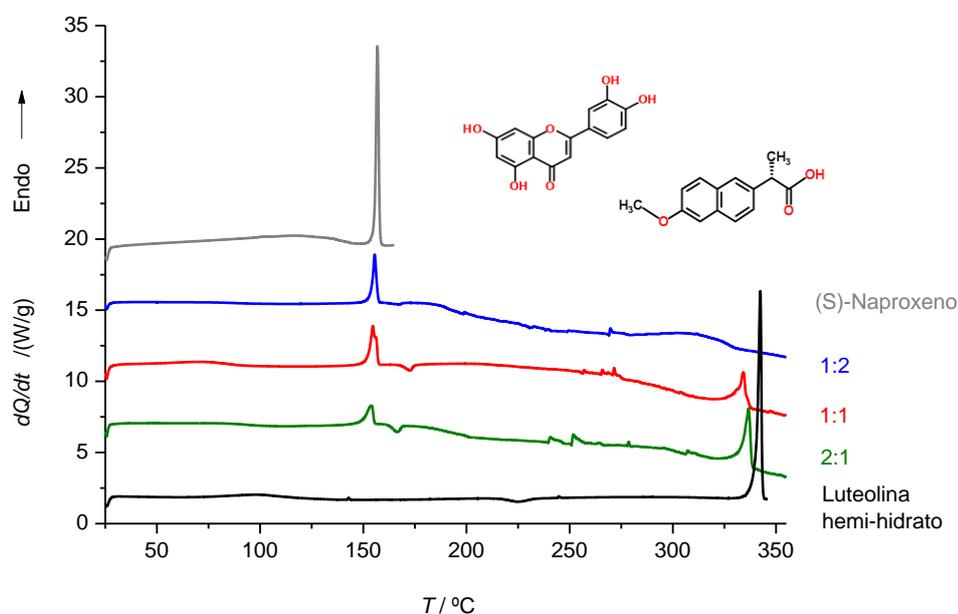


Figura 38 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, do (S)-NPX e das várias misturas obtidas em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

Na figura que se exhibe a seguir, figura 39, estão representados os espectros de infravermelho para os compostos puros, LUT e (S)-NPX, e para as misturas de diferentes composições deste sistema.

A comparação dos espectros dos compostos puros, LUT e (S)-NPX, com os das diferentes misturas permite concluir que não há qualquer deslocamento nas bandas observadas: os espectros das misturas são simples soma das contribuições dos compostos puros, confirmando assim os resultados preliminares obtidos pelo método DSC.

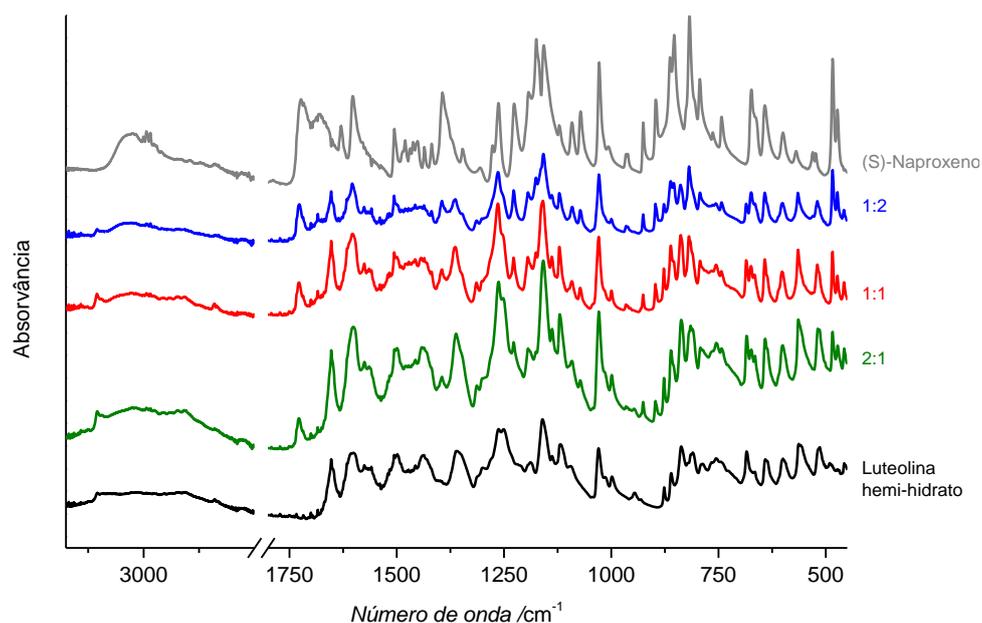


Figura 39 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e (S)-NPX, e das misturas LUT: (S)-NPX (1:1), (1:2) e (2:1) obtidas no moinho de bolas.

Os resultados obtidos usando o outro anti-inflamatório não esteróide, (S)-ibuprofeno como potencial co-formador, são muito próximos do que se observou com (S)-naproxeno. Na figura 40 estão apresentadas as curvas de DSC para o aquecimento da luteolina, de (S)-ibuprofeno e de uma mistura equimolar de ambos.

Pela análise das três curvas, é evidente que não existe formação de co-cristal entre os dois compostos: ocorrem fenômenos endotérmicos em duas temperaturas diferentes e idênticas às da fusão dos compostos puros ($T_{(S)\text{-ibuprofeno}} = 49^{\circ}\text{C}$).

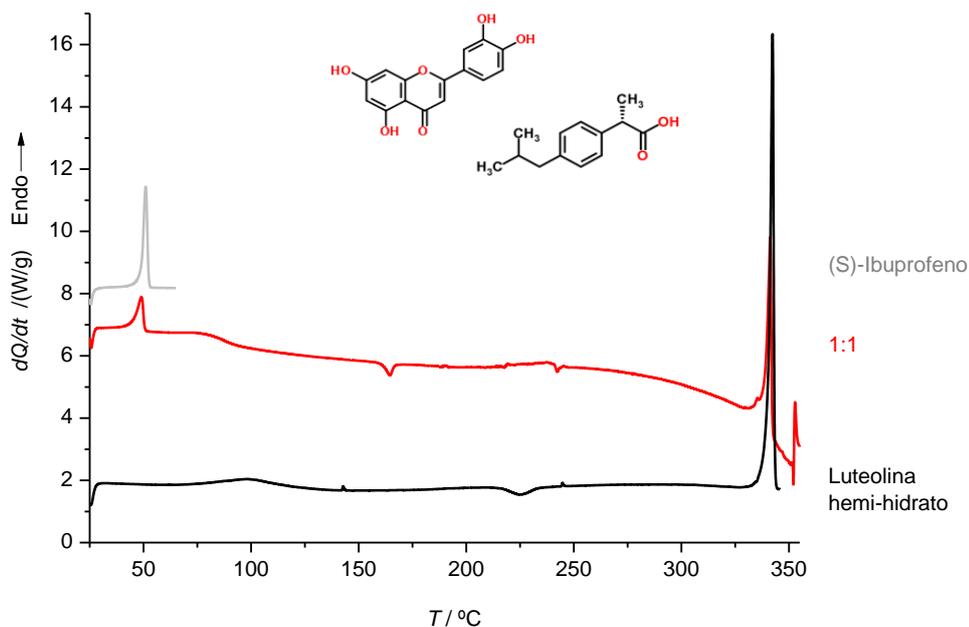


Figura 40 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, do (S)-ibuprofeno e da mistura 1:1 obtida em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

Os espectros de infravermelho apresentados na figura 41 confirmam esta conclusão.

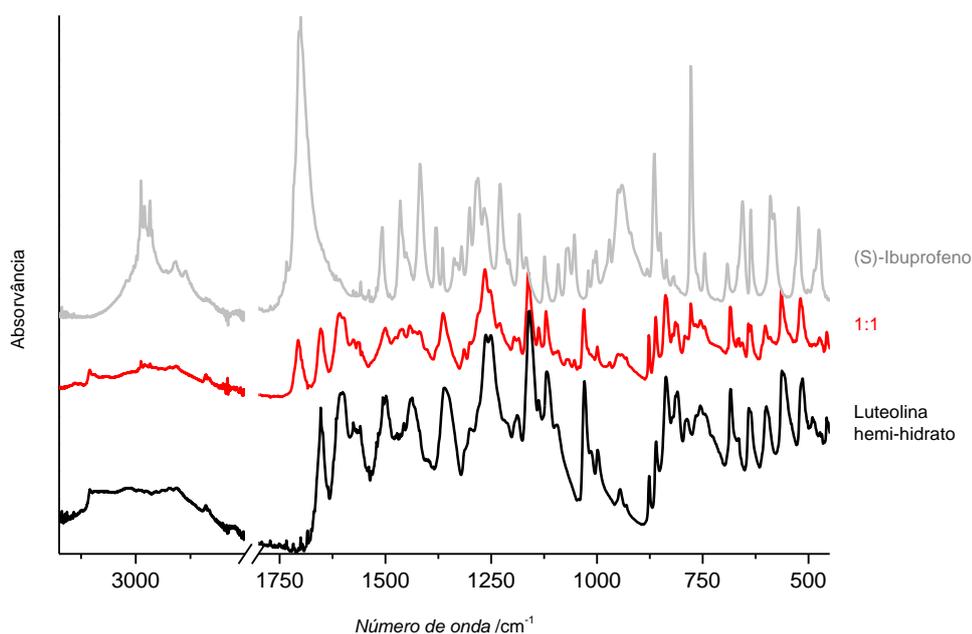


Figura 41 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e (S)-ibuprofeno, e da mistura (1:1), obtida no moinho de bolas.

Assim, verificou-se que não houve formação de qualquer co-cristal entre a luteolina e os anti-inflamatórios não esteróides estudados.

Co-formadores: carboxamidas

Como referido anteriormente, estão descritos na literatura co-cristais da luteolina com uma carboxamida, a isonicotinamida, INA, obtidos por cristalização por evaporação do solvente [34].

Neste trabalho foram feitas tentativas de obtenção dos co-cristais para o sistema LUT:INA, mas por outros métodos: por moagem em moinho de bolas e no estado sólido, com assistência por micro-ondas (a uma temperatura de 220°C). Procurava-se em ambos os processos evitar recurso a solventes, contrariamente ao descrito.

Estudou-se, também uma outra carboxamida, a pirazinamida, na expectativa de se repetir os resultados positivos.

Da comparação das curvas de DSC de luteolina, de pirazinamida e duma mistura equimolar de ambos, figura 42, é notório que não há formação de co-cristal. Os fenómenos endotérmicos ocorridos para a mistura acontecem nas temperaturas de fusão dos compostos puros ($T_{fusão}$ de PZA é de 188°C).

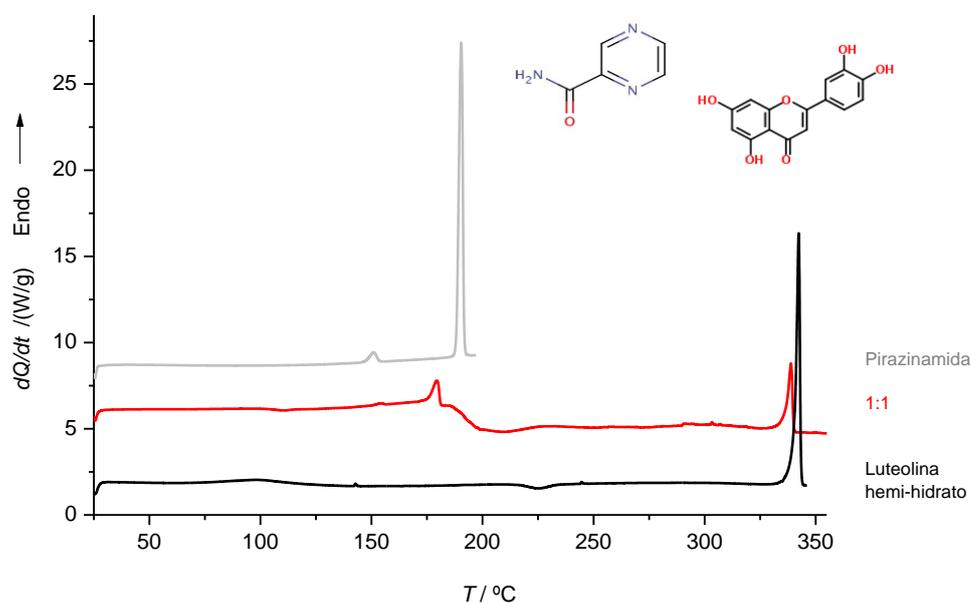


Figura 42 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da PZA e da mistura 1:1 obtida em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

Como se esperaria o espectro de infravermelho da mistura, figura 43, é soma das contribuições dos compostos puros.

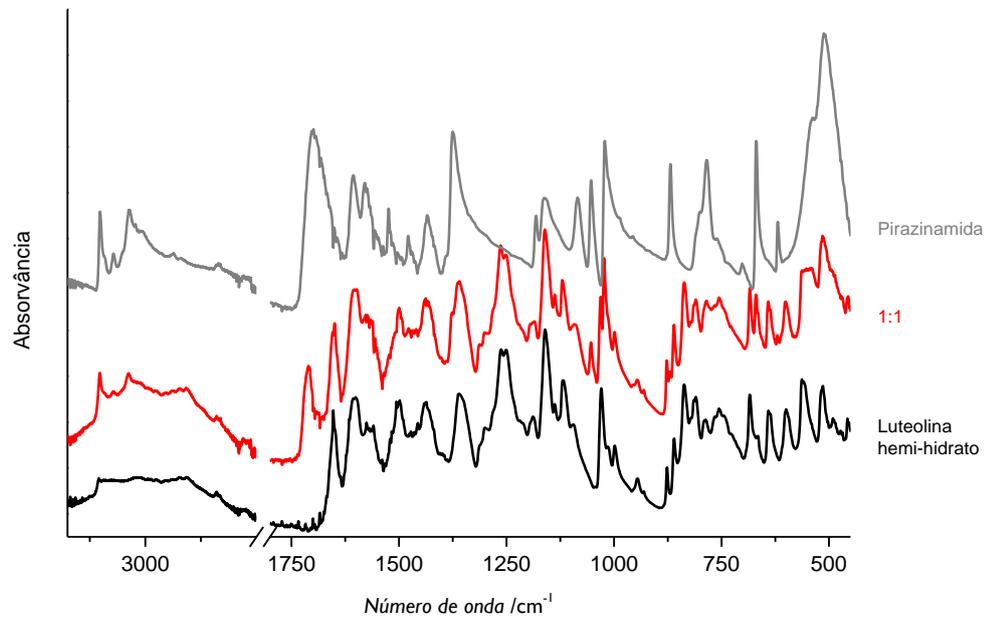


Figura 43 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e PZA, e da mistura (1:1), obtida no moinho de bolas.

No estudo do sistema luteolina:isonicotinamida, foi feita a preparação de uma mistura equimolar por mecanoquímica, sem adição de solvente, cujo espectro de infravermelho se apresenta na figura 44.

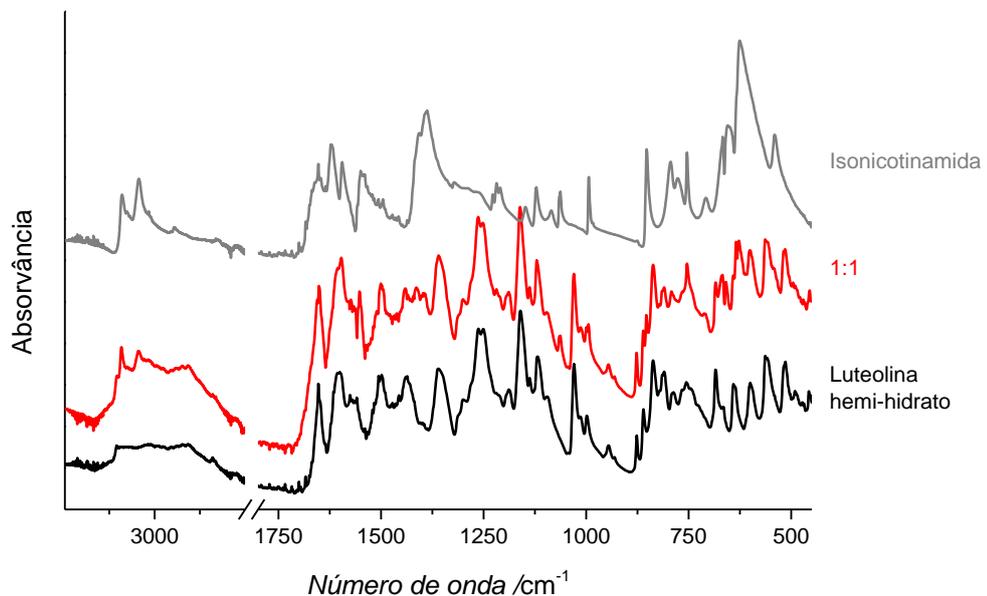


Figura 44 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e INA, e da mistura (1:1), obtida no moinho de bolas.

Pela análise das bandas de infravermelho conclui-se que o co-cristal não se forma à temperatura ambiente apenas com moagem no moinho de bolas. No entanto na curva de aquecimento obtida por DSC para a mistura 1:1 preparada por moagem no moinho de bolas, figura 45, é observada fusão a temperatura diferente da temperatura de fusão dos compostos de partida, superior à da isonicotinamida e inferior à da luteolina. Do valor obtido, $T_{fusão} = 260^{\circ}\text{C}$, pode propor-se que o co-cristal formado nestas experiências é o co-cristal II já descrito, LutInam 2 [34]. Na análise por Termogravimetria apresentada na literatura verifica-se que ocorre degradação, concomitantemente, com a fusão o que também é evidenciado na curva de DSC apresentada.

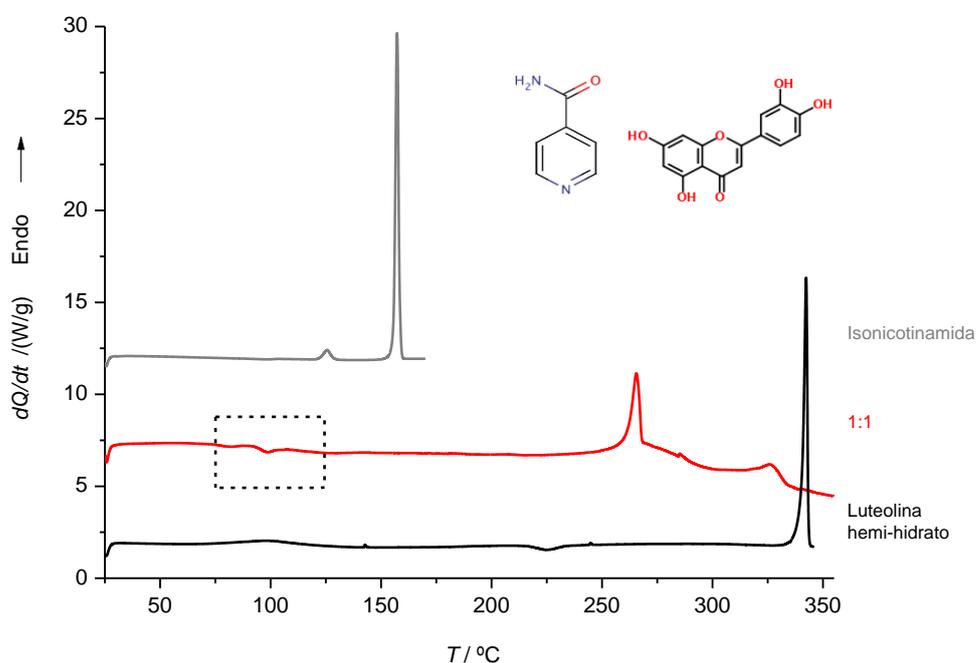


Figura 45 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da INA e da mistura 1:1 obtida em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

Assim, de modo a clarificar a ideia da formação do co-cristal por aquecimento, que é corroborada pela observação de eventos térmicos a cerca de 100°C assinalados na figura 45, procedeu-se ao aquecimento, em DSC, da mistura obtida por moagem no moinho de bolas até à temperatura de 220°C , curva a, figura 46. A amostra foi em seguida arrefecida até 25°C , curva b, e de novo aquecida até 355°C , curva c, figura 46. A expansão das curvas que se mostra na figura 46, confirma, na curva a, a ocorrência de um evento exotérmico que se estende entre $\sim 50^{\circ}\text{C}$ e $\sim 150^{\circ}\text{C}$, e que não tem correspondência, nas curvas b e c.

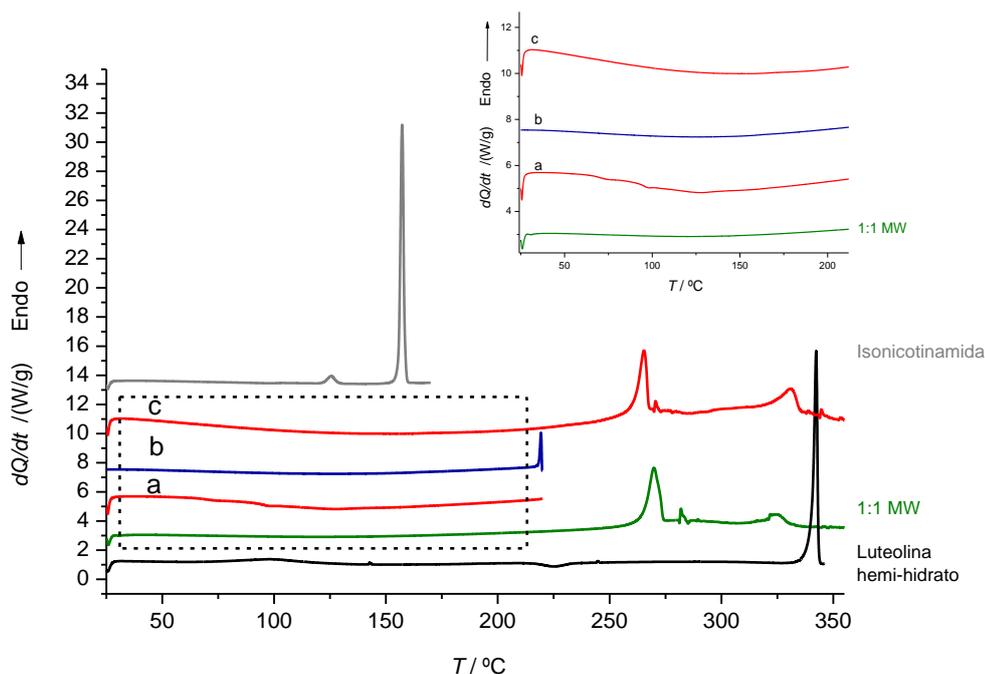


Figura 46 – Curvas de DSC obtidas num ciclo de aquecimento/arrefecimento da mistura equimolar de luteolina:isonicotinamida obtida por mecanoquímica; a) aquecimento; b) arrefecimento (após a); c) aquecimento (após b); curva de DSC de aquecimento do sólido obtido por irradiação com micro-ondas da mistura equimolar LUT:INA; curvas de DSC de aquecimento dos compostos de partida.

O espectro de infravermelho de uma amostra preparada num ciclo aquecimento/arrefecimento idêntico ao que originam as curvas a e b na figura 46, é mostrado na figura 47. Como se antecipou, o espectro indica a formação de uma nova estrutura cristalina, diferente dos compostos de partida.

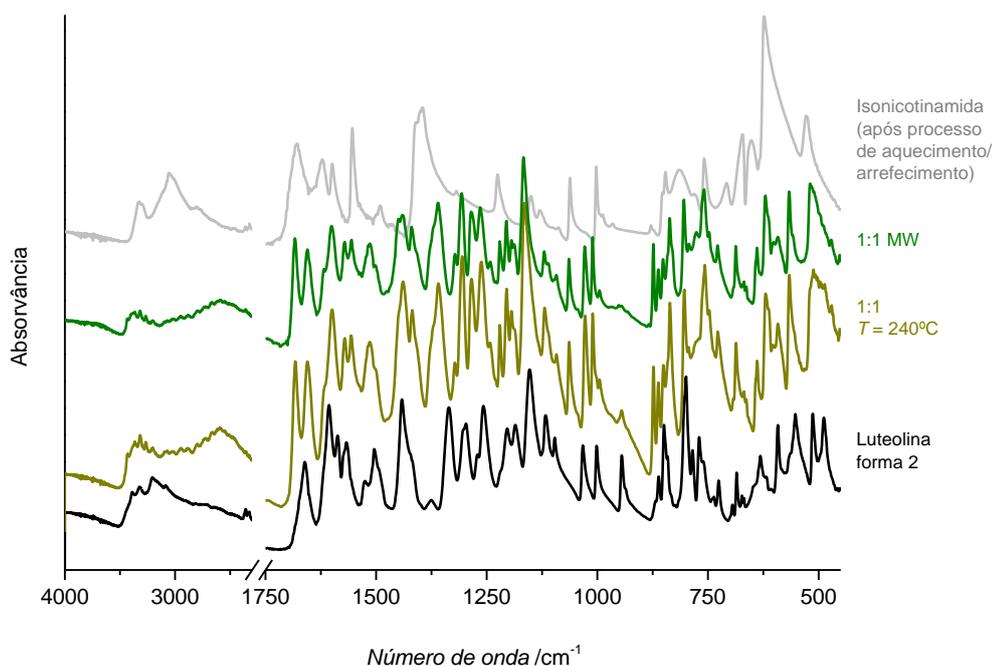


Figura 47 - Espectros de FTIR-ATR da forma 2 da LUT, da INA após processo de aquecimento/arrefecimento, da mistura obtida por moagem seguida de aquecimento em DSC, até 220°C, e de uma mistura (1:1) irradiada com micro-ondas a 220°C.

Como se referiu anteriormente, procedeu-se ainda ao estudo da formação do co-cristal com assistência por micro-ondas, sem qualquer solvente, nas condições descritas na parte experimental. A curva de DSC para o sólido obtido é apresentada na figura 46 e o respectivo espectro de infravermelho na figura 47.

Na curva de DSC desta amostra não é registado qualquer evento antes da fusão, que ocorre em temperatura idêntica às observadas para a mistura nas figuras 45 e 46, c. O espectro de infravermelho, figura 47, é também idêntico ao da mistura obtida por aquecimento em DSC.

Tudo indica que se pode concluir que há formação de co-cristal após aquecimento da mistura 1:1.

No espectro pode-se observar que existem bandas deslocadas relativamente aos compostos puros sujeitos ao mesmo processo de aquecimento (a isonicotinamida apresenta-se noutra forma sólida após o processo de aquecimento/arrefecimento) e outras que surgem novas. Pode-se observar alteração nas bandas iniciais que se encontram deslocadas, em relação às bandas da luteolina a 1586 e 1506cm^{-1} desaparecem e a banda a 1662 desloca-se para 1655cm^{-1} ; quanto às bandas da isonicotinamida centradas a 817 , 707 , 670 , 650 e 530cm^{-1} também se omitem; as bandas que surgem a 1359 e 1283cm^{-1} são novas em relação aos compostos de partida.

De modo a afirmar com clareza se o co-cristal formado nestas experiências, será a forma 2 [34], já descrito, procedeu-se à caracterização por difracção de raios-X de pó e posterior comparação com os difractogramas já conhecidos, figura 48.

Do difractograma obtido, confirmou-se que se estava perante uma estrutura cristalina que não seria a soma dos componentes puros. O difractograma tem fortes semelhanças com o descrito na literatura para o LutInam 2, mas algumas reflexões, na região $22,5 \leq 2\theta \leq 30$ encontram-se deslocadas. Este facto poderá resultar das experiências terem sido feitas a temperaturas diferentes, e, mesmo tratando-se da mesma forma cristalina, poderão ocorrer fenómenos de expansão na rede cristalina que não seriam idênticos em todas as direcções espaciais. Alternativamente serão duas estruturas cristalinas diferentes, apesar de muito próximas.

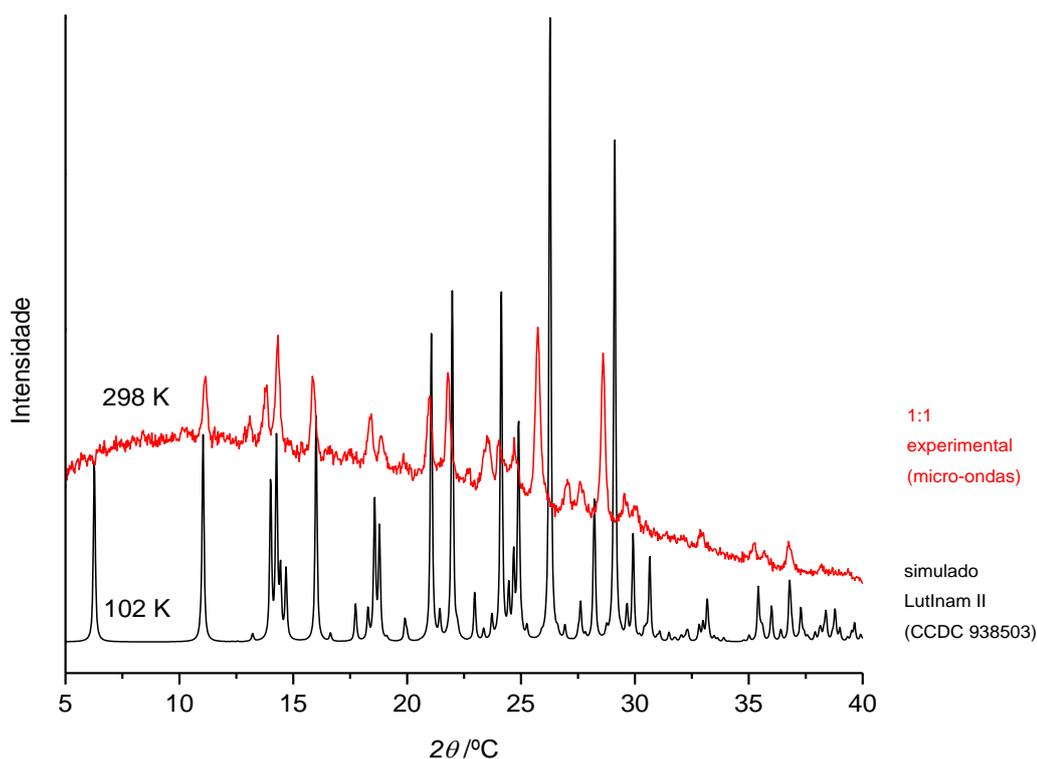


Figura 48 – Difractograma experimental do sólido luteolina:isonicotinamida gerado por irradiação de uma mistura equimolar com micro-ondas, e espectro simulado para a Lutnam 2 [34].

Co-formadores: xantinas

Para finalizar a investigação de co-cristais da luteolina, foram testadas duas xantinas, cafeína e teofilina, com grupos funcionais diferentes dos outros potenciais co-formadores propostos acima e ainda com diferentes campos de acção farmacológica.

- **Luteolina:Teofilina**

Na figura 49 são apresentadas as curvas de DSC ilustrativas do comportamento térmico de misturas de LUT:TEF de várias proporções molares, preparadas por mecanoquímica, bem como dos compostos puros. Na tabela 7 apresentam-se os respectivos parâmetros termodinâmicos.

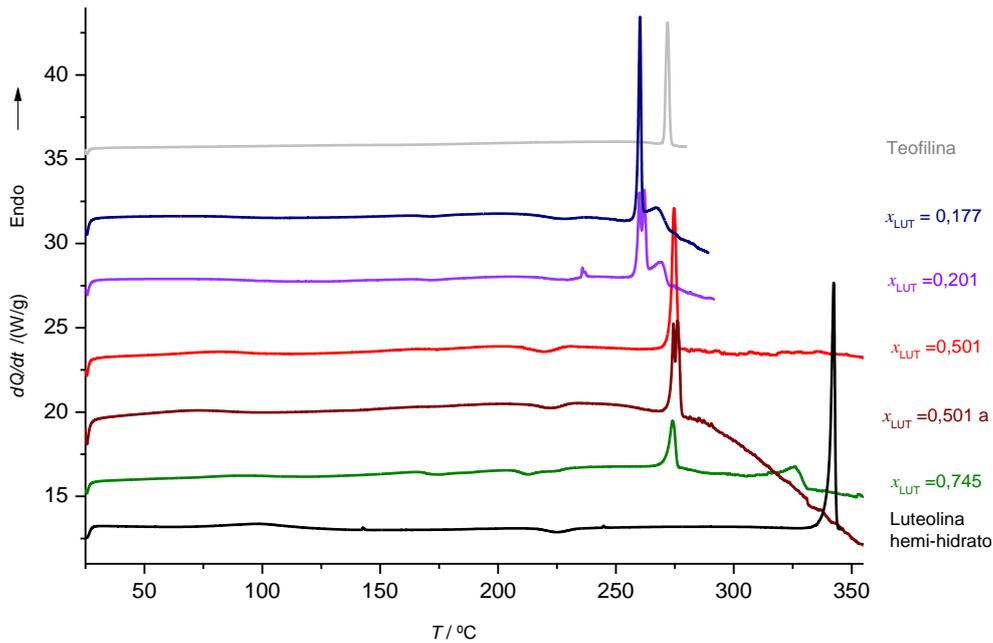


Figura 49 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da TEF e das várias misturas obtidas em moinho de bolas; $\beta = 10^\circ\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada. a: amostra analisada pela segunda vez, 20 dias depois.

Tabela 7 – Temperaturas de onset dos eventos endotérmicos registados nas curvas de DSC da figura 49, sistema LUT:TEF.

Composição	$T_{onset} / ^\circ\text{C}$ (1º pico)
Luteolina	338,5±0,5i)
Teofilina	269,2±0,1ii)
$x_{LUT} = 0,177$	257,6
$x_{LUT} = 0,201$	257,2; 259,4
$x_{LUT} = 0,501$	271,9±0,2iii)
$x_{LUT} = 0,501$ a	272,1; 273,1
$x_{LUT} = 0,603$	271,2
$x_{LUT} = 0,745$	269,9

i) Número de ensaios $n = 6$; ii) $n = 4$; iii) $n = 4$

O comportamento térmico do conjunto de misturas luteolina:teofilina analisados indica a formação de um co-cristal: na mistura LUT;TEF $x_{LUT} = 0,501$ observa-se na curva de DSC somente um pico endotérmico, a uma temperatura diferente da temperatura de fusão dos co-formadores, $T = (271,9 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, mais elevada que a de teofilina pura.

Da interpretação das curvas de DSC e dos parâmetros termodinâmicos, pode-se concluir que para as misturas com excesso de teofilina, relativamente à composição 1:1, o início de fusão ocorre a temperatura, $T \sim 258^\circ\text{C}$, inferior à dos compostos puros, o que

indica formação de um eutético, apresentando ainda um excesso após a fusão que aparenta ser o co-cristal.

Para as misturas com maior quantidade de LUT, o início da fusão tem lugar a $T \sim 270^\circ\text{C}$, entre as temperaturas de fusão dos compostos puros.

No caso da mistura $x_{LUT} = 0,501$ a), analisada 20 dias após a sua preparação por moagem no moinho de bolas, observa-se um pico dividido, o que poderá indicar a formação de um polimorfo do co-cristal. Também para a mistura $x_{LUT} = 0,201$, o pico de DSC, referente ao início de fusão, é também dividido, compartilhando a ideia de polimorfismo para o co-cristal.

Para todas as composições, existe ocorrência, ainda, de outros eventos por volta dos 200°C .

Na figura 50 apresentam-se os espectros de FTIR-ATR, dos compostos puros e das várias misturas para este sistema da luteolina e da teofilina.

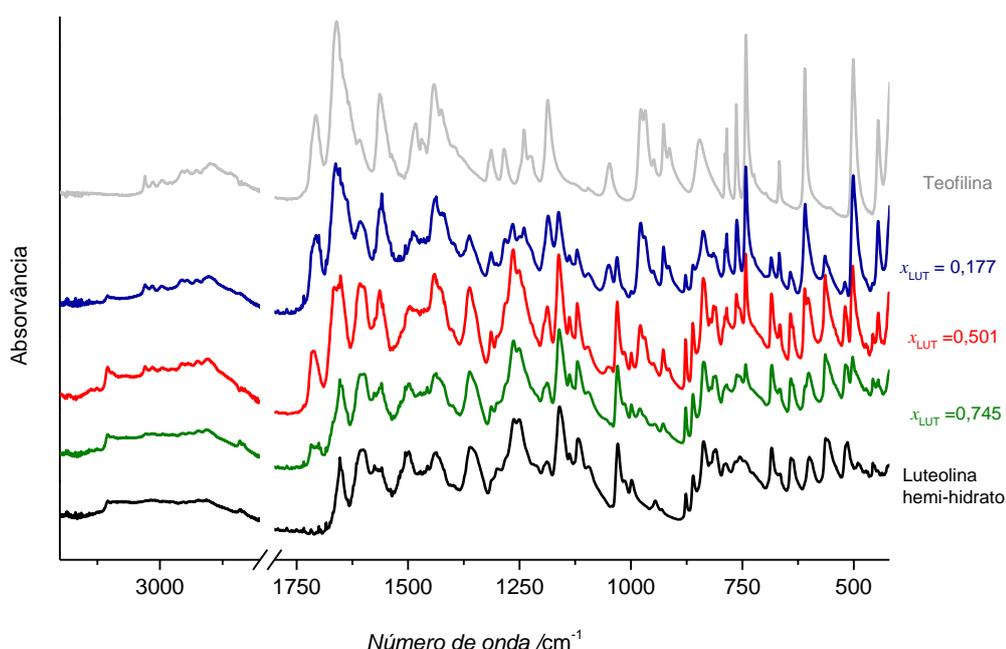


Figura 50 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e TEF, e das várias misturas obtidas no moinho de bolas.

Analisando a figura, pode-se verificar que os espectros das várias misturas são a soma das contribuições dos compostos puros, não havendo alterações das várias bandas características dos compostos de partida. O excesso de TEF ou LUT é evidenciado pela maior intensidade das bandas pertencentes a cada um dos compostos puros, nas misturas $x_{LUT} = 0,177$ e $x_{LUT} = 0,745$.

Para o caso da mistura $x_{LUT} = 0,501$ seria de esperar que se obtivesse um espectro com bandas diferentes das dos compostos puros, uma vez ser este referente à composição

do co-cristal. Como no caso da LUT:INA, a mecanoquímica sem assistência de solvente não é efectiva na formação de co-cristal.

Assim, de modo a clarificar a ideia da formação do co-cristal por aquecimento, procedeu-se ao aquecimento da mistura obtida por moagem no moinho de bolas até $T = 240^{\circ}\text{C}$, (temperatura sugerida pelo estudo por DSC). O método de MW foi utilizado como método complementar para demonstração da formação do co-cristal por aquecimento. Neste caso foram utilizados $20\mu\text{L}$ de etanol, atingindo-se a temperatura de 250°C .

Na figura 51 é apresentada a curva de DSC dos compostos de partida e do sólido obtido pelo método de MW. Na figura 52 são apresentados os espectros de FTIR-ATR, dessas amostras e da mistura aquecida em DSC até 240°C .

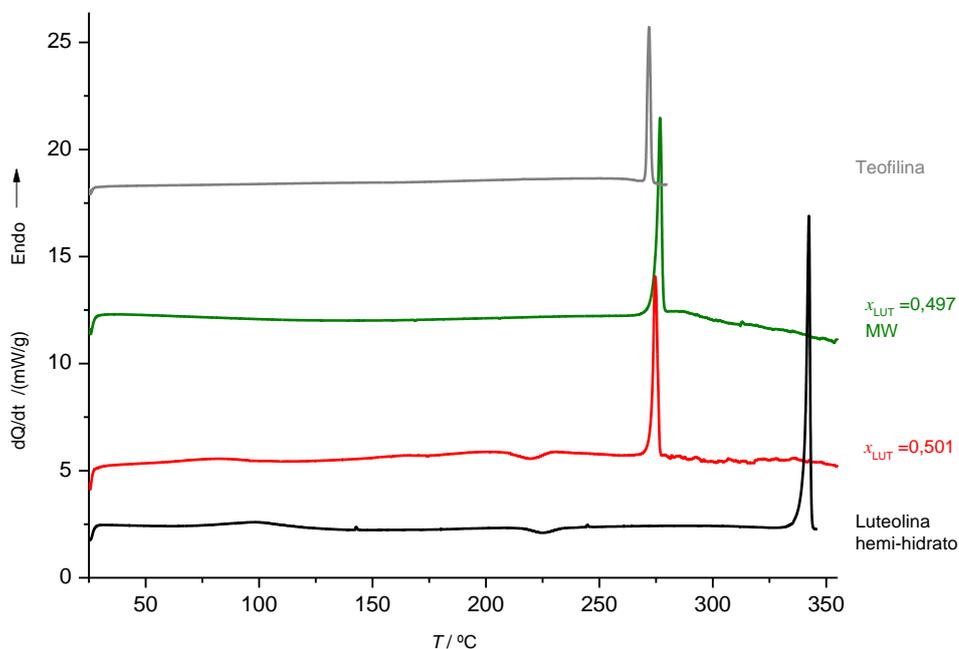


Figura 51 – Curvas de DSC de aquecimento de misturas equimolares LUT:TEF, obtida por mecanoquímica e submetida a irradiação com micro-ondas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

Da análise das curvas de DSC, pode-se verificar na curva de aquecimento do sólido obtido pelo método de MW não se regista qualquer fenómeno anterior à fusão, como se esperaria de um co-cristal já formado no início da análise térmica.

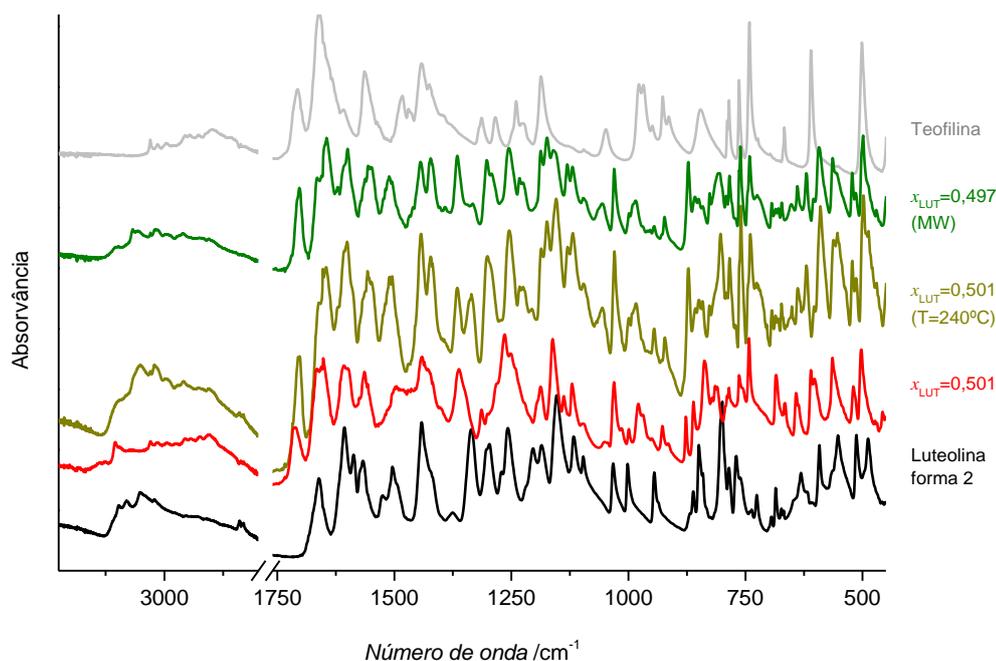


Figura 52 - Espectros de FTIR-ATR de LUT, TEF após aquecimento até 240°C e da mistura $x_{LUT} = 0,5$, após aquecimento até 240°C, ou irradiação com micro-ondas.

Quando analisados por infravermelho, os resultados foram de encontro ao esperado: alterações são visíveis a nível de algumas bandas: na região de elongação OH e NH; nas bandas a 1550, 1508, 1420, 1054, 986, e 591 cm^{-1} que se encontram deslocadas relativamente aos compostos de partida e surgem novas bandas a 1646, 1366, 1132, 873, 725 e 621 cm^{-1} , o que sugere que haja formação de uma nova rede cristalina. Estes dados corroboram os acontecimentos do DSC (figura 49) em que ocorrem transições (bandas exotérmicas) que indicam a formação do co-cristal apenas no aquecimento.

- **Luteolina:Cafeína**

A fim de investigar a formação de co-cristal com a outra xantina alvo neste estudo, a cafeína, seguiu-se uma metodologia semelhante à utilizada para o sistema LUT:TEF. Prepararam-se várias misturas de LUT e CAF de diferentes composições, por mecanoquímica. As curvas de DSC obtidas no processo de aquecimento dessas misturas e dos compostos puros estão ilustradas na figura 53 e na tabela 8 apresenta-se a temperatura de onset do pico de início de fusão.

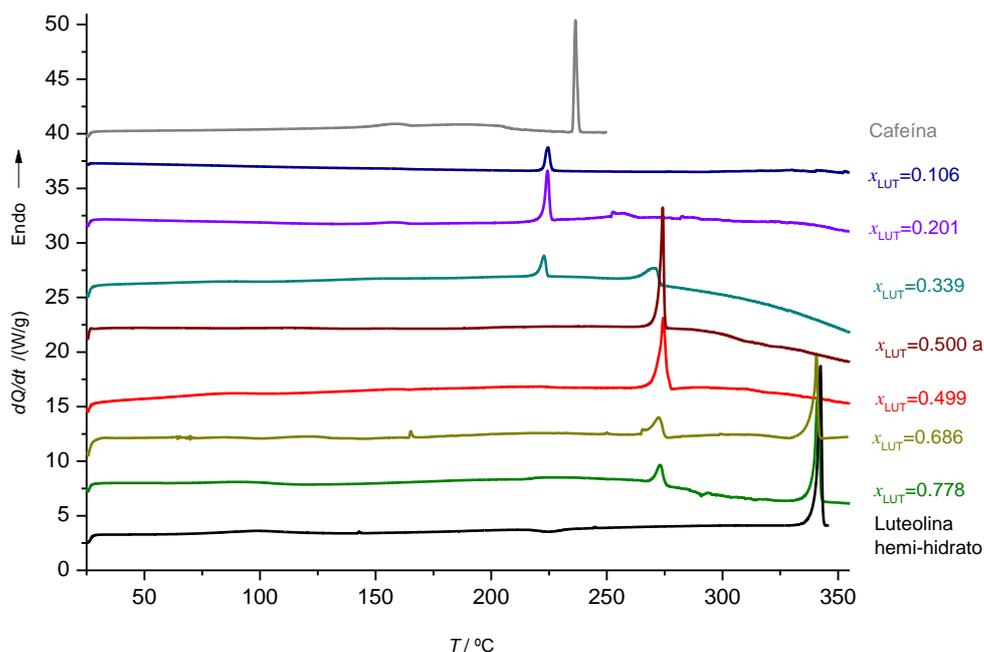


Figura 53 - Curvas de DSC do primeiro aquecimento da LUT, da CAF e das várias misturas obtidas em moinho de bolas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada; a: amostra varrida em cápsula fechada.

Tabela 8 – Temperatura de onset do primeiro pico endotérmico registado nas curvas de DSC na figura 53 da LUT, CAF e misturas dos dois compostos.

Composição	$T_{onset} / ^{\circ}\text{C}$ (1 ^o pico)
Luteolina	$338,5 \pm 0,5$ i)
Cafeína	$234,5 \pm 0,6$ ii)
$x_{LUT} = 0,106$	221,8
$x_{LUT} = 0,201$	221,5
$x_{LUT} = 0,339$	221,6
$x_{LUT} = 0,500$ a	$270,3 \pm 0,8$ iii)
$x_{LUT} = 0,499$	$269,9 \pm 0,8$ iv)
$x_{LUT} = 0,686$	266,8
$x_{LUT} = 0,778$	268,2

i) Número de ensaios, $n = 6$; ii) $n = 3$; iii) $n = 3$; iv) $n = 5$.

Das curvas apresentadas o que merece maior realce é a clara distinção do comportamento das misturas de composição superior e inferior a $x_{LUT} = 0,5$.

As curvas obtidas para a composição de $x_{LUT} = 0,5$, quer em cápsula aberta quer em cápsula fechada, apresentam um único pico endotérmico, relativo à fusão, a $T = 270,0^{\circ}\text{C}$, diferente das temperaturas de fusão dos compostos de partida e consideravelmente superior à temperatura de fusão da cafeína. Tudo indica a formação de um co-cristal 1:1 entre a luteolina e a cafeína.

No entanto, também aqui, a comparação dos espectros de FTIR-ATR, figura 54, dos compostos puros, LUT e CAF, e das diferentes misturas permite concluir que não há qualquer deslocamento nas bandas observadas: os espectros das misturas são simples soma das contribuições dos compostos puros, quer para $x_{LUT} = 0,5$ quer para as outras misturas.

Os difractogramas apresentados na figura 55 confirmam os resultados obtidos por FTIR-ATR: a mistura equimolar de LUT:CAF preparada por mecanoquímica é uma mistura física de luteolina e de cafeína de partida. Esta última é identificada com a forma β .

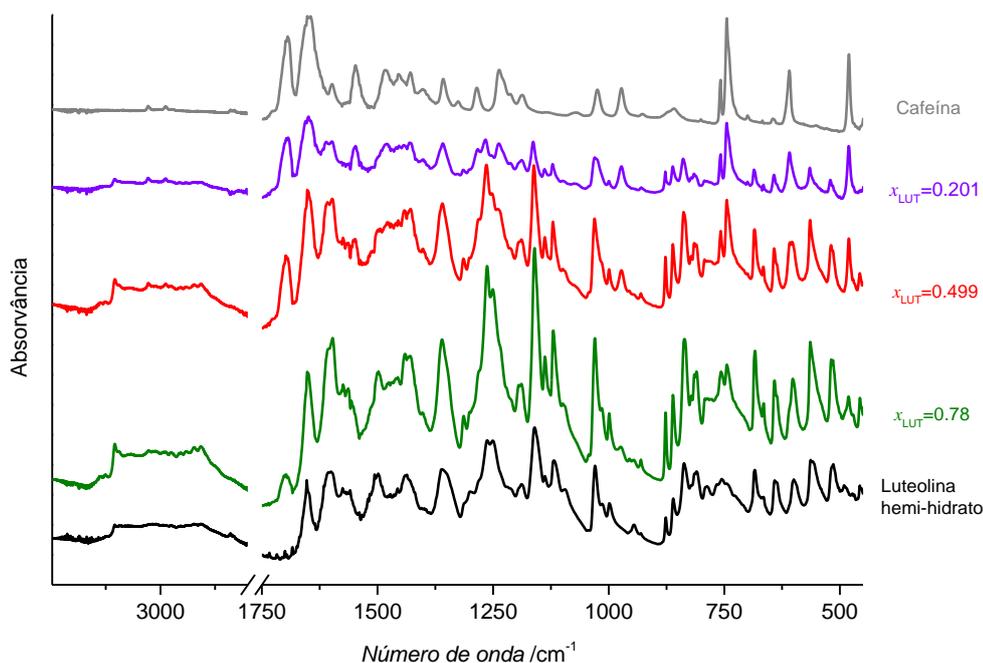


Figura 54 - Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros, LUT e CAF, e das várias misturas obtidas no moinho de bolas.

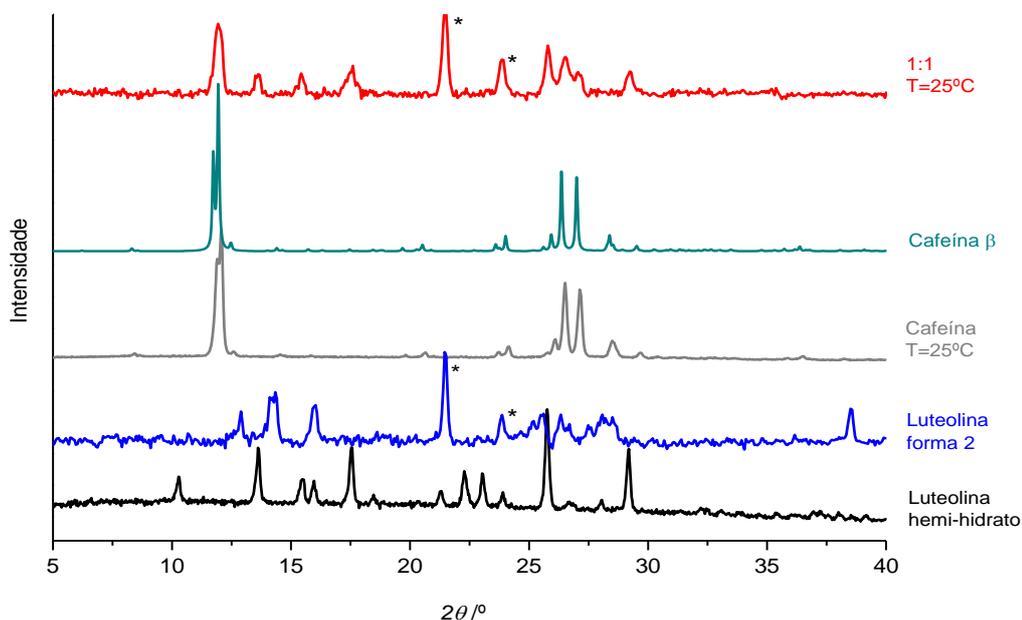


Figura 55 - Difractogramas da CAF, experimental e simulado, da LUT hemi-hidrato e forma 2; *contaminante.

Uma vez mais, foi necessário testar a formação do co-cristal por aquecimento. Procedeu-se, como nos outros sistemas estudados, à irradiação da mistura em micro-ondas. Para este sistema, pelo método de MW, foram utilizados 20 μ L de etanol e obteve-se uma temperatura máxima de 200°C.

Na figura 56 estão representados os resultados obtidos por DSC para os compostos de partida e para o sólido obtido pelo método de MW, e na figura 57, os respectivos espectros de infravermelho, a que se adicionou o de amostra submetida a aquecimento em DSC até 240°C.

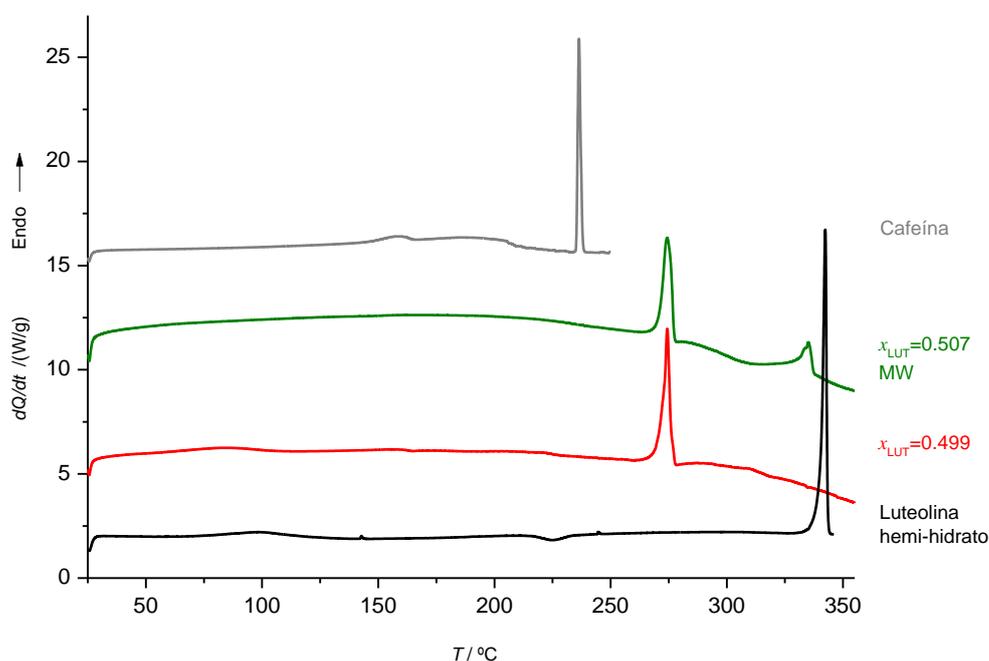


Figura 56 – Curvas de DSC de aquecimento de misturas equimolares LUT:CAF, obtida por mecanoquímica e submetida a irradiação com micro-ondas; $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, cápsula perfurada.

O sólido resultante da irradiação com MW funde à mesma temperatura do obtido por moagem no moinho de bolas ($T = 270^{\circ}\text{C}$, com $\Delta H = 131\text{J/g}$), indicando tratar-se da mesma estrutura sólida. No entanto não se regista nenhum processo/transição precedentemente à fusão, indicando que o co-cristal já se encontra formado no início da análise térmica. A curva de DSC apresenta um pico endotérmico adicional a $T_{m\acute{a}x} = 333^{\circ}\text{C}$, podendo ser algum excesso que não se tenha convertido no co-cristal ou degradação.

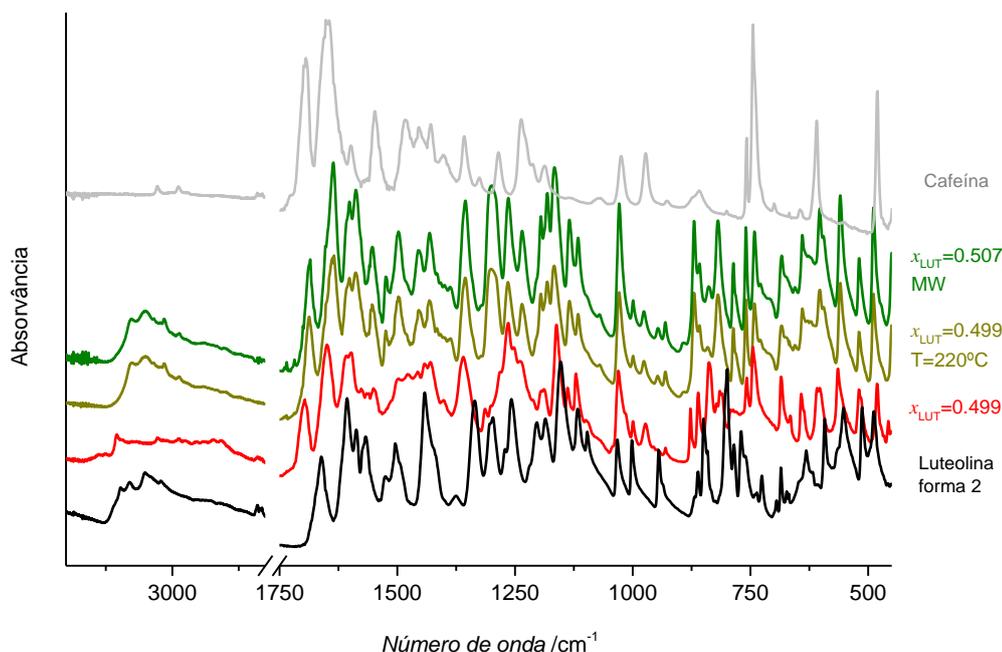


Figura 57 - Espectros de FTIR-ATR da LUT forma 2, da CAF e das várias misturas 1:1, submetidas a diferentes processos.

Obtiveram-se os mesmos espectros de FTIR-ATR para o sólido obtido por moagem e posterior aquecimento até 220°C e para o sólido obtido pelo método de MW, verificando-se, portanto, que as interações moleculares em ambos são idênticas, ou seja, há formação da mesma estrutura sólida pelos dois procedimentos.

Como seria expectável, o espectro do sólido obtido (que tudo indica ser um co-cristal 1:1 LUT:CAF) não é a simples soma dos compostos de partida, havendo deslocamento e aparecimento/desaparecimento de certas bandas: no que diz respeito às bandas atribuídas à luteolina, a banda a 3392 cm^{-1} não é observada e as bandas a 3322, 1153 e 513 cm^{-1} são deslocadas para 3310, 1165 e 520 cm^{-1} . No caso da cafeína há deslocamento das bandas centradas a 3116 e a 1693 para 3061 e 1685 cm^{-1} , respectivamente. Outras bandas de mais difícil atribuição aparecem de novo ou são deslocadas, nomeadamente a 1637, 1557, 1197, 1184, 1168, 821 cm^{-1} .

Tal como acontecia com os sistemas formados, por LUT:INA e LUT:TEF, também para o sistema luteolina:cafeína se tem indicações de formação de um co-cristal na proporção 1:1, após aquecimento da mistura.

4. Conclusão

Atendendo ao elevado valor farmacêutico da luteolina é de grande importância a investigação de formas sólidas com potencial para novas propostas de formulação de medicamentos/nutracêuticos.

Neste trabalho foi efectuada a pesquisa de polimorfos/solvatos por cristalização a partir de solventes com propriedades físico-químicas diferentes, sendo a sobressaturação conseguida por evaporação lenta de solvente. Obtiveram-se sólidos que foi possível agrupar em 4 grupos de acordo com a identidade dos respectivos espectros de infravermelho. Propõe-se que um deles seja um novo hidrato, obtido em THF e em 1,4-dioxano, e um outro um etanoato, obtido de misturas etanol:água. Estudos futuros por termogravimetria poderão confirmar estas conclusões preliminares. Apesar de várias tentativas não foi possível a obtenção de mono-cristais com qualidade para resolução das estruturas cristalinas por difracção de raios-X, o que será a confirmação inequívoca das novas estruturas. Futuramente esta deverá ser uma linha de acção a prosseguir.

Foi, ainda, identificada e caracterizada uma forma anidra da luteolina, forma 2, gerada por aquecimento quer do hemi-hidrato comercial, quer dos sólidos obtidos por cristalização em solventes.

No que diz respeito à pesquisa de co-cristais for possível sintetizar co-cristais luteolina:isonicotinamida (1:1), luteolina:teofilina (1:1) e luteolina:cafeína (1:1) por aquecimento das misturas em DSC ou por recurso a irradiação com microondas. Estes processos de síntese foram realizados na ausência de solvente ou com adição duma

quantidade residual. Não se observou a formação dos referidos co-cristais por mecanoquímica.

Os co-cristais obtidos mostram valor como nutacêutico e quando a luteolina é co-cristalizada com um API potencia-se o sistema com propriedades terapêuticas.

5. Referências Bibliográficas

1. SNIDER, D.A., ADDICKS, W., e OWENS, W., **Polymorphism in generic drug product development**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 2004. p. 391-395.
2. LEE, A.Y., ERDEMIR, D., e MYERSON, A.S., **Crystal Polymorphism in Chemical Process Development**. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 2011. p. 259-280.
3. AALTONEN, J., et al., **Solid form screening - A review**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 2009. p. 23-37.
4. MILLER, J.M., et al., **Identifying the stable polymorph early in the drug discovery-development process**. *Pharmaceutical Development and Technology*, 10, 2005. p. 291-297.
5. MILLER, S.P.F., RAW, A.S., e YU, L.X., **Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Regulatory Applications**. In: HILFIKER, R., *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 385-403.
6. LLINAS, A. e GOODMAN, J.M., **Polymorph control: past, present and future**. *Drug Discovery Today*, 13, 2008. p. 198-210.
7. HILFIKER, R., BLATTER, F., e RAUMER, M.V., **Relevance of Solid-state Properties for Pharmaceutical Products**. In: HILFIKER, R., *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 1-19.
8. MCCRONE, W.C., **Physics and Chemistry of the Organic Solid State**, 2, London: eds. D. Fox, M. M. Labes and A. Weissberger, Interscience Publishers. 1965.

9. BERNSTEIN, J., **Polymorphism and Patents from a Chemist's Point of View**. In: HILFIKER, R., *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim, Germany: Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 365-384.
10. CHEMBURKAR, S.R., et al., **Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development**. *Organic Process Research & Development*, 4, 2000. p. 413-417.
11. BAUER, J., et al., **Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism**. *Pharmaceutical Research*, 18, 2001. p. 859-866.
12. DOHNAL, J. e JAMPÍLEK, J., **Investigation of Carbohydrates and Their Derivatives as Crystallization Modifiers**, 2012.
13. LOHANI, S. e GRANT, D.J.W., **Thermodynamics of Polymorphs**. In: HILFIKER, R., *Polymorphism : in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim, Germany: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 21-42.
14. RUECROFT, G., et al., **Sonocrystallization: The use of ultrasound for improved industrial crystallization**. *Organic Process Research & Development*, 9, 2005. p. 923-932.
15. KITAMURA, M., **Strategy for control of crystallization of polymorphs**. *CrystEngComm*, 11, 2009. p. 949-964.
16. FDA, *Guidance for Industry ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism*, disponível em <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072866.pdf>, última consulta: 26 de Junho de 2014.
17. QIAO, N., et al., **Pharmaceutical cocrystals: An overview**. *International Journal of Pharmaceutics*, 419, 2011. p. 1-11.
18. SEKHON, B., **Drug-drug co-crystals**. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 2012. p. 45-46.
19. MEANWELL, N.A., **The Emergging Utility of Co-Crystals in Drug Discovery and Development**. In: MACOR, J.E., *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. USA: Academic Press 2008, 978-0-12-374344-2. p. 373-404.
20. THAKURIA, R., et al., **Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs**. *International Journal of Pharmaceutics*, 453, 2013. p. 101-125.
21. SHAN, N. e ZAWOROTKO, M.J., **The role of cocrystals in pharmaceutical science**. *Drug Discovery Today*, 13, 2008. p. 440-446.
22. SHAN, N., et al., **Impact of pharmaceutical cocrystals: the effects on drug pharmacokinetics**. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10, 2014. p. 1255-1271.
23. FDA, *Guidance for Industry - Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals*, disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm281764.pdf>, última consulta: 30 de Junho de 2014.
24. VARUGHESE, S., SINHA, S.B., e DESIRAJU, G.R., **Phenylboronic acids in crystal engineering: Utility of the energetically unfavorable syn,syn-conformation in co-crystal design**. *Science China-Chemistry*, 54, 2011. p. 1909-1919.

25. VENER, M.V., et al., **Evaluation of the Lattice Energy of the Two-Component Molecular Crystals Using Solid-State Density Functional Theory.** *Crystal Growth & Design*, 14, 2014. p. 4997-5003.
26. ELDER, D.P., HOLM, R., e DE DIEGO, H.L., **Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility.** *International Journal of Pharmaceutics*, 453, 2013. p. 88-100.
27. GRIESSER, U.J., **The Importance of Solvates.** In: HILFIKER, R., *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry.* Weinheim, Germany: Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 211-233.
28. VISHWESHVAR, P., et al., **Pharmaceutical co-crystals.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, 2006. p. 499-516.
29. MORISSETTE, S.L., et al., **High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 2004. p. 275-300.
30. SCHULTHEISS, N. e NEWMAN, A., **Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties.** *Crystal Growth & Design*, 9, 2009. p. 2950-2967.
31. LEMMERER, A., et al., **Polymorphic Co-crystals from Polymorphic Co-crystal Formers: Competition between Carboxylic Acid··Pyridine and Phenol··Pyridine Hydrogen Bonds.** *Crystal Growth & Design*, 13, 2013. p. 3935-3952.
32. LEYSSENS, T., et al., **Solution cocrystallization, an effective tool to explore the variety of cocrystal systems: caffeine/dicarboxylic acid cocrystals.** *CrystEngComm*, 16, 2014. p. 9603-9611.
33. MUKHERJEE, A. e DESIRAJU, G.R., **Synthon polymorphism and pseudopolymorphism in co-crystals. The 4,4[prime or minute]-bipyridine-4-hydroxybenzoic acid structural landscape.** *Chemical Communications*, 47, 2011. p. 4090-4092.
34. SOWA, M., SLEPOKURA, K., e MATCZAK-JON, E., **Cocrystals of fisetin, luteolin and genistein with pyridinecarboxamide cofomers: crystal structures, analysis of intermolecular interactions, spectral and thermal characterization.** *CrystEngComm*, 15, 2013. p. 7696-7708.
35. CHEN, J., et al., **Pharmaceutical Crystallization.** *Crystal Growth & Design*, 11, 2011. p. 887-895.
36. HUGHES, J.P., et al., **Principles of early drug discovery.** *British Journal of Pharmacology*, 162, 2011. p. 1239-1249.
37. NEWMAN, D.J. e CRAGG, G.M., **Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010.** *Journal of Natural Products*, 75, 2012. p. 311-335.
38. GARDNER, C.R., WALSH, C.T., e ALMARSSON, O., **Drugs as materials: Valuing physical form in drug discovery.** *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 2004. p. 926-934.
39. HARBORNE, J.B. e WILLIAMS, C.A., **Advances in flavonoid research since 1992.** *Phytochemistry*, 55, 2000. p. 481-504.

40. ROSS, J.A. e KASUM, C.M., **Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety.** Annual Review of Nutrition, 22, 2002. p. 19-34.
41. MIRANDA, C.L., MAIER, C.S., e STEVENS, J.F., **Flavonoids.** In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, 2001, 9780470015902. p. 1-13.
42. CORRADINI, E., et al., **Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants.** Natural Product Research, 25, 2011. p. 469-495.
43. PETERSON, J. e DWYER, J., **Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity.** Nutrition Research, 18, 1998. p. 1995-2018.
44. SERGIEL, I., POHL, P., e BIESAGA, M., **Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** Food Chemistry, 145, 2014. p. 404-408.
45. HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., e BOBILYA, D.J., **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** The Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 2002. p. 572-584.
46. AGATI, G., et al., **Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance.** Plant Science, 196, 2012. p. 67-76.
47. LIN, Y., et al., **Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy.** Current Cancer Drug Targets, 8, 2008. p. 634-646.
48. DIAS, M.M., MACHADO, N.F.L., e MARQUES, M.P.M., **Dietary chromones as antioxidant agents-the structural variable.** Food & Function, 2, 2011. p. 595-602.
49. LAGOURI, V., PRASIANAKI, D., e KRYSTA, F., **Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts.** International Journal of Food Properties, 17, 2013. p. 511-522.
50. HORINAKA, M., et al., **The combination of TRAIL and luteolin enhances apoptosis in human cervical cancer HeLa cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 333, 2005. p. 833-838.
51. YANG, M.-Y., et al., **Luteolin enhances paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells by blocking STAT3.** Chemico-Biological Interactions, 213, 2014. p. 60-68.
52. YAN, J., et al., **Luteolin enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand's anticancer activity in a lung cancer xenograft mouse model.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 417, 2012. p. 842-846.
53. BIRT, D.F., HENDRICH, S., e WANG, W., **Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids.** Pharmacology & Therapeutics, 90, 2001. p. 157-177.
54. WU, X., et al., **ERK/PPIa/PLB/SERCA2a and JNK Pathways Are Involved in Luteolin-Mediated Protection of Rat Hearts and Cardiomyocytes following Ischemia/Reperfusion.** PLoS ONE, 8, 2013. p. e82957.
55. QI, L., et al., **Luteolin improves contractile function and attenuates apoptosis following ischemia-reperfusion in adult rat cardiomyocytes.** European Journal of Pharmacology, 668, 2011. p. 201-207.

56. ANNAPURNA, H.V., et al., **Isolation and in silico evaluation of antidiabetic molecules of *Cynodon dactylon* (L.)**. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 39, 2013. p. 87-97.
57. NEKOHASHI, M., et al., **Luteolin and Quercetin Affect the Cholesterol Absorption Mediated by Epithelial Cholesterol Transporter Niemann-Pick CI-Like I in Caco-2 Cells and Rats**. Plos One, 9, 2014. p. e97901.
58. MIJANUR RAHMAN, M., GAN, S.H., e KHALIL, M.I., **Neurological Effects of Honey: Current and Future Prospects**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, 2014. p. 13 pages.
59. PATERNITI, I., et al., **A new co-ultramicrosized composite including palmitoylethanolamide and luteolin to prevent neuroinflammation in spinal cord injury**. Journal of Neuroinflammation, 10, 2013. p. 91.
60. LIU, R., et al., **Luteolin Isolated from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) Prevents Copper-Mediated Toxicity in β -Amyloid Precursor Protein Swedish Mutation Overexpressing SH-SY5Y Cells**. Molecules, 16, 2011. p. 2084-2096.
61. MEHLA, R., BIVALKAR-MEHLA, S., e CHAUHAN, A., **A Flavonoid, Luteolin, Cripples HIV-1 by Abrogation of Tat Function**. PLoS ONE, 6, 2011. p. e27915.
62. KIM, M.S., et al., **Inhibitory effects of luteolin on transendothelial migration of monocytes and formation of lipid-laden macrophages**. Nutrition, 28, 2012. p. 1044-1054.
63. FISCHER, F., et al., **UV-ABC screens of luteolin derivatives compared to edelweiss extract**. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 103, 2011. p. 8-15.
64. AMAT, A., et al., **Theoretical investigation of the structural and electronic properties of luteolin, apigenin and their deprotonated species**. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 868, 2008. p. 12-21.
65. CERRATO, A., SANTIS, D.D., e MORESI, M., **Production of luteolin extracts from *Reseda luteola* and assessment of their dyeing properties**. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 2002. p. 1189-1199.
66. MIEAN, K.H. e MOHAMED, S., **Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 2001. p. 3106-3112.
67. REN, D.-M., et al., **Simultaneous determination of nine major active compounds in *Dracocephalum rupestre* by HPLC**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 48, 2008. p. 1441-1445.
68. MOITEIRO, C., et al., **HPLC quantification of dye flavonoids in *Reseda luteola* L. from Portugal**. Journal of Separation Science, 31, 2008. p. 3683-3687.
69. REBOREDO-RODRÍGUEZ, P., et al., **Quality of extra virgin olive oils produced in an emerging olive growing area in north-western Spain**. Food Chemistry, 164, 2014. p. 418-426.

70. PENG, B., ZI, J., e YAN, W., **Measurement and correlation of solubilities of luteolin in organic solvents at different temperatures.** Journal of Chemical and Engineering Data, 51, 2006. p. 2038-2040.
71. PENG, B. e YAN, W.D., **Solubility of Luteolin in Ethanol plus Water Mixed Solvents at Different Temperatures.** Journal of Chemical and Engineering Data, 55, 2010. p. 583-585.
72. COX, P.J., et al., **Luteolin.** Acta Crystallographica Section E, 59, 2003. p. o975-o977.
73. JIANG, L., et al., **Preparation and Solid-State Characterization of Dapsone Drug-Drug Co-Crystals.** Crystal Growth & Design, 14, 2014. p. 4562-4573.
74. WOOD, P.A., et al., **Knowledge-based approaches to co-crystal design.** CrystEngComm, 16, 2014. p. 5839-5848.
75. BLAGDEN, N., COLES, S.J., e BERRY, D.J., **Pharmaceutical co-crystals - are we there yet?** CrystEngComm, 16, 2014. p. 5753-5761.
76. SONG, J.-S. e SOHN, Y.-T., **Crystal forms of naproxen.** Archives of Pharmacal Research, 34, 2011. p. 87-90
77. EVANS, A.M., **Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen.** Clinical Rheumatology, 20, 2001. p. 9-14.
78. TAKAGI, T., et al., **A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan.** Molecular Pharmaceutics, 3, 2006. p. 631-643.
79. ITOH, H., OKAJIMA, F., e UI, M., **CONVERSION OF ADRENERGIC MECHANISM FROM AN ALPHA-TYPE TO A BETA-TYPE DURING PRIMARY CULTURE OF RAT HEPATOCYTES - ACCOMPANYING DECREASES IN THE FUNCTION OF THE INHIBITORY GUANINE-NUCLEOTIDE REGULATORY COMPONENT OF ADENYLATE-CYCLASE IDENTIFIED AS THE SUBSTRATE OF ISLET-ACTIVATING PROTEIN.** Journal of Biological Chemistry, 259, 1984. p. 5464-5473.
80. GODIN, A.M., et al., **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of nicotinamide and its isomers in different experimental models.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, 99, 2011. p. 782-788.
81. CARIDI, A., et al., **Template-Induced Nucleation of Isonicotinamide Polymorphs.** Crystal Growth & Design, 14, 2014. p. 1135-1141.
82. ZIMIC, M., et al., **Pyrazinoic acid efflux rate in Mycobacterium tuberculosis is a better proxy of pyrazinamide resistance.** Tuberculosis, 92, 2012. p. 84-91.
83. CASTRO, R.A.E., et al., **A New Insight into Pyrazinamide Polymorphic Forms and their Thermodynamic Relationships.** Crystal Growth & Design, 10, 2010. p. 274-282.
84. EDDLESTON, M.D., et al., **Determination of the Crystal Structure of a New Polymorph of Theophylline.** Chemistry - A European Journal, 19, 2013. p. 7883-7888.
85. DICHI, E., LEGENDRE, B., e SGHAIER, M., **Physico-chemical characterisation of a new polymorph of caffeine.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 115, 2014. p. 1551-1561.

86. EMEL'YANENKO, V.N. e VEREVKIN, S.P., **Thermodynamic properties of caffeine: Reconciliation of available experimental data.** Journal of Chemical Thermodynamics, 40, 2008. p. 1661-1665.
87. WEYNA, D.R., et al., **Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution.** Crystal Growth & Design, 9, 2009. p. 1106-1123.
88. FRIŠČIĆ, T. e JONES, W., **Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding.** Crystal Growth & Design, 9, 2009. p. 1621-1637.
89. LIDSTRÖM, P., et al., **Microwave assisted organic synthesis—a review.** Tetrahedron, 57, 2001. p. 9225-9283.
90. OLIVER KAPPE, C., **Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry.** Chemical Society Reviews, 37, 2008. p. 1127-1139.
91. LARHED, M. e HALLBERG, A., **Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery.** Drug Discovery Today, 6, 2001. p. 406-416.
92. PAGIRE, S., et al., **Microwave assisted synthesis of caffeine/maleic acid cocrystals: the role of the dielectric and physicochemical properties of the solvent.** CrystEngComm, 15, 2013. p. 3705-3710.
93. S. VARMA, R., **Solvent-free organic syntheses . using supported reagents and microwave irradiation.** Green Chemistry, 1, 1999. p. 43-55.
94. LIN, H.-L., et al., **An Investigation of Indomethacin–Nicotinamide Cocrystal Formation Induced by Thermal Stress in the Solid or Liquid State.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 103, 2014. p. 2386-2395.
95. MOJUMDAR, S.C., et al., **Selected thermoanalytical methods and their applications from medicine to construction.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 90, 2007. p. 653-662.
96. YU, L., REUTZEL, S.M., e STEPHENSON, G.A., **Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy.** Pharmaceutical Science & Technology Today, 1, 1998. p. 118-127.
97. NICHOLS, G., **Light Microscopy.** In: HILFIKER, R., Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry. Weinheim, Germany: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 167-209.
98. RODRIGUEZ-SPONG, B., et al., **General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective.** Advanced Drug Delivery Reviews, 56, 2004. p. 241-274.
99. GIRON, D., **Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates.** Thermochimica Acta, 248, 1995. p. 1-59.
100. BRITTAİN, H., et al., **Physical Characterization of Pharmaceutical Solids.** Pharmaceutical Research, 8, 1991. p. 963-973.
101. CHALMERS, J.M. e DENT, G., **Vibrational Spectroscopic Methods in Pharmaceutical Solid-state Characterization.** In: HILFIKER, R., Polymorphism:

- in the Pharmaceutical Industry. Weinheim, Germany: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 95-138.
102. CHIENG, N., RADES, T., e AALTONEN, J., **An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55, 2011. p. 618-644.
103. OCHENBEIN, P. e SCHENK, K.J., **Crystallography for Polymorphs.** In: HILFIKER, R., Polymorphism : in the Pharmaceutical Industry. Weinheim, Germany: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 3-527-31146-7. p. 139-166.
104. SHAH, B., KAKUMANU, V.K., e BANSAL, A.K., **Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 95, 2006. p. 1641-1665.
105. LIU, B.G., et al., **Physicochemical characterisation of the supramolecular structure of luteolin/cyclodextrin inclusion complex.** Food Chemistry, 141, 2013. p. 900-906.
106. MACHADO, N.F.L., et al., **A conformational study of hydroxyflavones by vibrational spectroscopy coupled to DFT calculations.** Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 109, 2013. p. 116-124.
107. USP–NF, <467> Residual Solvents/Organic Volatile Impurities, disponível em http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Current.pdf, última consulta: 28 de Julho de 2014.
108. MARCUS, Y., **The Properties of Solvents**, England: John Wiley & Sons Ltd. 1998. 978-0-471-98369-9.