



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAURA MARIA TEODORIO VIDAL

**POLIMORFISMO DE ALCAMIDAS NATURAIS DA *Aniba riparia* (NEES) MEZ
(LAURACEAE)**

FORTALEZA

2019

LAURA MARIA TEODORIO VIDAL

POLIMORFISMO DE ALCAMIDAS NATURAIS DA *Aniba riparia* (NEES) MEZ
(LAURACEAE)

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V691p Vidal, Laura Maria Teodoro.
POLIMORFISMO DE ALCAMIDAS NATURAIS DA Aniba riparia (NEES) MEZ (LAURACEAE) /
Laura Maria Teodoro Vidal. – 2019.
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala.
1. Riparinas. 2. Difração de raios-X. 3. Elucidação de estrutura cristalina. 4. Polimorfismo. 5. Estudo de
solubilidade. I. Título.

CDD 615

LAURA MARIA TEODORIO VIDAL

POLIMORFISMO DE ALCAMIDAS NATURAIS DA *Aniba riparia* (NEES) MEZ
(LAURACEAE)

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala

Aprovada em: 08/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Universidade Regional do Cariri (URCA)

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Feral do Ceará por todo suporte fornecido.

Ao professor Alejandro Pedro Ayala por toda orientação e paciência nos últimos anos como sua orientanda. Meu sincero agradecimento pelos ensinamentos, por todo apoio e puxões de orelhas que me deu, eles foram merecidos e essenciais para meu crescimento. O senhor é um exemplo como professor e ser humano.

Ao professor Said Fonseca e professor Alexandre Magno, por terem aceitado participar da banca examinadora e contribuído de forma significativa e construtiva para este trabalho.

Aos meus pais e minha irmã por todo apoio e compreensão durante essa trajetória. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos meus sogros, que são como pais, por sempre me apoiarem e darem reforços positivos.

Ao meu noivo, Rodrigo Diogenes, por compreender e me ajudar em todos os momentos, especialmente nos momentos de aflição e estresse. Obrigada pelo companheirismo.

Ao meu melhor amigo, Joames, por sempre me conceder tempo para os meus desabafos e me lembrar o quão bonita a vida é.

Às duas irmãs que a vida me deu, Juliana e Thais, por estarem junto comigo em cada trajeto dessa jornada.

À Auriana Vasconcelos, por acreditar, muitas vezes, nesse sonho mais do que eu. Obrigada por todo apoio e pela parceria desde o início da minha graduação.

À professora Cléa Florenço, quem sempre incentivou e acreditou em mim. Obrigada por todos os ensinamentos.

À Renata Santos pela amizade que desenvolvemos ao longo do mestrado. Nossa amizade foi essencial para chegar onde cheguei. Obrigada também por todas as palavras de carinho e incentivo.

À Beatriz Bezerra, cuja amizade se tornou mais sólida nesse último ano. Obrigada por todas as conversas, risadas, companhia e pelos “ralas” no tatame. Você é um exemplo de farmacêutica e pesquisadora.

Ao Fabio Medeiros pela amizade, brincadeiras, discussões construtivas e por toda ajuda durante essa fase final de mestrado. Nossa parceria é muito especial para mim.

À Keilla Façanha por essa amizade que criamos ao longo dos últimos anos. Saiba que sempre estarei aqui para agradecer e retribuir todo apoio e ajuda que você me deu. Conte sempre comigo.

À Anaclécia Moreira por sempre está comigo, acreditando na realização desse sonho. Obrigada!

Ao Bruno e Wellington por toda ajuda e ensinamentos durante todo este período. Agradeço também pela nossa amizade. Sempre bom estar com vocês.

À Yara Santiago, Silmara Alves e Jessica Fonseca por compartilhar do tempo de vocês, disposição e conhecimento. Obrigada por toda ajuda! Vocês foram essenciais na realização desse trabalho! Aos colegas de laboratório, Wendell, Ana Georgina e Mayra pelos momentos de risadas e descontração na hora do café.

À melhor turma de mestrado que alguém poderia ter. Obrigada a todos vocês por termos caminhados juntos ao longo de 2018. Sem vocês o mestrado não teria o mesmo brilho. Agradeço em especial pela amizade e companheirismo com a Rafaela, Renata, Mendes, Pacelli, Valeska, Ana Sheilla, Renan, Mylena, Lívia, Karen e Marcos. Vocês são maravilhosos!

“A persistência é o melhor caminho para
o êxito”

— Charles Chaplin

RESUMO

As riparinas são alcaloides naturais, que foram isoladas a partir da *Aniba riparia* e posteriormente sintetizadas. A substituição dos hidrogênios por grupos hidroxila no primeiro anel aromático distingue as riparinas II e III. As riparinas I, II e III apresentaram diversos efeitos terapêuticos potenciais em estudos pré-clínicos em modelos comportamentais animais, incluindo efeitos antidepressivos, ansiolíticos e anti-inflamatórios. Dada a influência da estrutura cristalina sobre as propriedades físico-químicas, torna-se evidente a importância da caracterização destas propriedades e da elucidação cristalina de uma molécula candidata a fármaco. Portanto, este trabalho teve como objetivo principal elucidar as estruturas cristalinas das riparinas, além de realizar estudos espectroscópicos, térmicos, físico-químicos com intuito de identificar possíveis polimorfos. Este estudo também teve o objetivo de avaliar o perfil de solubilidade das riparinas. Para alcançar estes resultados, várias técnicas foram utilizadas, tais como: espectroscopia Raman e infravermelho, termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria ultravioleta-visível (UV/VIS), difração de raios-X de pó (DRXP) e difração de raios-X em monocristal (DRXM). As estruturas cristalinas das riparinas foram determinadas. Apesar da riparina I possuir sua estrutura cristalina reportada na literatura, este trabalho conseguiu identificar e elucidar um polimorfo desta molécula, o qual cristalizou em um sistema cristalino monoclinico, com uma molécula por unidade assimétrica e quatro por cela unitária. A riparina II também exibiu um sistema monoclinico, com duas moléculas por unidade assimétrica e oito por célula unitária, enquanto a riparina III, embora também apresentasse um sistema monoclinico cristalino, exibiu uma molécula por unidade assimétrica e duas por célula unitária. As características estruturais e conformacionais das três riparinas levaram a diferenças físico-químicas, térmicas e espectroscópicas entre elas. Também foi possível avaliar e discutir o polimorfismo das riparinas I e III.

Palavras-chave: Riparinas. Difração de raios-X. Elucidação de estrutura cristalina. Polimorfismo. Espectroscopia vibracional. Análise térmica. Estudo de solubilidade.

ABSTRACT

Riparins are natural alkaloids, which have been isolated from *Aniba riparia* and subsequently synthesized. The substitution of hydrogens by hydroxyl groups in the first aromatic ring distinguishes riparins II and III. Riparin I, II and III showed several potential therapeutic activity in preclinical studies, such as antidepressant, anxiolytic and anti-inflammatory effects. Given the direct influence of the crystalline structure on the physico-chemical properties, the importance of the characterization of these properties and the crystalline elucidation of a drug candidate molecule becomes evident. Therefore, this contribution has as main objective to elucidate the crystalline structures of riparins, besides conducting a thermal and physicochemical studies in order to identify possible polymorphs. This study also has the objective to evaluate the solubility of the compounds. To achieve the results, several techniques were used, such as: Raman and infrared spectroscopy, thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), ultraviolet–visible spectrophotometry (UV/VIS), X-ray powder diffraction (XRPD) and single-crystal X-ray diffraction (SCXRD). The crystalline structures of riparins were determined. Despite riparin I has its structure elucidated and reported in the literature, it was possible to determine the crystalline structure of a polymorph, which presented a monoclinic crystalline system, one molecule per asymmetric unit and four molecules per unit cell. Riparin II also exhibited a monoclinic system, with two molecules per asymmetric unit and eight per unit cell, while riparin III, though also presented a monoclinic crystalline system, exhibited one molecule per asymmetric unit and two per unit cell. The structural and conformational characteristics of the three riparins lead to physical-chemical, thermal and spectroscopic differences. It was also possible to evaluate and discuss the polymorphism of riparin I and III.

Keywords: Riparins. X-Ray Diffraction. Crystalline structure elucidation. Polymorphism. Vibrational spectroscopy. Thermal analysis. Solubility profile.

ÍNDICE DE FIGURAS – PARTE I

Figura 1 - Estrutura química das riparinas.	16
Figura 2 - Possíveis arranjos em sólidos farmacêuticos.	18
Figura 3 - Curva de calibração das riparinas I α , II e III.	26

ÍNDICE DE FIGURAS – PARTE II

Figure 1 - Chemical structure of riparins.....	29
Figure 2 - ORTEP plots of the asymmetric units of riparins (a) I β , (b) II and (c) III. ..	33
Figure 3 - Comparison of the molecular conformation of the riparin molecules: I α (blue), I β (lilac), II conformer A (red), II conformer B (orange) and III (green).	34
Figure 4 - Molecular chains observed in the crystalline structures of riparins (a) I β , (b) II and (c) III.....	36
Figure 5 - Unit cells of riparins (a) I α , (b) I β , (c) II and (d) III showing the CH $\cdots\pi$ interactions. Hydrogens were removed for clarity.	37
Figure 6 - Hirshfeld surfaces and 2D-fingerprints of riparins I, II and III.	39
Figure 7 - DSC/TG curves of riparins I α , II and III.	40
Figure 8 - DSC curves of heating/cooling cycles of as received riparin I	41
Figure 9 - Hotstage analysis at 31.7 °C (a), 117.7 °C (b), 124.4 °C, 128.6 °C (d), 87.9 °C (e) and 74.2 °C (f).....	42
Figure 10 - X-ray powder diffraction patterns of a heating/cooling cycle (bottom to top) of the as received riparin I. The calculated patterns from polymorphs I α and I β were included for comparison.	43
Figure 11 - Powder X-ray diffraction measurements of riparin III compared with the calculated pattern from III γ	44
Figure 12 - Solubility profiles of riparins I α , II and III α	45
Figure 13 - Espectro infravermelho (a) e Raman (b) da riparina II.....	49
Figure 14 - Espectra Raman da riparina III α (a) e III γ (b).	51
Figure 15 - Espectros Raman da riparina I α (a) e I β (b).	52
Figure 16 – Espectros infravermelho das riparinas I α (a), II (c) e III (e) antes do ensaio de solubilidade e espectros infravermelhos das riparinas I α (b), II (d) e III (f) após o ensaio.	53

ÍNDICE DE TABELAS

Table 1 - Crystallographic data of the riparins.	32
Table 2 – Selected dihedral and interplanar angles (°) of riparin molecules in the corresponding asymmetric units.	34
Table 3 – Hydrogen bonds of riparins showing the distances and angles between the donors (D), hydrogens (H), and acceptors (A).	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRXM	Difração de raios-X em monocristal
DRXP	Difração de raios-X de pó
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HS	Superfície de Hirshfeld (<i>Hirshfeld surface</i>)
IFA	Insumo farmacêutico ativo
I α	Riparina I α
I β	Riparina I β
I γ	Riparina I γ
I δ	Riparina I δ
IIA	Riparina IIA
IIB	Riparina IIB
III α	Riparina III α
III β	Riparina III β
III γ	Riparina III γ
SCXRD	Single-crystal X-ray diffraction
TG	Termogravimetria (<i>Thermogravimetry</i>)
UV/VIS	Espectrofotômetro ultravioleta-visível (<i>Ultra-visible spectrophotometer</i>)
XRPD	Single-crystal X-ray diffraction

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Aniba riparia</i> e riparinas.....	15
1.2 Estudos de pré-formulação	17
1.3 Cristalografia e formas cristalinas de fármacos.....	17
1.3.1. Polimorfismo	18
1.4 Determinação da estrutura cristalina	19
1.5 Espectroscopia no infravermelho e Raman	20
1.6 Propriedades biofarmacêuticas	21
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral:	22
2.1 Objetivos Específicos:	22
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1 Preparação das amostras	23
3.2 Varredura de polimorfos.....	23
3.3 Difração de raios-X de monocristal.....	23
3.4 Difração de raios-X de pó.....	24
3.5 Análise térmica	24
3.6 Microscopia óptica	25
3.7 Espectroscopia vibracional	25
3.8 Determinação da solubilidade	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Artigo submetido: Polymorphism in natural alkamides from <i>Aniba riparia</i> (Ness) Mez	27
4.2 Análise por espectroscopia vibracional	49
5 CONCLUSÕES GERAIS	54
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

As matérias-primas vegetais têm uma grande importância no desenvolvimento e formulação de fármacos, podendo ser utilizadas substâncias isoladas ou, até mesmo, sintetizadas a partir do derivado vegetal de uma planta (SIMÕES *et al.*, 2017).

Além de precisarem apresentar efeitos terapêuticos desejáveis e baixa toxicidade, as substâncias isoladas ou sintetizadas de plantas, devem apresentar características físico-químicas apropriadas, garantindo assim a eficácia e qualidade do produto. Para isto, as propriedades físico-químicas destas moléculas devem ser estudadas durante a fase da pré-formulação.

A pré-formulação, por sua vez, tem início após verificar que fármacos recém-sintetizados ou recém-descobertos apresentam atividade biológica em modelos pré-clínicos. A fase da pré-formulação visa o estudo das propriedades físico-químicas destas moléculas, visto a necessidade de boas características para um bom desempenho de uma futura forma farmacêutica. Portanto estes ensaios consideram as propriedades físico-químicas que são passíveis de afetar desempenho, eficácia ou segurança (AULTON, 2016).

Uma das propriedades físico-químicas mais importantes para o desenvolvimento de novos fármacos é a solubilidade, pois antes que um ativo chegue em seu local de ação, ele necessita estar molecularmente disperso. O estudo da solubilidade é crítico para formulações de drogas orais. Estas propriedades, ainda, podem ser divididas em intrínsecas e derivadas, a última sendo afetada pelo comportamento em massa da substância, ou seja, se os compostos se encontram na forma de pó ou de cristais (AULTON, 2016).

Considerando a forma cristalina das substâncias, a Cristalografia se torna chave principal para o estudo e caracterização das substâncias candidatas a fármacos, já que estuda a forma pela qual os átomos estão ordenados em um cristal. Além disso, este trabalho preocupou-se em avaliar outras possíveis formas cristalinas, que pudessem afetar o desempenho das moléculas estudadas, como a presença do fenômeno do polimorfismo. Tornou-se, então, relevante a varredura de possíveis polimorfos, para assegurar que os estudos futuros sejam realizados com a forma sólida cristalina mais estável.

Este trabalho focou no estudo de três alcaloides sintetizadas a partir do fruto verde da *Aniba riparia*, que apresentaram potenciais efeitos terapêuticos em estudo pré-clínicos em modelos animais, visando otimizar o estudo de um novo insumo farmacêutico ativo, fornecendo informações sobre o perfil de solubilidade, além de fornecer informações sobre as estruturas

cristalinas e a presença de polimorfismo nestas substâncias. Dessa forma, auxiliando a compreensão do comportamento destas moléculas e favorecendo os estudos pré-clínicos e posteriores estudos clínicos.

1.1 *Aniba riparia* e riparinas

As plantas medicinais são continuamente importantes para sociedade e até o século XIX estes produtos constituíam os principais recursos terapêuticos. A partir do século XX, com o avanço da tecnologia e o crescente estudo científico das plantas medicinais, a utilização das substâncias ativas isoladas teve uma ascensão (SIMÕES *et al.*, 2017).

O aumento na utilização das substâncias ativas isoladas ocorreu devido as vantagens referentes a esse tipo de produto, como maior reprodutibilidade, segurança e qualidade das substâncias em relação a uma mistura complexa de substâncias presentes na droga ou no derivado vegetal (SIMÕES *et al.*, 2017).

Através do aumento da utilização destas substâncias, diversos fármacos importantes como codeína, utilizada como analgésico, e vimblastina, indicada no tratamento de neoplasias, foram formulados, demonstrando, assim, a importância das matérias-primas vegetais como insumos farmacêuticos ativos (IFAs), ainda que sintéticas (SIMÕES *et al.*, 2017).

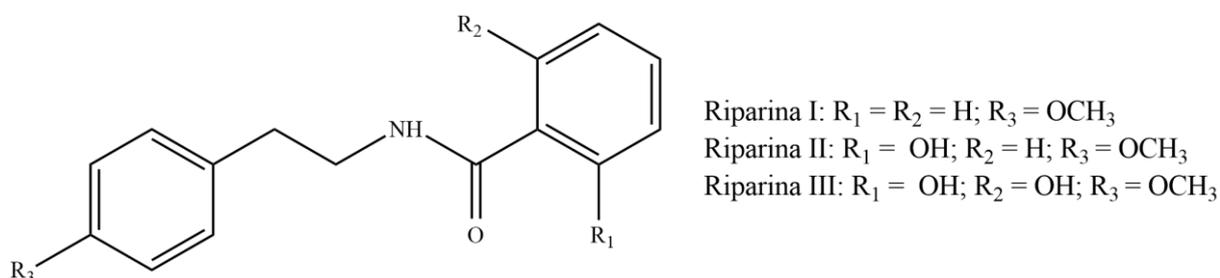
Este estudo teve como proposta o estudo de três alcaloides sintetizadas a partir da *Aniba riparia*, uma planta comumente encontrada na região da Amazônia. Desta planta, foi possível isolar diversos compostos a partir do seu fruto verde, como benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina), alcaloides e, em particular, as alcaloides utilizadas neste estudo (BARBOSA-FILHO, 1987).

O gênero *Aniba* faz parte da família Lauraceae, popularmente conhecida como “louro” na Amazônia, abrangendo cerca de 40 espécies de plantas, sendo possível encontrar esse gênero na Amazônia e na Guiana. Análises químicas também foram realizadas nas cascas do caule, de onde foi possível identificar e isolar diversos compostos químicos, como flavonoides, benzilbenzoatos e benzaldeídos (BARBOSA-FILHO, 1987).

As alcaloides utilizadas neste trabalho são produtos de metabolização, sendo então, metabólitos secundários, considerados compostos bioativos que apresentaram previamente resposta sobre células do sistema nervoso central (BARBOSA-FILHO, 1990). Os metabólitos secundários são substâncias químicas presentes, principalmente, em plantas silvestres com a função primordial de proteção. Estes metabólitos podem ser classificados em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (CROTEAU *et al.*, 2000).

Essas alcâmidas constituem um grupo especial de alcaloides, por possuírem uma função amida restrita a poucos representantes da natureza, sendo formadas a partir da condensação de um ácido graxo saturado e uma amina (HOFER *et al.*, 1986). Para este estudo foram utilizadas as seguintes alcâmidas, que foram isoladas e posteriormente sintetizadas a partir da *Aniba riparia*: A N-benzoiltiramina (riparina I), N-(2-hidroxibenzoil) tiramina (riparina II) e N-(2,6-dihidroxibenzoil) tiramina (riparina III) (BARBOSA-FILHO, 1987). A diferença entre as três riparinas se dá pela substituição de hidrogênios no anel aromático por uma ou duas hidroxilas nas riparinas II e III, respectivamente (**Figura 1**).

Figura 1 - Estrutura química das riparinas.



Essas substâncias apresentaram potenciais efeitos terapêuticos em testes pré-clínicos em modelos animais em neurociência e baixa toxicidade *in vitro* (SILVEIRA, 2007). Entre estes estudos, as riparinas apresentaram potencial efeito ansiolítico e antidepressivo (LOPES *et al.*, 2018) (VASCONCELOS *et al.*, 2015) (TEXEIRA *et al.*, 2013) (MELO *et al.*, 2013). Além disso, as riparinas I e III demonstraram efeito relaxante sobre a musculatura lisa (MARQUES *et al.*, 2005), enquanto a riparina II apresentou potencial efeito anti-inflamatório (DE CARVALHO *et al.*, 2013).

A estrutura cristalina de uma substância pode estar diretamente relacionada com suas propriedades físico-químicas, que por sua vez, podem influenciar na atividade terapêutica deste composto (THAKRAL *et al.*, 2018). Portanto, estes resultados evidenciam a relevância do estudo das propriedades físico-químicas, como solubilidade, dissolução e estabilidade, bem como a determinação das estruturas cristalinas das riparinas.

Embora a riparina I possua sua estrutura cristalina reportada na literatura, não existem dados acerca da elucidação estrutural das riparinas II e III (MARQUES *et al.*, 2005). A riparina I e III também possuem estudo de espectroscopia vibracional na literatura, não havendo dados acerca da riparina II. Além disso, diferentes lotes da riparina I foram avaliados através de estudo térmico e microscopia eletrônica (MOURA *et al.*, 2017). Apesar destes estudos, ainda há a necessidade da caracterização das riparinas II e III, além da varredura de

polimorfismo destas substâncias e avaliação de propriedades biofarmacêuticas, como perfil de solubilidade.

1.2 Estudos de pré-formulação

A pré-formulação é definida como a etapa de desenvolvimento de um novo fármaco, que tem por finalidade a caracterização físico-química de drogas candidatas. Esta etapa visa selecionar os candidatos à fármacos e a otimização da fase da formulação, através da escolha sobre o desenho da forma farmacêutica mais adequado (AULTON, 2016).

A fase da pré-formulação visa identificar propriedades físico-químicas relevantes para o desenho de futuras formas farmacêuticas e otimização do processo de fabricação (LOPALCO *et al.*, 2019). Portanto, para o desenvolvimento destas formas farmacêuticas, cujo fármaco seja biodisponível, é necessário conhecer e caracterizar as propriedades físicas e químicas destas moléculas, que afetam diretamente o processo farmacêutico, sua estabilidade e compatibilidade com excipientes. Além de afetar também o processo de solubilização e dissolução, influenciando assim, a sua biodisponibilidade.

As propriedades físico-químicas de uma substância podem ser divididas em propriedades intrínsecas e propriedades derivadas, onde as primeiras são inerentes a molécula da substância, podendo ser alteradas somente quando há alteração na sua estrutura química. As propriedades derivadas, porém, são definidas como propriedades que dependem do comportamento em massa da substância. Portanto, a última irá depender se os compostos se encontram na forma de pó ou de cristais (AULTON, 2016).

Por fim, as possíveis transformações das formas cristalinas, ao longo do estudo, foram consideradas, pois duas ou mais formas polimórficas podem existir, levando a diferentes propriedades termodinâmicas e propriedades físico-químicas, podendo afetar a reprodutibilidade, processo de fabricação e a performance destes compostos (SIGFRIDSSON; LINDSJÖ; PAULSSON, 2019). A varredura e controle destas mudanças foi realizada com intuito de determinar a forma mais estável (NEWMAN; BYRN, 2003).

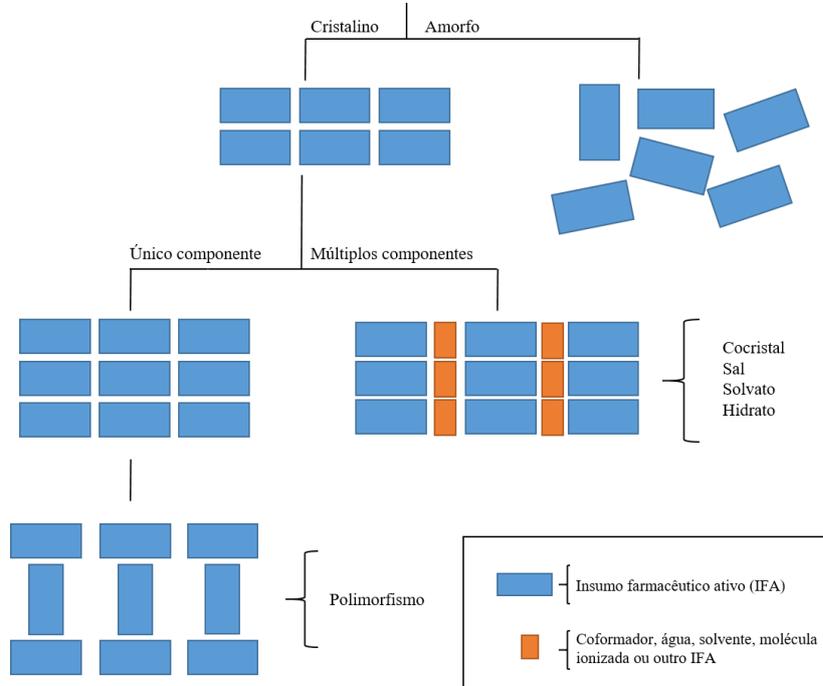
1.3 Cristalografia e formas cristalinas de fármacos

A Cristalografia é definida como a área da ciência que estuda a forma pela qual os átomos estão organizados dentro de um cristal e a forma pela qual a ordem de longo alcance é ocasionada. A relevância desta área se dá pela influência da estrutura cristalina sob as propriedades físico-químicas de um composto, afetando, diretamente propriedades inerentes a segurança e eficácia de produtos farmacêuticos (TILLEY, 2014) (THAKRAL *et al.*, 2018).

Os sólidos farmacêuticos podem ser divididos em sólidos cristalinos e sólidos amorfos, onde os sólidos cristalinos podem ser classificados pela presença de ordem tridimensional de longo alcance, nos quais átomos, moléculas e íons estão ordenados, ligados por interações não-covalentes, repetindo seu arranjo ao longo de três dimensões, como visualizado na **Figura 2** (TILLEY, 2014) (HEALY, 2017). Os amorfos, entretanto, possuem uma estrutura atômica aleatória e ordem de curto alcance (HEALY, 2017).

Os sólidos farmacêuticos cristalinos ainda podem ser divididos em outras classes, como cocristais, solvatos, hidratos e polimorfos, o último tendo sua importância ímpar para estudos de pré-formulação de novos candidatos à fármacos e para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 2 - Possíveis arranjos em sólidos farmacêuticos.



1.3.1. Polimorfismo

O fenômeno do polimorfismo ocorre quando um composto químico é capaz de arranjar-se em duas ou mais formas diferentes no cristal, possuindo a capacidade de cristalizar em estruturas cristalinas diferentes. O polimorfismo pode alterar inúmeras propriedades físico-químicas, podendo afetar propriedades físicas e termodinâmicas, como solubilidade, biodisponibilidade, ponto de fusão e estabilidade (THAKUR, 2015) (BROG *et al.*, 2013).

Os estudos de polimorfismo fornecem uma visão útil para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas drogas, além de poderem melhorar drogas bem conhecidas usando modificações polimórficas (CENSI; MARTINO, 2015).

A importância do polimorfismo torna-se ainda mais evidente para moléculas oriundas de plantas ao analisarmos a presença deste fenômeno entre estas moléculas. Alguns exemplos podem ser apontados ao longo da literatura, como a presença do polimorfismo em compostos de origem vegetal como, curcumina, chalconas e a puerarina (MATLINSKA *et al.*, 2018) (RAMOS *et al.*, 2016) (LI *et al.*, 2012).

O polimorfismo pode ser estudado por três técnicas principais: microscopia de hotstage, análise térmica e espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman. Todas estas técnicas foram utilizadas ao longo deste estudo (BROG *et al.*, 2013).

Formas polimórficas de moléculas farmacêuticas podem ser obtidas através de técnicas de cristalização ou durante o processamento de fármacos. Por este estudo ter trabalhado com moléculas em fase pré-clínica de desenvolvimento, as quais não possuem suas propriedades físico-químicas e estruturas cristalinas elucidadas, foram utilizadas técnicas de crescimento, além da influência da temperatura para realizar uma varredura destes polimorfos.

1.4 Determinação da estrutura cristalina

A determinação e o estudo do arranjo atômico ordenado em um cristal são possíveis desde o início do século XX, através da utilização da difração dos raios-X. Após a descoberta que os raios-X podem ser difratados ou espelhados de modo característico, foi possível atribuir um padrão de difração para cada composto. Isso tornou-se possível pois a intensidade e a posição dos feixes difratados ocorrem de acordo com o arranjo dos átomos. Além disso, eles dependem de outras propriedades, como número atômico (TILLEY, 2014) (HASEGAWA, 2012).

Para determinação da estrutura cristalina das riparinas foi utilizado a difração de raios-X em monocristal, a qual necessita de um único cristal para resolver a estrutura tridimensional de uma molécula (HASEGAWA, 2012).

Para obtenção de cristais para elucidação das estruturas cristalinas, foi utilizado a técnica de crescimento de cristais. Esta técnica está relacionada a formação estável de núcleos cristalinos, sendo necessário que haja uma supersaturação da solução na qual o composto de interesse esteja inserido. A supersaturação pode ser obtida por diferentes meios, dentre eles a evaporação do solvente por aquecimento e/ou resfriamento da solução (TILLEY, 2014).

Diversas técnicas podem ser empregadas para obtenção de cristais de produtos farmacêuticos, as quais neste estudo foi utilizada a evaporação lenta.

A técnica de obtenção de cristais por evaporação lenta baseia-se na adição do IFA a um solvente ou mistura de solventes. Para isso, o IFA precisa ser solúvel no(s) solvente(s)

utilizado(s) para que haja formação de uma solução, a qual pode ser mantida à temperatura ambiente ou em geladeira, a fim de serem submetidos a evaporação lenta. Através desta técnica as formas mais estáveis dos cristais serão obtidas (NEWMAN, 2013).

1.5 Espectroscopia no infravermelho e Raman

A absorção de radiação eletromagnética na região do infravermelho depende da distribuição de momentos de dipolo elétricos presentes na estrutura de moléculas orgânicas e inorgânicas. A espectroscopia vibracional no infravermelho é uma técnica utilizada para fornecer informações sobre propriedades vibracionais e ópticas de um material estudado (PAIVA *et al.*, 2015) (LONG *et al.*, 2002).

Para o estudo de compostos orgânicos, especificamente compostos farmacêuticos, a região do infravermelho de interesse refere-se a região correspondente ao número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , tradicionalmente conhecida como região de infravermelho médio (*Medium Infra-Red* – MIR). Quando uma molécula é incidida pela radiação no infravermelho, ela é apenas capaz de absorver esta radiação se essas frequências equivalerem à suas frequências vibracionais naturais. Por este motivo, a espectroscopia vibracional no infravermelho dá informações vibracionais, que correspondem a uma impressão digital da molécula, pois cada tipo de ligação possui uma frequência de vibração única. Dessa forma, mesmo que dois compostos diferentes apresentem ligações em comum, as vibrações geradas por estas ligações poderão apresentar desvios de frequência fazendo com que seus padrões de absorção de infravermelho sejam diferentes. É importante notar que os movimentos vibracionais dependem não somente dos átomos envolvidas nas ligações, mas também do ambiente em que estas ligações estão inseridas. (PAIVA *et al.*, 2015).

A espectroscopia Raman, por outro lado, baseia-se no espalhamento da luz. Assim como a absorção do infravermelho, o espalhamento é um fenômeno que ocorre quando há interação da radiação eletromagnética com a matéria. O efeito Raman ocorre quando a frequência da onda eletromagnética é espalhada. Quando esta onda espalhada possui uma frequência maior do que a onda incidente, tem-se o efeito anti-Stokes, quando ela é igual tem-se o efeito Rayleigh ou quando é menor tem-se o efeito Stokes (LONG *et al.*, 2002).

Ambas técnicas de espectroscopia vibracional auxiliam no estudo de caracterização de um material e são atrativas por tratarem-se de técnicas não destrutivas. É importante ressaltar que o espalhamento Raman e a absorção no infravermelho são técnicas complementares, devendo, muitas vezes, ser utilizadas em conjunto. Além dessas informações, o Raman e infravermelho são ferramentas valiosas para o estudo de polimorfismo (LONG, 2002).

1.6 Propriedades biofarmacêuticas

As propriedades biofarmacêuticas referem-se as propriedades responsáveis pela taxa e absorção de um fármaco. Elas podem ser divididas em quatro: propriedades relacionadas a disponibilidade do fármaco para absorção, estabilidade nos fluídos fisiológicos, permeabilidade e susceptibilidade à depuração pré-sistêmica (AULTON, 2016). Para este trabalho, foi estudado o perfil de solubilidade das riparinas, propriedade referente a liberação do fármaco para solução no local de absorção.

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes para o desenvolvimento de fármacos, pois para que estes sejam absorvidos através das membranas biológicas e estejam biodisponíveis, precisam estar molecularmente dispersos, em outras palavras, em solução. Dessa forma, todos os fármacos, exceto aqueles administrados via intravenosa, precisam ser primeiramente dissolvidos (FLORENCE, 2011). Portanto, torna-se evidente a importância da determinação da solubilidade de IFAs durante a fase de pré-formulação.

A solubilidade é definida como a maior quantidade de fármaco que pode ser dissolvida em um certo volume de solvente, após entrar em equilíbrio e para que a sua quantificação seja possível o método “shake-flask” proposto por Higuchi e Connors foi adaptado para este trabalho.

O método “shake-flask” é um dos métodos mais confiáveis para mensurar a solubilidade termodinâmica de um material e para isto é necessário que a amostra e o solvente sejam puras (AULTON, 2016). O ensaio para determinação da solubilidade baseia-se na obtenção de uma solução supersaturada, que posteriormente é medida em espectrofotômetro ultravioleta/visível (UV/VIS). Para obtenção desta solução, é necessário que se adicione um excesso da amostra a um determinado solvente, deixando o sistema sob agitação. Após o equilíbrio entre a parte dissolvida e a não dissolvida, é necessário que haja uma separação das duas fases, sendo a filtração o método escolhido para ser utilizado neste estudo. Após a amostra ser filtrada, a solução é medida em espectrofotômetro UV/VIS e a solubilidade da amostra determinada. Por fim, uma avaliação do material sólido remanescente deve ser realizada, com o intuito de observar se houve alguma transformação da fase sólida (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- Identificar e elucidar os polimorfos das riparinas I, II e III.

2.1 Objetivos Específicos:

- Realizar varredura de polimorfos.
- Realizar caracterização estrutural das riparinas.
- Avaliar as propriedades físico-químicas das riparinas.
- Determinar o perfil de solubilidade das riparinas.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Preparação das amostras

As riparinas foram sintetizadas e fornecidas pela Universidade Federal da Paraíba. Cristais da riparina III foram obtidos através da técnica de evaporação lenta, onde a substância foi solubilizada em uma mistura de água e metanol (2:1), deixando evaporar lentamente por algumas semanas em temperatura ambiente. As riparinas I e II já foram obtidas na forma cristalina.

3.2 Varredura de polimorfos

A varredura de polimorfos das riparinas I, II e III foi realizada em função da temperatura com o auxílio da análise térmica, onde as amostras foram submetidas a uma variação de temperatura entre 30 °C até 400 °C e 30 °C até -150 °C, utilizando um DSC Maia 200 F3 a uma taxa de 5K/min.

Também foram realizados ensaios de cristalização através da técnica de evaporação lenta para varredura de polimorfismo, onde não foi possível obter e/ou identificar nenhuma nova forma sólida cristalina das riparinas I e II.

3.3 Difração de raios-X de monocristal

A riparina I já teve sua estrutura cristalina determinada, enquanto que as estruturas cristalinas das demais riparinas e do polimorfo da riparina I foram determinadas no laboratório de Cristalografia Estrutural, da Universidade Federal do Ceará.

A coleta de dados de difração de raios-X em monocristal (ϕ scans e ω scans com κ e θ offsets) foi realizada em temperatura ambiente em um Bruker-AXS D8 VENTURE equipado com um goniômetro Kappa, detector PHOTON II CPAD, fontes $\text{CuK}\alpha$ ou $\text{MoK}\alpha$ INCOATEC I μ S 3.0 microfocus. A centralização dos cristais, a determinação da célula unitária, o refinamento dos parâmetros celulares e a coleta de dados foram controlados através do programa APEX3 (BRUKER, 2012).

A integração da estrutura foi realizada com o uso de SAINT (Bruker) e as intensidades foram escalonadas e corrigidas de absorção usando SADABS (BRUKER, 2001). Usando Olex2 (DOLOMANOV *et al.*, 2009), a estrutura foi resolvida por faseamento intrínseco usando SHELXT (SHELDRICK, 2015) e refinada por cálculo de mínimos quadrados de matriz completa baseado em F2 para toda a reflexão usando SHELXL (SHELDRICK, 2007). Todos

os átomos não-hidrogênio foram refinados anisotropicamente. As posições dos átomos de hidrogênio foram calculadas geometricamente e refinadas usando o modelo de “riding”.

Os programas MERCURY (versão 3.10) (MACRAE, 2006) e VEGA (PEDRETTI *et al.*, 2004) foram usados para preparar as representações das figuras para publicação.

3.4 Difração de raios-X de pó

Os difratogramas de raios-X de pó foram obtidos utilizando-se um instrumento convencional D8 Advanced da Bruker AXS, equipado com um goniômetro theta/theta, acoplado na geometria de transmissão com porta-amostra fixo e fonte de radiação Cu K α (0,15419 nm). Este equipamento também permitiu a realização de medidas com variação de temperatura através do uso de uma câmara Anton Paar, modelo TCU 110. As medidas foram realizadas sob uma tensão de aceleração de 40 kV e corrente de 40 mA, na geometria de Bragg Brentano.

3.5 Análise térmica

A Termogravimetria baseia-se na variação da massa medida em função do tempo ou da temperatura, sob uma programação controlada de temperatura em uma atmosfera controlada (MENCZEL e PRIME, 2009). A variação na massa avaliada na termogravimetria pode ser devido às transformações químicas, como degradação ou decomposição, ou às transformações físicas, como sublimação, evaporação ou condensação.

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica, na qual as informações calorimétricas quantitativas podem ser obtidas sob uma programação controlada de temperatura, sendo possível medir a diferença da taxa de fluxo de calor de uma substância em relação a uma de referência em função da temperatura (MENCZEL e PRIME, 2009).

Termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em um Netzsch STA449. As medições foram realizadas desde a temperatura ambiente até 400 °C, a 5 K/min, sob fluxo de nitrogênio, utilizando uma panela de alumínio aberta, com cerca de 5 mg da amostra.

Curvas de DSC também foram obtidas em ciclos controlados de aquecimento/resfriamento, os quais foram registradas no equipamento Maia 200 F3 (Netzsch) em uma faixa de temperatura de 30 a 150 °C a uma taxa de 5K/min. Os sensores e os cadinhos estavam sob fluxo constante de nitrogênio (70mL/min) durante o experimento.

3.6 Microscopia óptica

Os cristais foram colocados em uma lâmina e examinados com um microscópio óptico Leica (Modelo DM2500P), onde foi possível verificar o hábito cristalino.

O microscópio é equipado com uma platina aquecedora, onde foi possível realizar termomicroscopia, com o intuito de fornecer informações detalhadas sobre o comportamento do sólido analisado durante o aquecimento e resfriamento, auxiliando o estudo realizado através da análise térmica.

3.7 Espectroscopia vibracional

Os espectros de absorção obtidos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram registados em um espectrometro Vertex 70V (Bruker Optics) equipado com um detector DTGS, uma fonte Globar e um divisor de feixe de largo alcance. Foi utilizado um acessório de refletância total atenuada (ATR) de diamante de reflexão única (Platinum, Bruker Optics). Os espectros de IV foram obtidos a uma resolução de 2 cm^{-1} .

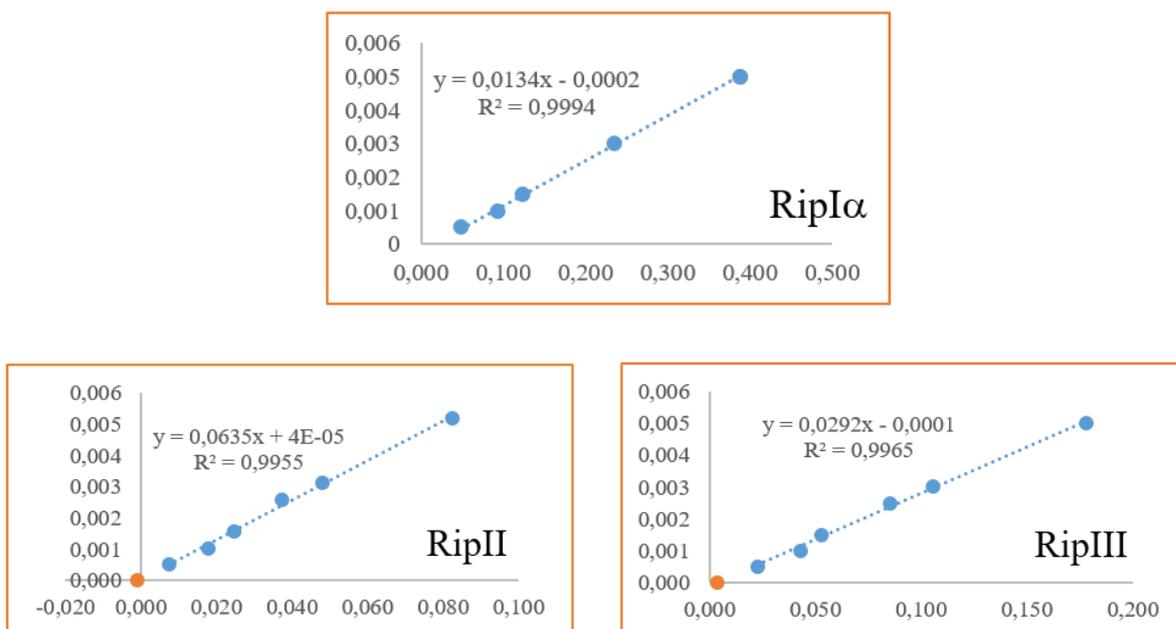
Os espectros Raman foram obtidos usando um módulo RAM II acoplado ao espectrômetro FTIR. As amostras foram excitadas com um laser Nd: YAG (1064 nm) e a radiação espalhada registrada com o detector Ge refrigerado com nitrogênio líquido. Espectros Raman também foram obtidos em um LabRAM HR (Horiba) equipado com detector CCD refrigerado com nitrogênio líquido, sendo utilizado luz de 633 nm para excitação.

3.8 Determinação da solubilidade

Para determinação da solubilidade, primeiro foi realizado uma varredura entre 200 e 500 nm, em um espectrômetro ultravioleta/visível (UV/VIS) Specord 250 (Analytik Jena), para identificar o comprimento de onda mais adequado para mensurar a solubilidade das riparinas I α , II e III. Posteriormente, foi elaborada uma curva de calibração, onde foi preparada uma solução 40% água e 60% etanol à uma temperatura de 37 °C. Cerca de 5 mg de amostra foi adicionada a esta mistura de solvente, obtendo assim, uma solução-mãe, da qual soluções de concentração 50 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ foram posteriormente preparadas.

As curvas de calibração das riparinas I α , II e III com o coeficiente de determinação e a equação da reta de regressão estão representadas na **Figura 3**.

Figura 3 - Curva de calibração das riparinas I α , II e III.



A solubilidade, então, foi determinada em função do tempo. Cerca de 10 mg de amostra foi adicionada a um volume de 10 mL de água, sendo mantido, sob agitação, onde alíquotas de 0,5 mL foram coletadas em intervalos regulares (5', 10', 15', 30', 45', 60' e 120' minutos). As alíquotas foram coletadas e filtradas utilizando filtros de seringa de porosidade 0,45 μ m.

A partir do material filtrado foram realizadas diluições em triplicata a partir de alíquotas de 0,2 mL com adição de 1,4 mL de água e 2,4 mL de etanol. Estas soluções foram avaliadas a partir do espectrômetro de ultravioleta/visível (UV/VIS), nos comprimentos de onda 227 nm, 301 nm e 255 nm para as riparinas I α , II e III, respectivamente.

O material sólido remanescente, após ser separado e secado da solução, foi submetido a uma avaliação através da espectroscopia de infravermelho para avaliar se houve alguma mudança em relação a matéria utilizada no início do ensaio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está dividido em duas seções, onde a primeira traz o estudo do polimorfismo nas riparinas discutido no artigo “Polymorphism in natural alkamides from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE)”, além de realizar uma caracterização estrutural dessas moléculas. A segunda e última seção, por sua vez, traz a discussão referente às análises por espectroscopia vibracional das três riparinas.

4.1 Artigo submetido: Polymorphism in natural alkamides from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE)

Laura Maria Teodoro Vidal^a, Beatriz Pinheiro Bezerra^{a,b}, Jéssica Castro Fonseca^a, Auriana Serra Vasconcelos Mallmann^c, Francisca Cléa Florenço de Sousa^c, José Maria Barbosa-Filho^d, Alejandro Pedro Ayala^b

^aDepartment of Pharmacy, Federal University of Ceará. Fortaleza – Ceará – Brazil.

^bDepartment of Physics, Federal University of Ceará. Fortaleza – Ceará – Brazil.

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará. Fortaleza – Ceará – Brazil.

^dInstitute of Chemistry, Federal University of Paraíba. – João Pessoa – Paraíba- Brazil.

ABSTRACT

Riparins are natural alkamides, which have been isolated from *Aniba riparia*. The substitution of hydroxyl groups in the first aromatic ring defined different types of riparins. Riparin I, II and III showed several potential therapeutic activity in preclinical studies, such as antidepressant, anxiolytic and anti-inflammatory effects. Given the significance of the physicochemical characterization and crystalline elucidation of a drug candidate molecule, this contribution has as main objective to elucidate the crystalline structures of riparins, besides conducting a thermal and physicochemical studies in order to identify possible polymorphs. This study also has the objective to evaluate the solubility of the compounds. To achieve the results, several techniques were used, such as: Raman and infrared spectroscopy, thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), ultraviolet–visible spectrophotometer (UV/VIS), X-ray powder diffraction (XRPD) and single-crystal X-ray diffraction (SCXRD). The crystalline structures of riparins were determined. Despite riparin I has its structure elucidated and reported in the literature, it was possible to determine the crystalline structure of a polymorph, which presented a monoclinic crystalline system, one molecule per asymmetric unit and four molecules per unit cell. Riparin II also exhibited a monoclinic system, with two molecules per asymmetric unit and eight per unit cell, while riparin III, though also presented a monoclinic crystalline system, exhibited one molecule per asymmetric unit and two per unit cell. The structural and conformational characteristics of the three riparins lead to physical-chemical, thermal and

spectroscopic differences. It was also possible to evaluate and discuss the polymorphism of riparin I and III.

Keywords: Riparins. X-Ray Diffraction. Crystalline structure elucidation. Vibrational spectroscopy. Thermal analysis. Solubility profile.

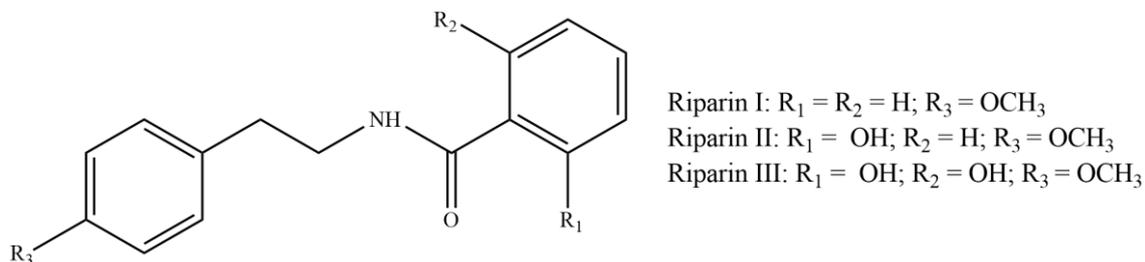
I INTRODUCTION

Most of the active pharmaceuticals ingredients (API) are present in the solid form, therefore understanding its crystalline structure and how the long range order is produced is relevant for the study of these compounds. A crystal structure can affect the physicochemical properties of an API, being related to therapeutic efficacy. It becomes even more evident, then, the need for understanding the crystalline structures [1].

The physical form of an API is critical for the drug development chain, being the final step of the API production, typically crystallization, should be stable and have suitable solubility and handling characteristics for downstream processing activities such as formulation, highlighting the polymorphism. The significance of the polymorphism study of plant-derived molecules becomes evident, since there are even more examples in the literature, such as polymorph of curcumin, chalcones and puerarin [2] [3] [4]. Furthermore, when a same compound present distinct unit cells, presenting polymorphism, that can be responsible for affecting physicochemical properties, also influencing characteristics such as solubility, dissolution rate and bioavailability. Thus a detailed polymorphism scan should be performed, to assure quality, safety and efficacy of drug products [5]. The polymorphism studies provide a useful overview for pharmaceutical industry in the development of new drugs and improve well know drugs using polymorphic modifications [6].

N-benzoyl tyramine (riparin I), N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) and N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (riparin III) are natural alkaloids isolated from the green fruit of *Aniba riparia*, a plant original from the Amazon region [7]. Those compounds demonstrated potential therapeutic effects in preclinical studies in neuroscience animal behavioral models. Among those results, riparin I, II and III presented potential anxiolytic and antidepressant-like effects [8-12]. Furthermore, riparin I and III presented relaxing effect on the smooth muscles [13], while riparin II showed potential anti-inflammatory activity [14]. In all the riparins investigated in this work, the hydroxyl group of the tyramine fragment is substituted by a methoxy group. Riparins II and III differ from I by the substitution of hydrogens of the benzoyl aromatic ring (PH1) for one or two hydroxyl groups, respectively, as shown in **Figure 1**.

Figure 1 - Chemical structure of riparins.



Although the crystalline structure of riparin I has been already reported [13] and different batches of riparin I were evaluated through thermal study and electron microscopy, it was possible to determine the crystalline structure of a polymorph [15]. Moreover, a detailed physical-chemical characterization of riparins is still required, including evaluate thermal profile of the substances. All drugs before be absorbed must be solubilized, thus this article also aimed to analyze the solubility profile of riparins I, II and III, since it is one of the most important properties for a drug candidate [16] [17]. A study of physicochemical properties and the crystalline structure of these molecules becomes necessary since there are evidence of results indicating therapeutic potential effect transforms riparins in drug candidates.

For this purpose, the study of crystallography and the use of X-ray diffraction as technique emerge as a useful way to study these compounds [18]. For the pharmaceutical industry this study is part of the preformulation phase, which is defined as the stage of development of a new drug responsible for the physicochemical characterization of candidate molecules [19]. Therefore, encouraged by the relevance of preformulation and pre-clinical studies and processing the knowledge that the structure is intrinsically related to the activity of a compound the aim of this article was to elucidate the crystalline structure of riparins, focusing on the study of polymorphism, besides perform a thermal, spectroscopic study and determining the solubility profiles. To accomplish these objectives, several experimental techniques were used, as Fourier transform infrared (IR) and Raman (RS) spectroscopies, powder X-Ray diffraction (PXRD), thermogravimetry (TG), ultraviolet–visible spectrophotometer (UV/VIS) and differential scanning calorimetry (DSC).

II EXPERIMENTAL SECTION

Sample preparation

Riparin I, II and III were synthesized and provided by Universidade Federal da Paraíba. Riparin III crystals were obtained through slow evaporation. Riparin III was

solubilized in a solvent mixture of methanol and water (2:1) and left to evaporate slowly for a couple of weeks at room temperature. The raw material of riparin I and II has already been obtained in crystalline form.

Powder X-ray Diffraction (PXRD)

Powder X-ray diffraction patterns were obtained using a D8 Advanced Bruker AXS, equipped with a θ/θ goniometer, operating in the Bragg-Brentano geometry with a fixed specimen holder, Cu K α (0.15419 nm) radiation source and a LynxEye detector. The voltage and electric current applied were 40 kV and 40 mA, respectively. The opening of the slit used for the beam incident on the sample was 0.6 mm. The sample was scanned within the scan range of $2\theta = 5^\circ$ to 40° continuous scan, with a scan rate of 2 deg min^{-1} .

Single-crystal X-ray Diffraction (SCXRD)

Single-crystal X-ray diffraction data collection (ϕ scans and ω scans with κ and θ offsets) were performed at room temperature on a Bruker-AXS D8 VENTURE equipped with a Kappa goniometer, PHOTON II CPAD detector, CuK α or MoK α INCOATEC I μ S 3.0 microfocus sources. The crystal centering, unit cell determination, refinement of the cell parameters and data collection was controlled through the program APEX3 [20]. The frame integration was performed using SAINT [21] and the intensities were scaled and absorption corrected using SADABS [21]. Using Olex2 [22], the structure was solved by intrinsic phasing using SHELXT [23] and refined by full-matrix least-squares calculation based on F^2 for all reflection using SHELXL [24]. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atom positions were calculated geometrically and refined using the riding model. The programs MERCURY (version 3.10) [25] and VEGA [26] were used to prepare the artwork representations for publication. The crystallographic information files of the structures riparin I β , riparin II and III γ were deposited in the Cambridge Structural Data Base [27], respectively under the codes 1892485, 1892486 e 1892487. Copies of the data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk. All the crystallographic data and refinement parameters of the novel solid forms are given in Table S1 (Supporting information).

Thermal Analysis

Thermogravimetric (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained using a simultaneous thermal analysis equipment (Jupiter STA 449, Netzsch).

Around 3 milligrams of the sample were placed in sealed aluminum crucibles with pierced lids. Measurements were recorded from room temperature up to 400 °C using a heating rate of 5 °C/min. Furthermore, DSC curves in controlled heating/cooling cycles were recorded on the equipment Maia 200 F3 (Netzsch) in a temperature range from 30 to 150 °C at a 5K.min⁻¹ rate. The sensors and the crucibles were under a constant flow of nitrogen (70mL/min) during the experiment.

Hotstage Microscopy

A polarized microscope Leica (DM2500P) coupled with a hot-stage Linkam (FTIR600) was used to submit the crystals to a heating process using temperature programs under constant monitoring.

Calibration curves

To determine the solubility, a Spectod 250 (Analytik Jena) spectrophotometer was used to identify the adequate absorbance for riparin I, II e III. The calibrations curves were determined using 40% water and 60% ethanol solution at 37 °C (± 1). The spectra used to build these curves had a range of 200 a 400 nm. It was used concentration solutions of 50 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$.

Solubility profiles

An excess of the sample was added to water and its concentration was determined by visible ultraviolet spectrometry Specord 250 (Analytik Jena) at predetermined times: 5', 15', 30', 60', 120' and 1440'. The wavelength used was 226 nm, 301 nm and 255 nm for riparin I, II and III, respectively. The solubility was measured at 37 °C (± 1). This method was defined by using modified shake flask method of Higuchi and Connors (1965). After a 48-hour period, the remain solid sediment was evaluated by vibrational spectroscopy to evaluate possible structural modifications.

III RESULTS AND DISCUSSION

Structural analysis

The crystalline structure of riparin I was previously reported by Marques *et al.* (Marques *et al.*, 2005), nevertheless, it was possible to identify a polymorph of this compound. Therefore, the following nomenclature will be used: structure reported by Marques *et al.* and

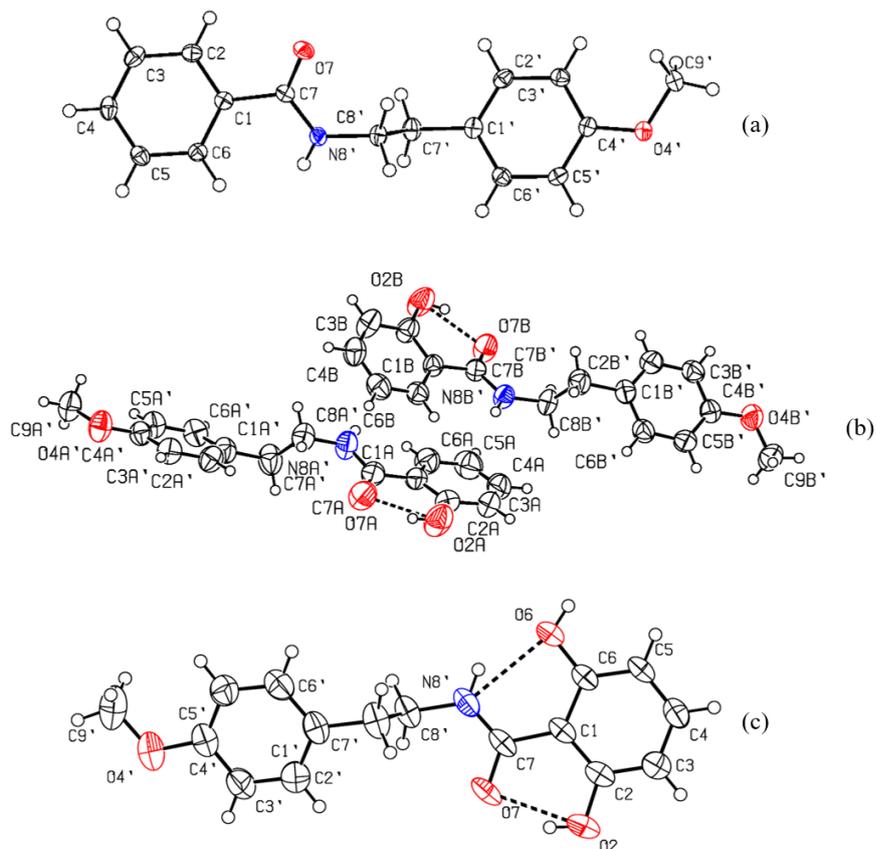
the new polymorph will be named as riparin I α and I β , respectively. Riparin I α crystallizes in the triclinic space group $P\bar{1}$ with one molecule per asymmetric unit and two per unit cell. Single crystals of I β were collected from the raw material. This polymorph crystallizes in a monoclinic crystalline system, with four molecules per unit cell, $P2_1/n$ space group and with the following cell parameters: $a = 8.0074(9)$ Å; $b = 5.1466(6)$ Å; $c = 32.075(4)$ Å; $\beta = 96.538(4)^\circ$.

Riparin II crystallizes with a columnar habit in a monoclinic system, space group Cc and the following cell parameters: $a = 6.452(2)$ Å; $b = 29.288(10)$ Å; $c = 14.875(8)$ Å; $\beta = 97.04(2)^\circ$. It presents two molecules per asymmetric unit and eight per unit cell ($Z'=2$). The two non-overlapping molecules are herein named as conformers A and B. Riparin III also crystallizes with a columnar habit in a monoclinic system, belonging to the space group Pc with the following cell parameters: $a = 11.6479(3)$ Å; $b = 4.86110(10)$ Å; $c = 13.4222(3)$ Å; $\beta = 106.7930(10)^\circ$. The asymmetric unit of riparin III present only one molecule ($Z'=1$). The crystallographic data parameters of the new structures reported in this works are shown in Table 1.

Table 1 - Crystallographic data of the riparins.

Name	I β	II	III
Empirical formula	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄
Molecular weight	255.30	271.30	287.30
Crystalline system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Special group	$P2_1/n$	Cc	Pc
$a/\text{Å}$	8.0074(9)	6.452(2)	11.6479(3)
$b/\text{Å}$	5.1466(6)	29.288(10)	4.86110(10)
$c/\text{Å}$	32.075(4)	14.875(8)	13.4222(3)
$\beta/^\circ$	96.538(4)	97.04(2)	106.7930(10) $^\circ$
Volume (Å ³)	1313.24	2789.68	727.577
R-factor (%)	3.71	4.56	3.23
Z/Z'	4/1	8/2	2/1
Radiation	CuK α	MoK α	CuK α

Figure 2 - ORTEP plots of the asymmetric units of riparins (a) I β , (b) II and (c) III.



In general, the molecular configuration of riparins can be described on the basis of the planes defined by the aromatic rings (PH1 and PH2) and the dihedral angles of the chain containing the methyl amide group. **Figure 3** clearly shows that the conformational differences between these molecules lies on the chain containing the methyl amide group. The C6'C1'C7'C8' dihedral angle in these conformers differs around 45°, whereas the other torsional angles are relatively close.

Extending this discussion to the other riparins, it is possible to notice that both polymorphs of riparin I and riparin III have intermediary configurations between conformers A and B. However, the most remarkable feature on this comparison is the orientation of the PH1 ring. In the case of I β , the group methyl amide has a contrary configuration in relation to the other riparins. That fact gives an angle of 6.18° between the planes defined by the aromatic rings. For I α the angle is 71.73°, which is large compared to the one observed in the other molecules (6 to 24°). This distortion is also accompanied by smaller dihedral angles in the methyl amide chain (around C8'N8' and C7C1 bonds), favoring the intermolecular hydrogen bond C8' H8'B...O7.

The origin of these conformational changes is in the hydroxyl substitutions. The hydroxyl at the position *orto*, which is common to II and III, give rise to an intramolecular

hydrogen bond $O2H2 \cdots O7$, which turns the carbonyl group from being out of plane of the closest aromatic rings in riparin I, towards to an almost in plane conformation in the others riparins. In fact, the carbonyl group is coplanar in the case of riparin III, due to an additional hydrogen-bond ($N8'H8' \cdots O6$), which is consequence of the presence of a second hydroxyl group.

Table 2 – Selected dihedral and interplanar angles (°) of riparin molecules in the corresponding asymmetric units.

	C6'C1'C7'C8'	C7'C8'	C8'N8'	N8'C7	N8'C7C1C2	PH1-PH2
I α	-102.39	172.65	71.94	176.46	146.05	71.73
I β	-101.64	179.39	-107.86	-177.87	-154.19	6.18
IIA	121.59	173.30	106.09	-175.46	166.20	11.16
IIB	-76.37	176.50	98.74	179.66	164.01	17.40
III	-98.23	178.04	86.34	173.82	179.64	23.88

Figure 3 - Comparison of the molecular conformation of the riparin molecules: I α (blue), I β (lilac), II conformer A (red), II conformer B (orange) and III (green).

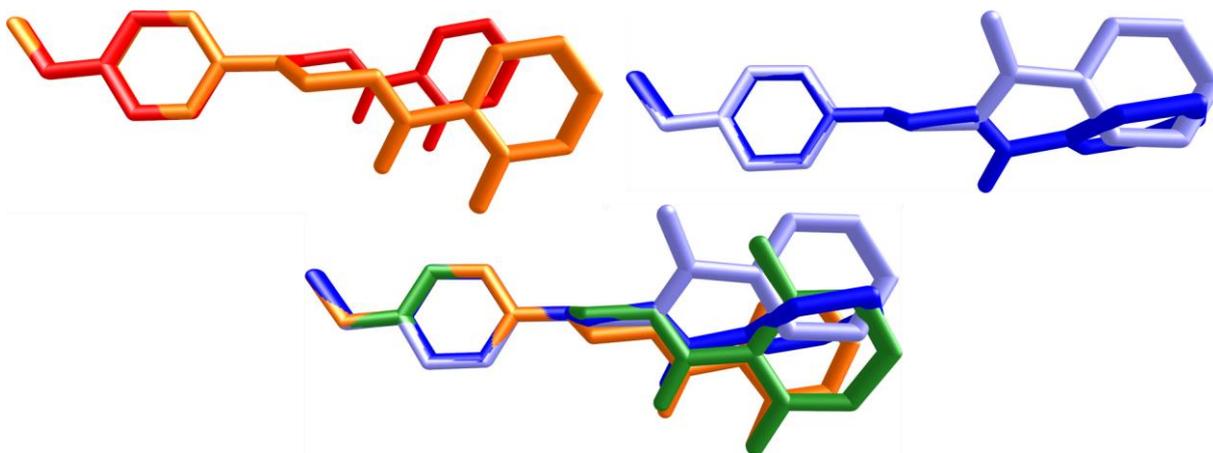


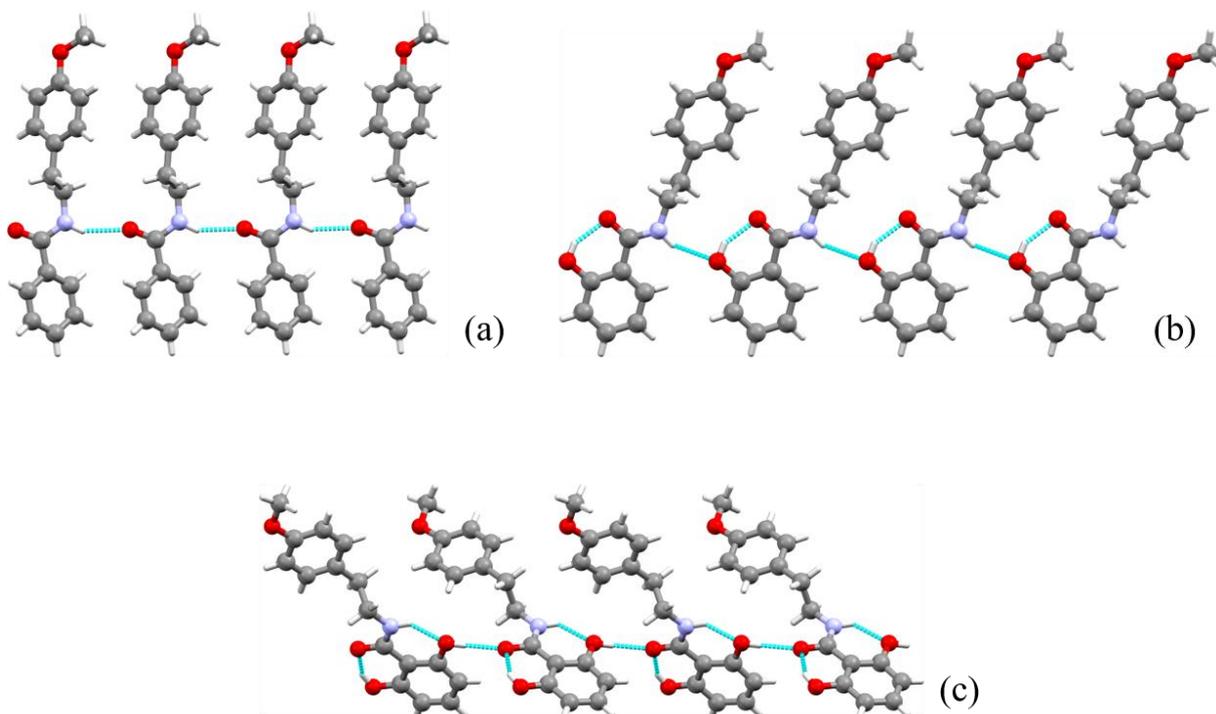
Table 3 – Hydrogen bonds of riparins showing the distances and angles between the donors (D), hydrogens (H), and acceptors (A).

Type	D—H...A	H...A (Å)	D...A (Å)	D—H...A (°)
Iα				
	N8' H8'...O7	2.16	2.950(3)	153
Iβ				
	N8' H8'...O7	2.17	3.0036(14)	164
	C8' H8'B...O7	2.39	2.7922(14)	103
II				
	N8A'H8A'...O2A	2.15	2.907 (5)	146
	N8B'H8B'...O2B	2.12	2.909 (4)	152
	C6B'H6B'...O7B	2.53	3.446 (5)	171
Intra	O2A H2A...O7A	1.76	2.499 (5)	148
Intra	O2B H2B...O7B	1.76	2.499 (4)	149
	C8B'H8BA...O7B	2.43	2.795 (4)	102
	C8A'H8AB...O7A	2.45	2.787 (6)	100
III				
	O6H6...O7	1.95	2.7688 (19)	178
	C5H5...O2	2.46	3.077 (3)	124
	C5H5...O7	2.58	3.290 (2)	134
Intra	O2 H2...O7	1.79	2.518 (3)	147
Intra	N8' H8'...O6	1.96	2.643 (2)	136

The crystalline structure of all the riparins investigated in this work is characterized by intermolecular bonding chains running along one of the crystallographic axis (**Figure 4**). The packing of these chains defines the long range order, but the intrachain and interchain interactions are determined by the molecular geometry of each compound.

Chains in riparins I α and I β are determined by N8'H8'...O7 hydrogen bonds along the a and b directions, respectively. This interaction could be *a priori* expected because it involves the most prominent acceptors/donors of riparin I. In the case of riparin II, each chain, running along the c axis, is composed by a single conformer, but the O7 atom cannot received the hydrogen bond because it is involved in an intramolecular bond with the hydroxyl substituted in the PH1 rings (O2H2...O7). Thus, the intermolecular interaction is defined by the N8'H8'...O2 hydrogen bond, which, in the case of conformer B, is also supported for a new bond C6B'H6B'...O7B induced by the conformation of IIB.

Figure 4 - Molecular chains observed in the crystalline structures of riparins (a) I β , (b) II and (c) III.

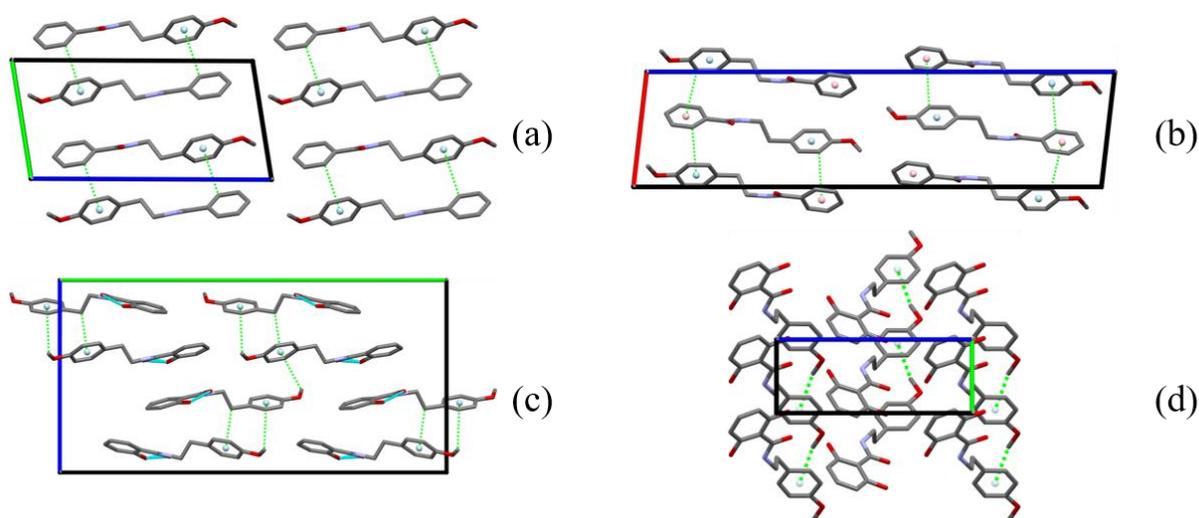


The substitution of the second hydroxyl group in riparin III leads to a new intermolecular pattern. Besides the intramolecular bond observed in riparin II, a new intramolecular interaction (N8'H8'...O6) blocks the NH moiety in riparin III. Due to that, the chains in this compound are linking the oxygen of the amide group with the new hydroxyl group (O6H6...O7), which in fact, is a bifurcated bond with C5H5...O7. A common feature in the crystalline structures of riparin I and II is that the molecules constituting a chain are aligned with parallel rings. On the other hand, consecutive molecules in riparin III have opposite orientations related to the glide plane, leaving the corresponding rings almost perpendicular ($\sim 88^\circ$).

Taking as a reference the structure of riparin I α , one may notice that there is just one hydrogen-bond (

Table 3), which links molecules in the infinite chains. Thus, the packing of these chains needs to determine by other kind of interactions. In fact, antiparallel infinite chains in riparin I α are held together by C2H2 $\cdots\pi$ (PH2) bonds, as shown in **Figure 5**. The antiparallel packing leads to the formation of dimers of chains where the PH1 of one molecule is linked to PH2 of the nearest chain (**Figure 5a**).

Figure 5 - Unit cells of riparins (a) I α , (b) I β , (c) II and (d) III showing the CH $\cdots\pi$ interactions. Hydrogens were removed for clarity.



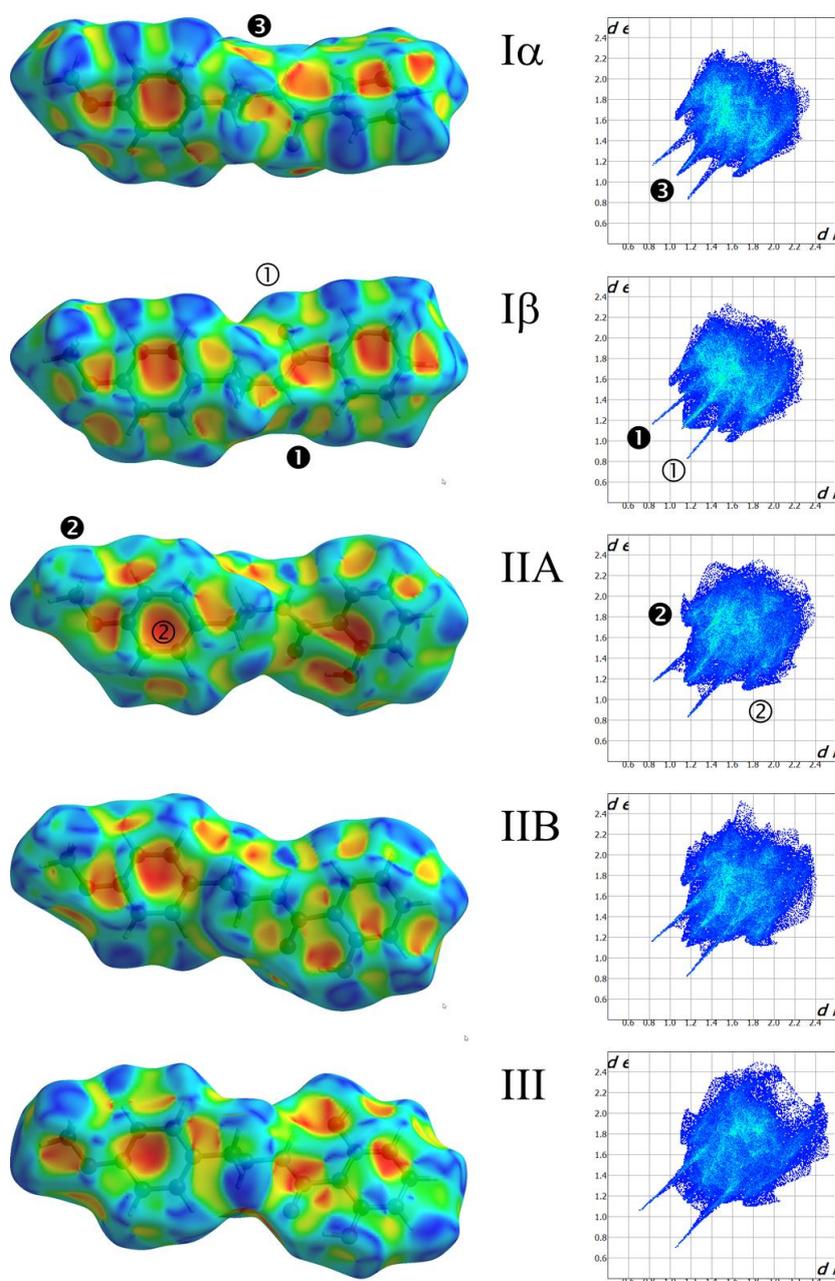
In riparin I β , the main CH $\cdots\pi$ is preserved, but two new bonds appear linking the PH1 ring with two neighbor chains (C3'H3' $\cdots\pi$ (PH1) and C5'H5' $\cdots\pi$ (PH1)). The two conformers of riparin II form similar chains, which are forming alternated planes. Conformer IIA acts as the mains plane were IIB chains are bonded. However, due to the hydroxyl groups the patter is different to the one of riparin I. The PH2 ring from IIA receives a CH $\cdots\pi$ form different groups of IIB, a methylene group on one side (C7B'H7BB $\cdots\pi$ (PH2A)) and the methyl group on the other side (C9B'H9AA $\cdots\pi$ (PH2A)). Conversely, the stacking of the planes is completed by a bond received for PH2B from the methyl group of IIA (C9A'H9AA $\cdots\pi$ (PH2B)). Finally, the non-aligned chains of riparin III just allow one CH $\cdots\pi$ bond between neighbor chains using the methyl group (C9'H9'B $\cdots\pi$ (PH2)), but in this case, a hydrogen bond between PH1 rings (C5H5 \cdots O2) contributes to the packing of the chains.

Hirshfeld surface (HS) and fingerprint plots are an interesting tool that can be used in order to explore intermolecular contacts, facilitating the understanding of these interactions in order to study the crystal electron density into molecular fragments, once it is defined by the molecule and the proximity of its nearest neighbors, providing this way a unique information about each molecule in a crystal [28]. The Hirshfeld surfaces and the related 2D-fingerprint plots were calculated using CrystalExplorer.

Figure 6 presents the Hirshfeld surfaces and the corresponding 2D-fingerprints of the investigated riparins. The Hirshfeld surface was mapped with the shape index because it provides valuable information on complementary bonds [29]. These surfaces are very useful to identify intermolecular interactions. For example, the $\text{CH}\cdots\pi$ bonds, which are characteristics of all the riparins, are evidenced by the red depressions over the rings. On the other hand, the presence of $\pi\cdots\pi$ can be ruled out, because these interactions are fingerprinted by red and blue triangles in a ‘bow tie’ pattern over the rings, which is not observed. Furthermore, the 2D-fingerprints allow to differentiate distinctive features in the crystal packing.

Thus, the “wings”, labeled as 2 in **Figure 6**, are also characteristic of the $\text{CH}\cdots\pi$ bonds, defining the complementary regions of this interactions which can be also identified in the Hirshfeld surface. In the same way, the sharp spikes, labeled as 1, define the short and strong hydrogen bonds linking molecules in the infinite chains. A third spike (labeled as 3) at the center of the fingerprint plot stands for $\text{H}\cdots\text{H}$ contacts, which were not discussed previously but are prevalent in all the structures. Hirshfeld surfaces and 2D-fingerprint plots confirm that, despite the differences in the molecular structure, the crystalline structure of the riparins have common features which will also lead to similarities in the physicochemical properties.

Figure 6 - Hirshfeld surfaces and 2D-fingerprints of riparins I, II and III.

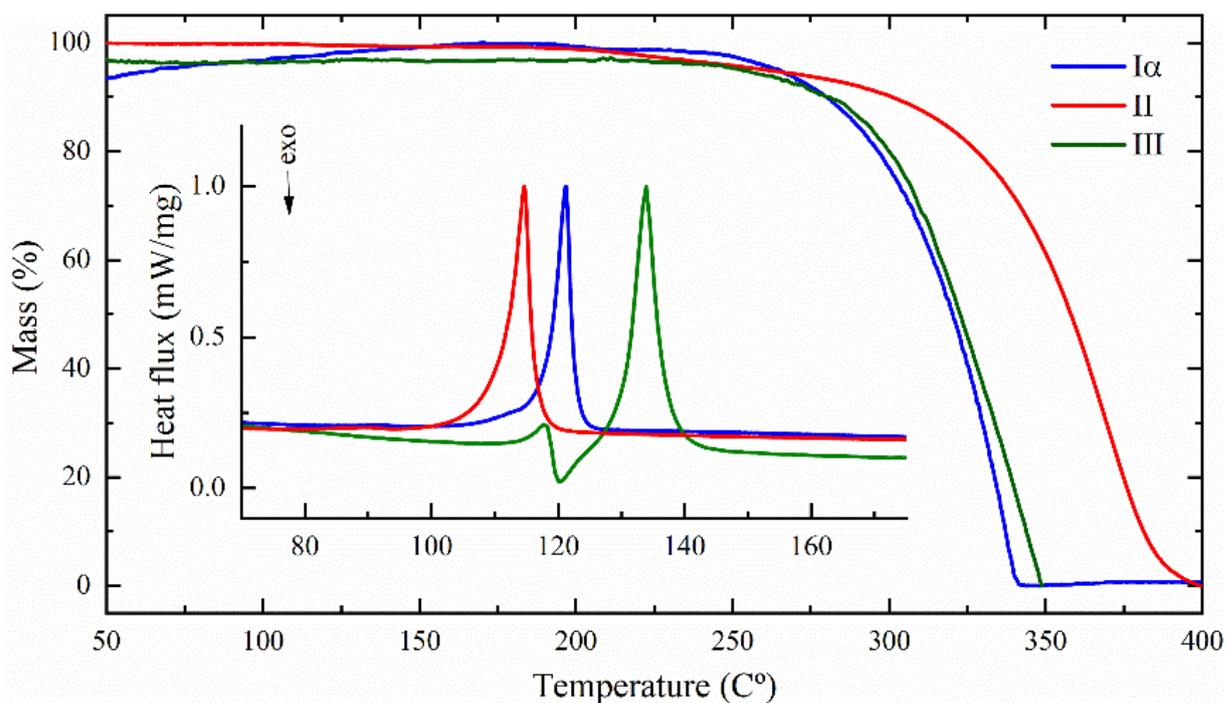


Polymorphism analysis

In order to investigate the polymorphic transitions in the riparins, thermal analysis was applied to determine the stability of each form. All the investigated compounds melts without decomposition between 100 and 150 °C as observed in the thermogravimetric and calorimetric curves shown in **Figure 7**, where drop of the sample mass to zero suggest the

boiling of the compounds above ~ 275 °C. However, from the point of view of the polymorphism phenomena, we will concentrate our attention in solid forms of riparins, but it is also important to take into consideration that successive melting/recrystallization processes do not degrade the samples.

Figure 7 - DSC/TG curves of riparins I α , II and III.

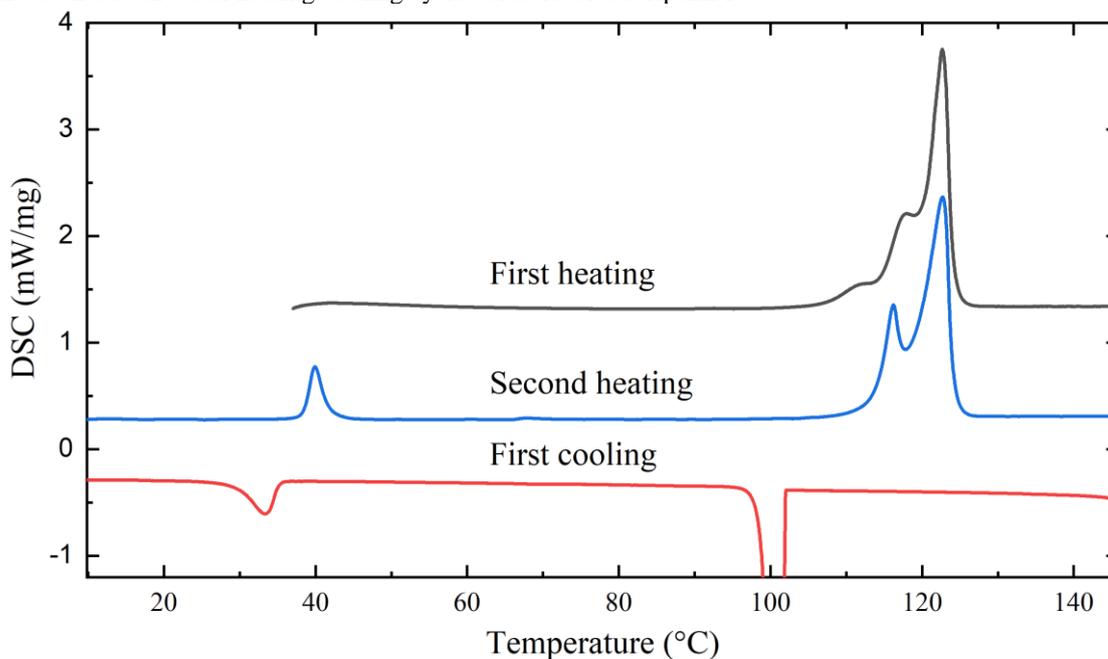


Let's consider first riparin II, since no evidences of polymorphism were observed. According to the calorimetric measurements successive heating cooling cycles also showed a well-defined endothermic event, $T_{\text{onset}} = 106.0^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 91.14$ J/g), associated with the melting point of the sample. The TG curve showed two mass loss events after a temperature of 200 °C.

The thermal evolution of riparin I is more complex. Despite the fact the TG curve shows only one mass loss event ($T_{\text{onset}} = 220^{\circ}\text{C}$), the DSC curve of the as received riparin I showed three endothermic events (**Figure 8**). The first one can be easily determined at $T_{\text{onset}} = 107.6^{\circ}\text{C}$, but the followings are highly overlapped and the temperatures were estimated to be around 113.9 and 119.4 °C. The first two event can be ascribed to solid-solid transformations, and the last one to the melting point. After recrystallizing the sample, on heating, three events are again observed, but the first one is just above room temperature at $T_{\text{onset}} = 38.4^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 14.9$ J/g), whereas the second is at 113.7 °C. These events can also be associated with a possible phase transition suggesting the appearance of different polymorphs.

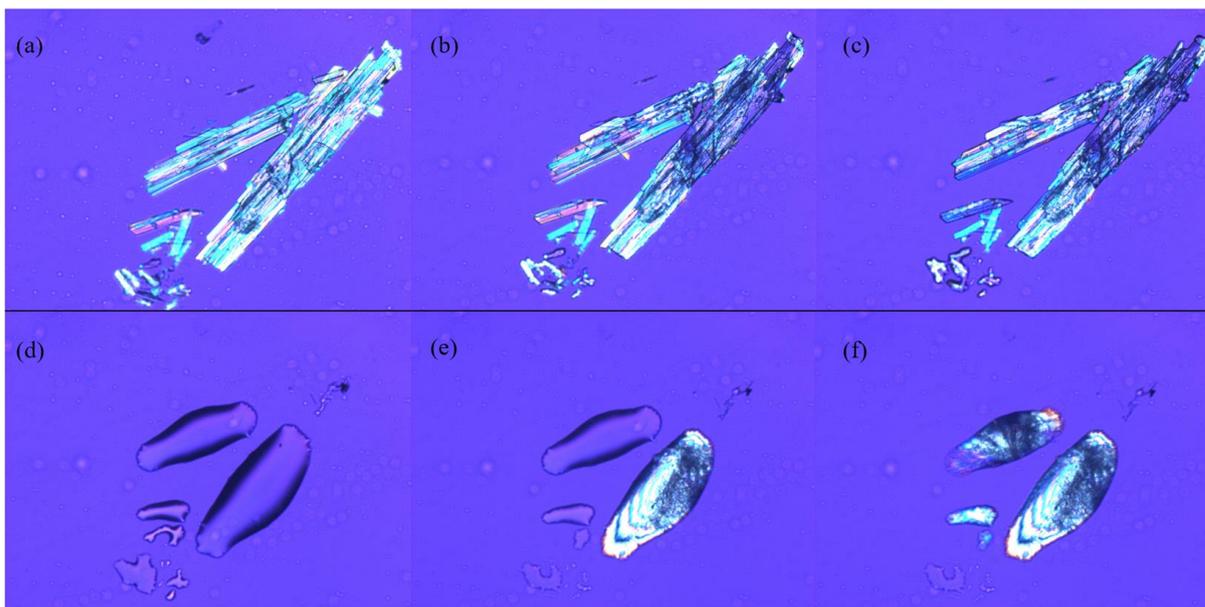
Finally, the last event ($T_{\text{onset}} = 117.8\text{ }^{\circ}\text{C}$) is related with the riparin I melting point. The last two events are overlapped do not allowing a precise determination of the individual transition enthalpies, but the total energy involved in the process is 134.9 J/g . On cooling, the recrystallization and the first transition occur in a single peak with a shoulder at $102.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = -130.9\text{ J/g}$). After that, the event associated with the transformation into the room temperature polymorph is observed at $35.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = -13.8\text{ }^{\circ}\text{C}$). Notice that the transition enthalpies in the cooling process agree very well with those of the second heating, supporting the hypothesis that all the transitions are reversible. The same results were obtained in successive heating/cooling cycles, on independent samples and changing the temperature ramp. Thus, an irreversible solid-solid transformation is observed on the first heating at $107.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, whereas two reversible transitions (38.4 and $113.7\text{ }^{\circ}\text{C}$) were confirmed after the recrystallization of riparin I.

Figure 8 - DSC curves of heating/cooling cycles of as received riparin I.



In order to complement the investigation of riparin I polymorphism, a hotstage analysis was performed, **Figure 9**. After hotstage analysis, it is possible to notice a small difference between $31.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $117.7\text{ }^{\circ}\text{C}$. The melting process starts at $124.4\text{ }^{\circ}\text{C}$, corroborating with the results presented in the DSC analysis. Recrystallization, in turn, starts at $87.9\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figure 9 - Hotstage analysis at 31.7 °C (a), 117.7 °C (b), 124.4 °C, 128.6 °C (d), 87.9 °C (e) and 74.2 °C (f).

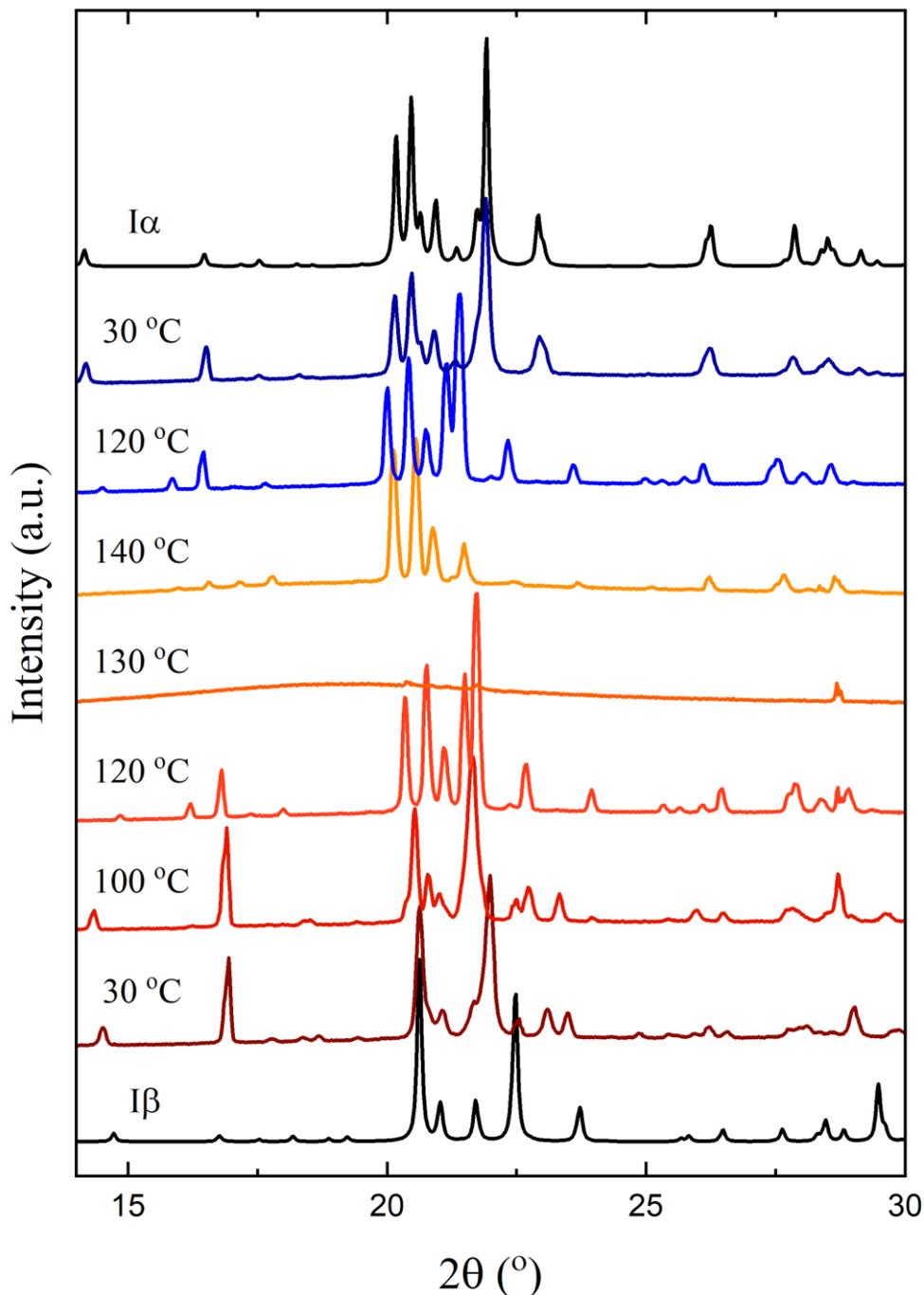


With the goal of to confirm the presence of polymorphism in riparin I, a temperature-coupled X-ray diffraction analysis was performed.

The polymorphic transition of riparin I were investigated by *in situ* powder x-ray diffraction submitting the as received sample to a heating/cooling cycle (**Figure 10**). Even though, the I β polymorph was determined from single crystals in the as received sample, this structure is not representative of the whole sample, which seems to be a mixture of phases. However, on heating, just above 100 °C, a transformation in a new polymorph (I γ) is clearly observed in the PXRD pattern at 120 °C. This polymorph melts around 130 °C and suddenly recrystallize into a new form (I δ). This polymorph transforms into I γ as noticed by comparing the patterns at 120 °C recorded on heating and on cooling. Finally, I α is obtained when the sample returns to room temperature. On a new heating process, the phase transitions identified during the cooling the sample are observed in a reverse sequence. Despite small differences in the transitions temperatures, probably associated to temperature ramps and equipment, the PXRD results are in excellent agreement with the DSC events.

Considering the previous results, it is possible to conclude that riparin I has at least four polymorphs. I β was observed within a phase mixture, but, according to the PXRD and DSC results, it seems to transform into I γ at 107.6 °C. On the other hand, I α seems to be the most stable one, exhibiting a reversible phase transition sequence (on heating): I α (38.4 °C) \rightarrow I γ (113.7 °C) \rightarrow I δ (117.8 °C) \rightarrow melting.

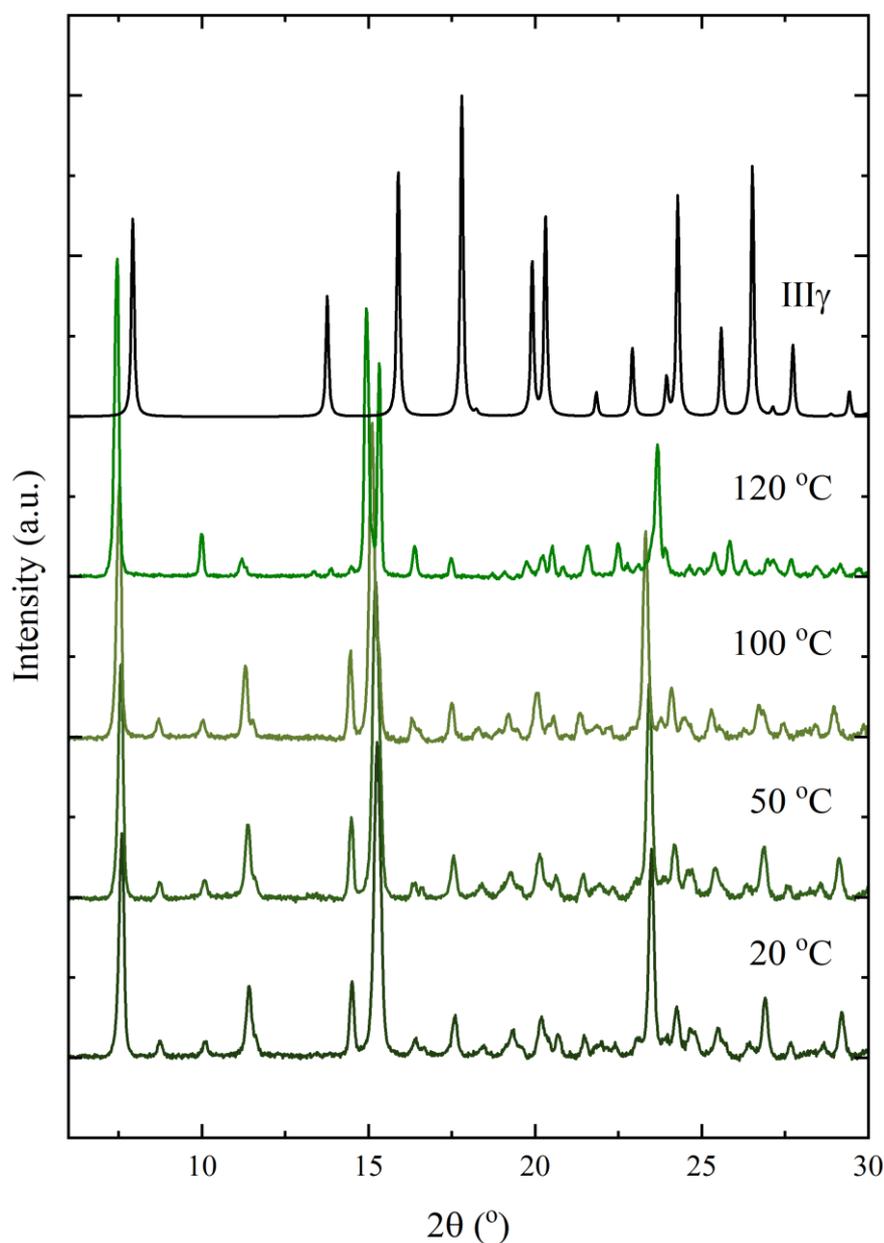
Figure 10 - X-ray powder diffraction patterns of a heating/cooling cycle (bottom to top) of the as received riparin I. The calculated patterns from polymorphs I α and I β were included for comparison.



The DSC curve of the riparin III raw material (**Figure 7**) presents two well defined events. The first one is composed by an endothermic peak ($T_{\text{onset}}=114.4$ °C) followed by an exothermic one, which can be described as a melting followed by a recrystallization. The second event is endothermic ($T_{\text{onset}}=130$ °C) and is related to the melting point. However, riparin III does not recrystallize on cooling. The sequence of events in the DSC measurements suggests that the riparin III is also a polymorphic compound.

To confirm the existence of polymorphs of riparin III, the corresponding raw material was also measured *in situ* by X-ray powder diffraction. Characteristic patterns are shown in **Figure 11**. As expected, there are no changes in the patterns up to 100 °C, but above this temperature a phase coexistence region is observed. The transformation is completed around 120 °C, in good agreement with thermal analysis. Thus, the polymorph below and above the transition temperature were labelled as III α and III β . A third polymorph obtained by slow evaporation has its crystalline structure determined. The calculated PXRD pattern is included in **Figure 11**, but it does not describe the crystalline forms observed by heating the sample, thus it was labelled as III γ .

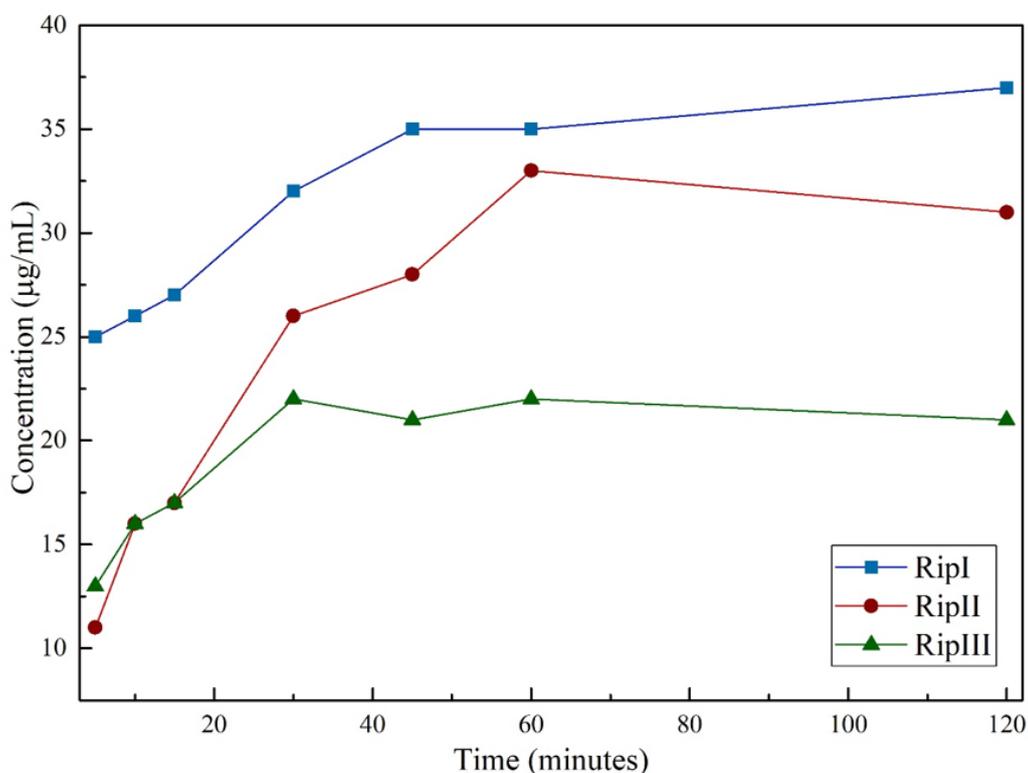
Figure 11 - Powder X-ray diffraction measurements of riparin III compared with the calculated pattern from III γ .



Solubility profiles

As a final characterization of the riparins investigated in this work, the corresponding solubility profiles were determined. The raw materials of riparins II and II were used. In the case of riparin I, since the raw material seems to be a polymorph mixture, it was recrystallized to obtain a pure form. Thus, the solubility profiles were recorded in the forms I α , II and III α . Since there are no predefined protocols for these compounds, a quantification method was developed based on UV/VIS spectra. The sampling wavelengths were defined by considering the corresponding absorption maxima.

Figure 12 - Solubility profiles of riparins I α , II and III α .



The solubility profiles of the three riparins exhibit similar a behavior (**Figure 12**). The concentration as a function time continuously raises reaching a saturation value after ~45 min. Comparing the concentrations after 120 min, the water solubility of riparins I α , II and III α are, respectively, 37, 31 and 21 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Thus, the three riparins have a poor water solubility being riparin I and II slightly more soluble than III. From the solid-state point of view, one could guess that riparin III could be the lower soluble one because it has the higher melting point. Furthermore, substitution at an *ortho* position hinders the interaction between the OH groups and the water molecule. Riparin II hold a hydroxyl at *ortho* position, whereas riparin III

present two hydroxyls, both at *ortho* position. Therefore, it is possible to predict that riparin I would have the higher solubility, followed by riparin II and, then, riparin III.

IV CONCLUSION

The crystalline structures of riparin I β , II and III α were successfully elucidated. These molecules presented critical differences between packing of their structures. The main difference between I β and I α from to other riparins is the hydroxyl substitutions, which creates intramolecular hydrogen bonds. These interactions are also responsible for conformational differences between riparins. Moreover, riparin I α holds π interactions that are also responsible for packing. In fact, all riparins hold these kinds of interactions.

The main difference between I β and I α occurs by the appearance of a second intermolecular hydrogen interaction for the polymorph I β and the appearance of more π bonds. This fact is responsible for a different packaging between the two polymorphs.

Through the HS study it was possible to conclude that despite the structural differences of riparins, these molecules have similar characteristics, which lead to similar physicochemical properties. This is established by analyzing the thermal and solubility profiles of these compounds.

In relation to the thermal profile, riparin II, in contrast to I β and III α , presented only an endothermic event related to the melting point of the sample. Contrary to expectations, riparin II had a lower melting point when compared to riparin I β . This can be explained by the appearance of a more stable polymorph before the melting process of I β . This becomes true when the thermal profile of I β is evaluate.

Riparin I β showed a more complex thermal profile which associated to PXRD, it was possible to identify three more polymorphs. The polymorph I β proved to be the most unstable, having an irreversible transition, while I α and I γ has a reversible transition, before melting point. Unfortunately, it was not possible to determine the crystal structures of polymorph I γ and I δ .

Comparably, riparin III exhibited two well defined events. The first one, an endothermic peak followed by an exothermic one, that can be described as a melting followed by a recrystallization. The last one is related to the melting point. Through PXRD, other polymorphs of riparin III were identified. Thus, the polymorphs were named as III α and III β .

The third polymorph, that was elucidated, was named as III γ . Other attempts to obtain polymorphs through crystal growth were unsuccessful.

Finally, the solubility profile of riparins was characterized. The riparin I α presented greater solubility, while riparin III presented the lowest. The solubility profile can be explained by the substitution of the hydroxyls in the *ortho* position in riparins II and III α , that impairs the solubility process, since the OH group has a steric hindrance. Furthermore, from the solid state point of view, riparin III could be the lower soluble one because it has the higher melting point.

A last important fact to be discussed is the polymorphic transition of riparin I α to riparin I γ ($T_{\text{onset}} = 38.4^\circ \text{C}$), which should be studied with caution, due it is a low temperature, similar to body temperature, and may affect pre-clinical studies, with influence on the safety and efficacy of the product.

Acknowledgment

This study was financed in part by the Brazilian agencies CAPES (Finance Code 001), FUNCAP (PPSUS and PRONEX PR2-0101-00006.01.00/15) and CNPq.

REFERENCES

1. Thakral, N.K., et al., *Applications of Powder X-Ray Diffraction in Small Molecule Pharmaceuticals: Achievements and Aspirations*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **107**(12): p. 2969-2982.
2. Matlinska, M.A., et al., *Capturing Elusive Polymorphs of Curcumin: A Structural Characterization and Computational Study*. Crystal Growth & Design, 2018. **18**(9): p. 5556-5563.
3. Ramos, R.R., et al., *Polymorphism and conformerism in chalcones*. CrystEngComm, 2016. **18**(12): p. 2144-2154.
4. Li, Y., et al., *Recrystallization of puerarin using the supercritical fluid antisolvent process*. Journal of Crystal Growth, 2012. **340**(1): p. 142-148.
5. Aitipamula, S., et al., *Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name?* Crystal Growth & Design, 2012. **12**(5): p. 2147-2152.
6. Censi, R. and P. Di Martino, *Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs*. Molecules, 2015. **20**(10): p. 18759-18776.
7. BARBOSA-FILHO, M.Y., OTTO R. GOTTLIER, RITA DE C. S. B. BARBOSA, ASTRÉA M. GIESBRECHT and CLAUDIA M. YOUNG, <*Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the fruits of Aniba riparia*>. Phytochemistry, 1997. **26**: p. 2615-2617.
8. de Sousa, F.C., et al., *Antianxiety effects of riparin I from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice*. Phytother Res, 2005. **19**(12): p. 1005-8.
9. Teixeira, C.P., et al., *Antidepressant-like effect of riparin II from Aniba riparia in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system*. Fundam Clin Pharmacol, 2013. **27**(2): p. 129-37.

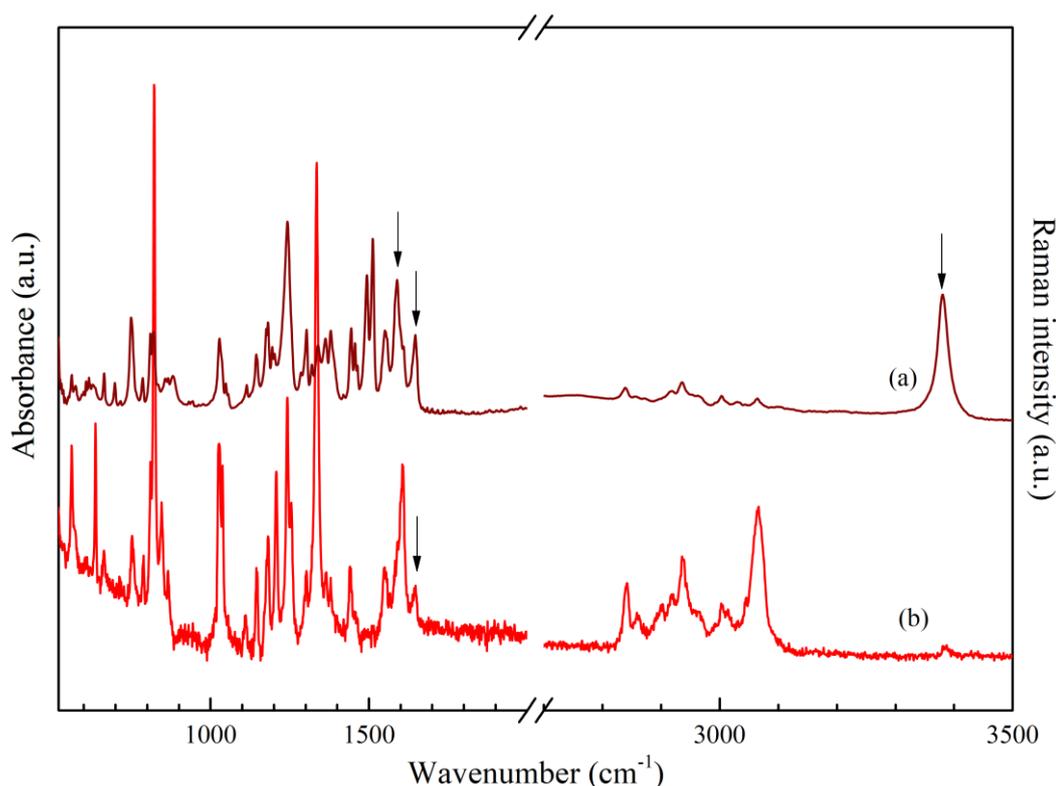
10. de Sousa, F.C., et al., *Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2014. **28**(1): p. 95-103.
11. Melo, C.T., et al., *Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013. **27**(1): p. 104-12.
12. Sousa, F.C., et al., *Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004. **78**(1): p. 27-33.
13. Marques, A.D.S., et al., *Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III*. *Journal of Molecular Structure*, 2005. **753**(1-3): p. 13-21.
14. de Carvalho, A.M., et al., *Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models*. *Chem Biol Interact*, 2013. **205**(3): p. 165-72.
15. de Moura, E., et al., *Solid-State Form Characterization of Riparin I*. *Molecules*, 2017. **22**(10): p. 1615.
16. Smith, A.J., et al., *Cocrystals of Quercetin with Improved Solubility and Oral Bioavailability*. *Molecular Pharmaceutics*, 2011. **8**(5): p. 1867-1876.
17. Katzung, B.G., Susan B. Masters, and Anthony J. Trevor., *Basic & clinical pharmacology*. 15th ed. ed. 2012, New York: McGraw-Hill Medica.
18. Hasegawa, K., *Introduction to single crystal X-ray analysis*. *The Rigaku Journal*, 2012. **28**: p. 5.
19. Lopalco, A., et al., *Pharmaceutical preformulation studies and paediatric oral formulations of sodium dichloroacetate*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019. **127**: p. 339-350.
20. Bruker, *APEX3, Saint+*. 2012.
21. Bruker, *SADABS*. 2001.
22. Dolomanov, O.V., et al., *OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program*. *Journal of Applied Crystallography*, 2009. **42**(2): p. 339-341.
23. Sheldrick, G.M., *Crystal structure refinement with SHELXL*. 2015. **71**: p. 6.
24. Sheldrick, G.M., *A short history of SHELX*. *Acta Crystallographica Section A*, 2007. **64**: p. 10.
25. Macrae, C.F., *Mercury: visualization and analysis of crystal structures*. *Journal of Applied Crystallography*, 2006: p. 453.
26. Pedretti, A., L. Villa, and G. Vistoli, *VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2004. **18**(3): p. 167-173.
27. Allen, F.H., *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*. *Acta Crystallographica*, 2002. **B58**: p. 8.
28. Parwani, A.V., *Expression of Glypican 3 in Ovarian and Extragonadal Germ Cell Tumors*. *Yearbook of Pathology and Laboratory Medicine*, 2009. **2009**: p. 93-95.
29. McKinnon, J.J., M.a. Spackman, and A.S. Mitchell, *Novel tools for visualizing and exploring intermolecular interactions in molecular crystals*. Vol. 60. 2004. 627-68.

4.2 Análise por espectroscopia vibracional

Os espectros de Raman e infravermelho da riparina II são apresentados na **Figura 13**. Os espectros, discutidos adiante, forneceram informações relevantes sobre a conformação molecular e sobre a estrutura da riparina II. A discussão vibracional da riparina II focou nas vibrações moleculares dos principais grupos funcionais, aqueles responsáveis pelas ligações intra e intermoleculares, e conseqüentemente, os responsáveis pelo empacotamento cristalino desta molécula.

As análises de espectroscopia no infravermelho das riparinas I e III estão reportadas na literatura, onde foram estudadas e discutidas por Marques *et al.*, 2005. Estes resultados foram utilizados aqui com o intuito de comparação para uma melhor compreensão dos resultados obtidos a partir da riparina II.

Figure 13 - Espectro infravermelho (a) e Raman (b) da riparina II.



Os espectros no infravermelho e Raman da riparina II são reletavieamente complexos, apresentando um número significativo de picos. Portanto, baseado no exposto anteriormente, apenas as vibrações moleculares dos grupos NH, C=O e OH foram analisadas. De acordo com a literatura, as frequências entre o intervalo de 1680-1630 cm^{-1} estão relacionadas com a banda de vibração C=O em amidas secundárias. A riparina II apresenta essa frequência em

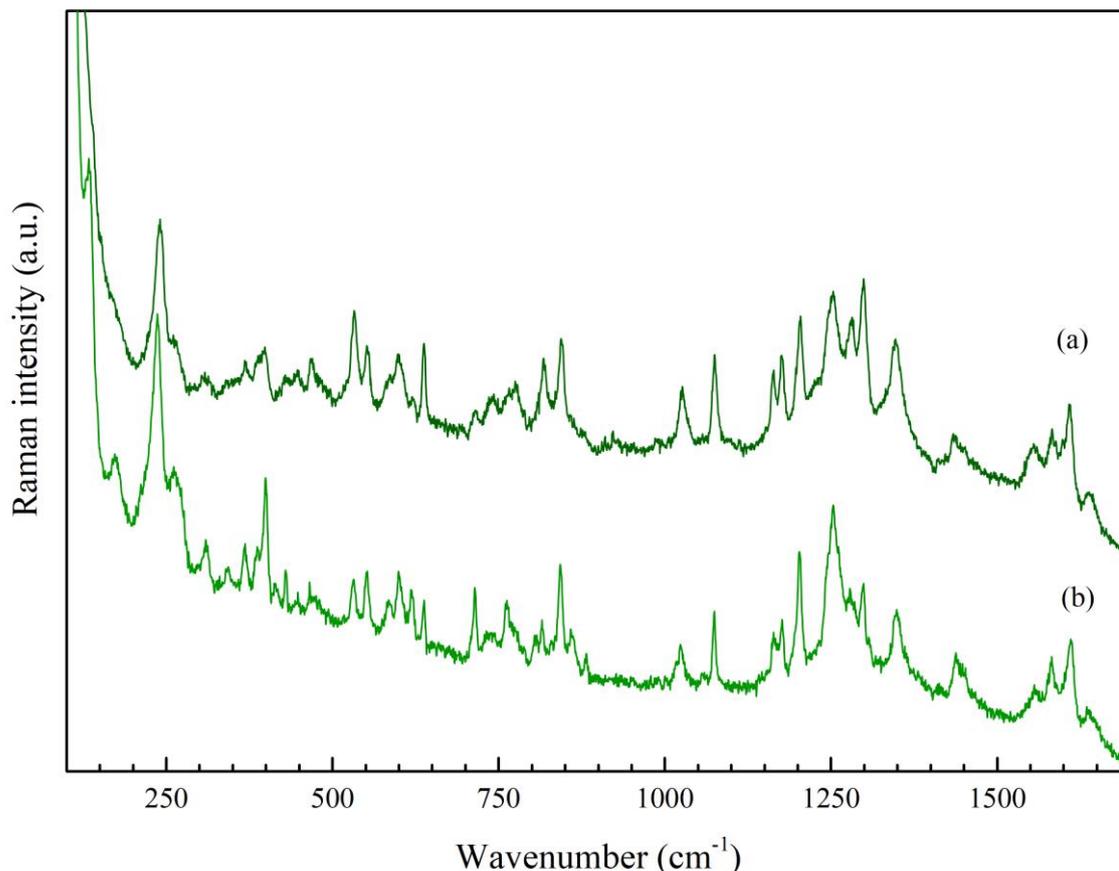
aproximadamente 1644 cm^{-1} . Marques *et al.* indica a frequência em 1638 cm^{-1} para riparina I α , corroborando com o proposto por este estudo.

O intervalo de frequências de vibração em $1566\text{-}1474\text{ cm}^{-1}$ refere-se aos modos de NH em amidas secundárias (PAIVA *et al.*, 2015). Os átomos de nitrogênio das moléculas A e B da riparina II são responsáveis pelas interações de hidrogênio intermoleculares ($\text{N8A}'\text{H8A}'\cdots\text{O2A}$ e $\text{N8B}'\text{H8B}'\cdots\text{O2B}$), apresentando uma frequência em aproximadamente 1511 cm^{-1} . Para riparina I e III, Marques *et al.* indicou essas frequências em 3325 cm^{-1} e 3346 cm^{-1} , respectivamente. Essas diferenças podem ser explicadas pela uma torção no átomo de nitrogênio, causada pela forte interação intramolecular $\text{O2H2}\cdots\text{O7}$ da riparina II, causando uma vibração de dobramento para este composto, enquanto as riparinas I e III possuem vibrações de estiramento (PAIVA *et al.*, 2015).

Por fim, Marques *et al.* analisou as bandas de vibração para riparina III, afirmando que a frequência em 3463 cm^{-1} corresponde à região OH devido à ligação de hidrogênio com C=O, que não é representada na riparina I, devido à falta deste substituinte. Da mesma forma, a riparina II apresenta uma frequência em 3379 cm^{-1} .

A **Figura 14** apresenta os espectros Raman da riparina III α e III γ . A análise foi realizada com o intuito de avaliar as diferenças vibracionais entre os dois polimorfos discutidos durante a análise por difração de raios-X de pó. Entretanto ao analisar ambos espectros apenas poucas diferenças foram observadas.

Figure 14 - Espectra Raman da riparina III α (a) e III γ (b).

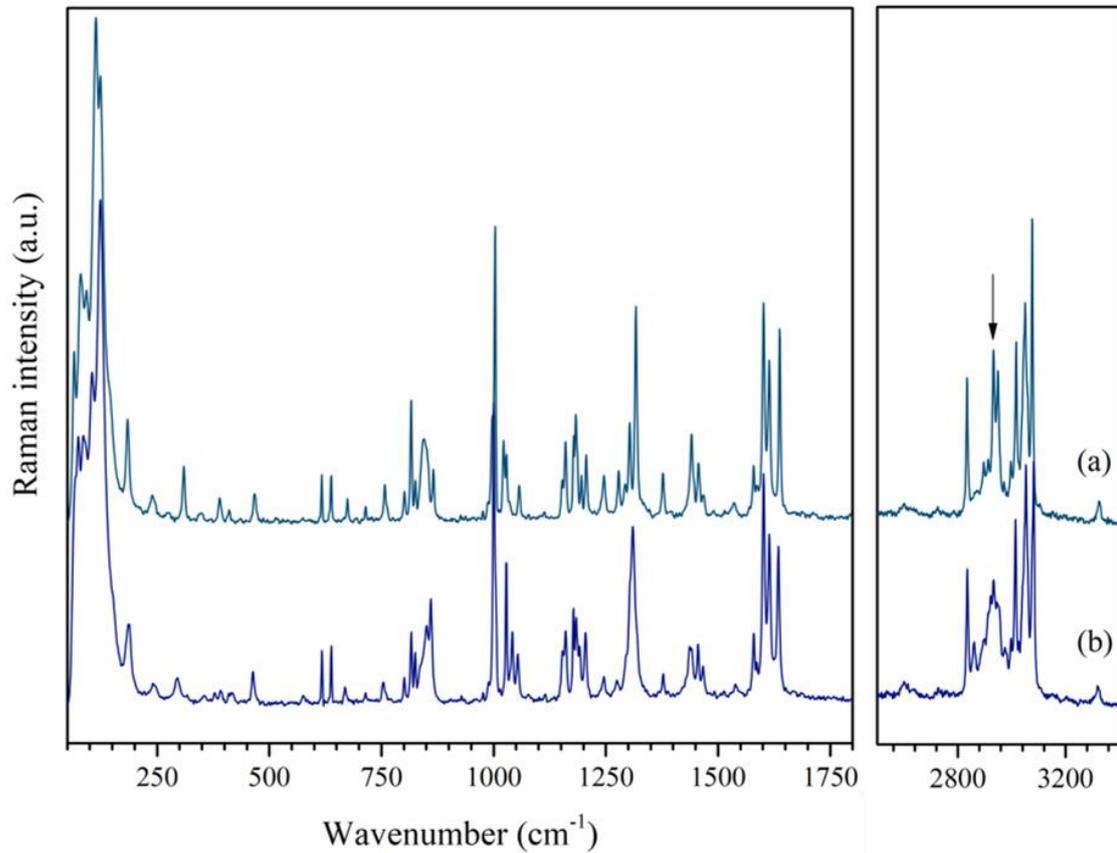


Essas diferenças acontecem entre os intervalos de frequências 300 – 500 cm^{-1} e entre 700 – 900 cm^{-1} . Como não foi possível elucidar a estrutura cristalina do polimorfo III α não é possível afirmar que essas pequenas diferenças entre os espectros Raman ocorram devido a uma semelhança estrutural entre os dois polimorfos da riparina III.

A **Figura 15**, por sua vez, apresenta os espectros Raman dos polimorfos I α e I β da riparina I. De maneira similar a riparina III, os dados obtidos através da análise vibracional por Raman são bastantes similares, apresentando pequenas diferenças em determinadas frequências. É importante ressaltar que o polimorfo I α cristaliza em um sistema cristalino triclinico, enquanto o polimorfo I β cristaliza em um sistema cristalino monoclinico. Entretanto, ainda que haja diferenças nos parâmetros de cela entre os dois polimorfos, a análise vibracional se mostrou bastante semelhante, indicando poucas diferenças.

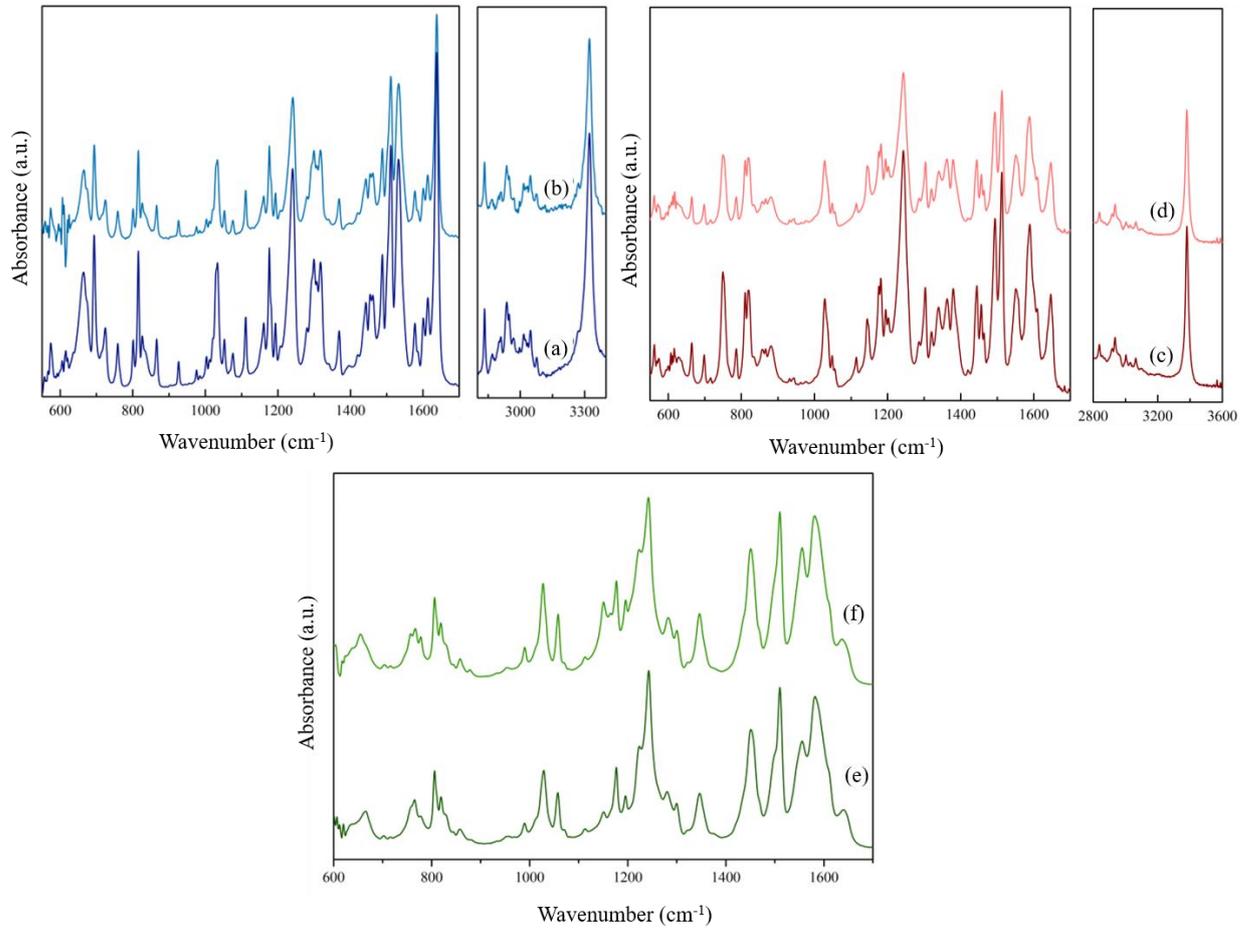
A principal diferença entre os dois espectros Raman ocorre na banda de vibração entre 2800-3000 cm^{-1} , as quais estão relacionadas aos modos de vibração CH. De fato, essas mudanças entre os dois polimorfos podem ser ocasionadas devido a uma diferença das ligações CH $\cdots\pi$, acarretando nessas pequenas diferenças na frequência 2935 cm^{-1} .

Figure 15 - Espectros Raman da riparina I α (a) e I β (b).



Os espectros de absorção no infravermelho apresentados na **Figura 16**, ilustram o material utilizado para os ensaios de solubilidade em comparação com o sólido remanescente das riparinas I, II e III após o estudo. Através destes gráficos é possível observar que não houve nenhuma mudança significativa das substâncias durante a realização do experimento.

Figure 16 – Espectros infravermelho das riparinas I α (a), II (c) e III (e) antes do ensaio de solubilidade e espectros infravermelhos das riparinas I α (b), II (d) e III (f) após o ensaio.



5 CONCLUSÕES GERAIS

As estruturas cristalinas das riparinas II e III foram elucidadas com sucesso. A riparina II apresentou um sistema cristalino monoclinico, grupo espacial Cc , $a = 6.452(2) \text{ \AA}$, $b = 29.288(10) \text{ \AA}$ e $c = 14.875(8) \text{ \AA}$, enquanto a riparina III apesar de também apresentar um sistema cristalino monoclinico, cristalizou em um grupo espacial Pc , $a = 11,6479(3) \text{ \AA}$, $b = 4,8610(10) \text{ \AA}$ e $c = 13,4222(3)$. Também foi possível elucidar a estrutura cristalina do polimorfo da riparina I, nomeado de riparina I β , que cristaliza em um sistema cristalino monoclinico, com grupo espacial $P2_1/n$, e os seguintes parâmetros de cela: $a = 8.0074(9) \text{ \AA}$; $b = 5.1466(6) \text{ \AA}$; $c = 32.075(4) \text{ \AA}$; $\beta = 96.538(4)^\circ$.

Os polimorfos I β e I α , reportado pela literatura, possuem diferenças devido ao surgimento de uma segunda interação de hidrogênio intermolecular no polimorfo I β e o aparecimento de mais ligações $CH\cdots\pi$, tornando-se responsáveis por uma diferença conformacional e de empacotamento dos dois polimorfos.

A principal diferença entre os polimorfos da riparina I e das demais riparinas acontece devido a substituição dos grupos hidroxilas no anel aromático. Esta substituição dá lugar a interações intramoleculares, que são as principais responsáveis pelas mudanças conformacionais das riparinas II e III. A presença dessas ligações nas riparinas II e III também foram responsáveis por causar uma torção, indicando diferentes modos de vibração para NH na riparina II. Além disso, todas as riparinas apresentaram ligações $CH\cdots\pi$, também responsáveis pela diferença de empacotamento destas moléculas.

O estudo da superfície de Hirshfeld apontou que apesar das diferenças estruturais entre as moléculas das riparinas, estas apresentaram características similares, indicando possíveis semelhanças nas propriedades físico-químicas. Isso se tornou evidente quando os estudos térmicos e de solubilidade das riparinas foram analisados.

O estudo térmico das riparinas demonstrou resultados relevantes para o estudo destas três moléculas. A riparina II, ao contrário das demais riparinas, apresentou apenas um evento endotérmico, responsável pelo ponto de fusão desta molécula, não apresentando nenhuma transição polimórfica. A riparina II, ainda, apresentou um ponto de fusão menor que o da riparina I, que pode ser explicado pelo surgimento de um polimorfo mais estável desta molécula antes do processo de fusão.

De fato, quando avaliado o perfil térmico da riparina I β , foi possível identificar outros polimorfos desse composto. O polimorfo I β mostrou-se ser o polimorfo mais instável, o qual possui uma transição irreversível, enquanto os polimorfos I α e I γ possuem uma transição

reversível. Esta discussão é sustentada pelas entalpias de transição. Infelizmente, não foi possível elucidar as estruturas cristalinas dos polimorfos I γ e I δ . Outras técnicas foram aplicadas com o intuito de obtenção de outras formas polimórficas, não havendo sucesso.

De maneira similar, a riparina III exibiu dois eventos bem definidos. O primeiro, um pico endotérmico seguido por um exotérmico, que pode ser descrito como uma fusão seguida por uma recristalização. O último está relacionado ao ponto de fusão. Através do PXRD, foi possível avaliar estes eventos. Os polimorfos identificados foram nomeados de III α e III β (120 °C). O terceiro polimorfo, elucidado por este estudo, foi chamado de III γ . Não foi possível a obtenção de novas formas sólidas polimórficas através de mais ensaios de cristalização.

Os polimorfos I β e I α foram submetidos a análise por espectroscopia vibracional Raman, não havendo grandes diferenças entre seus espectros. A mesma análise foi realizada para os polimorfos III α e III γ , também não sendo possível visualizar grandes diferenças entre as duas estruturas. Isto pode ocorrer devido às semelhanças estruturais entre esses polimorfos.

Por fim, o perfil de solubilidade das riparinas foi estudado. A riparina I α apresentou maior solubilidade, enquanto a riparina III α apresentou a menor. O perfil de solubilidade pode ser explicado pela substituição das hidroxilas na posição *orto* nas riparinas II e III, que dificultam o processo de solubilização, uma vez que o grupo OH possui um impedimento estérico. Para garantir que não houve transição sólida após a determinação da solubilidade, o material sólido remanescente foi submetido a uma análise por espectroscopia no infravermelho, não havendo nenhuma diferença entre os espectros.

REFERÊNCIAS

ALMARSSON, O.; ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? **Chem. Commun.**, n. 17, p. 1889–1896, 2004.

ARAÚJO F. L. O., MELO C. T. V., ROCHA N. F. M, MOURA B. A., LEITE C. P., AMARAL J. F., BARBOSA-FILHO J.M., GUTIERREZ S. J. C., VASCONCELOS, S. M. M., VIANA, G. S. B, SOUSA F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyltyramine (riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 380, pp. 337-344. 2012.

AULTON, Michel E.; TAYLOR, Kevin M. G.. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. São Paulo: Elsevier, 2016. 1713 p.

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.P.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, C.M. Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**. v. 26, pp. 2615-2617, 1987.

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M; GOTTLIEB, O.R. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. **Ver. Latinoamr. Quim.**, v. 21, p. 5-7, 1990.

BIRADHA, Kumar et al. Recent Developments in Crystal Engineering. **Crystal Growth & Design**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.875-886, 6 abr. 2011.

BLESSY, M et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.159-165, jun. 2014.

BRITTAIN, H. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York: 1999.

BROG, Jean-pierre et al. Polymorphism, what it is and how to identify it: a systematic review. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 3, n. 38, p.16905-16931, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC).

BRUKER, **APEX3**, Saint+. 2012.

BRUKER, **SADABS**. 2001.

CARVALHO, A. M. R. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (O-Metil-N-2-Hidroxi-Benzoil Tiramina) em modelos experimentais**. 91 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) –Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2011.

CASTELO-BRANCO, U.J.V. **Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de N-(2,6-dihydroxibenzoyl)-tyramine**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1992.

CATÃO, R.M.R; BARBOSA-FILHO, J.M; GUTIERREZ, S.J.C; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V; ARRUDA, T.A./ ANTUNES, R.M.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de**

riparinas sobre cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli multiresistentes. RABC, v. 34 (4), pp. 247-249, 2005.

CENSI, Roberta; MARTINO, Piera di. Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.18759-18776, 15 out. 2015. MDPI AG.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

DE CARVALHO, A.M., et al., Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem Biol Interact**, 2013. **205**(3): p. 165-72.

DE SOUSA F.C.F, Monteiro A.P., Melo C.T.V et al. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia*(Ness) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytother. Res.** v. 19 1005-1008, 2005.

DE SOUSA F.C.F., LEITE C.P., MELO C.T.V., ARAÚJO F.L.O., GUTIERREZ S.J.C, BARBOSA-FILHO J.M., FONTELES M.M.F., VASCONSELOS S.M.M., VIANA G.S.B. Evaluation of Effects of N-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia*(Nees) Mez (Lauraceae) in Anxiety Models in Mice. **Biol Pharm Bull.** v. 30, pp. 1212-1216, 2007.

DE SOUSA, F.C., et al., Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, 2014. **28**(1): p. 95-103.

DE SOUSA, F.C.F.; MELLO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.M.; GUTIERREZ, S.J.C; PEREIRA, B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) in mice. **PharmacolBiochem Be.** v. 78, pp. 27-33, 2004.

DESIRAJU, G. R. (2017). "Crystal engineering: structure, property and beyond." **IUCrJ** **4**(Pt 6): 710-711.

DESIRAJU, G. R. Designer crystals: intermolecular interactions, network structures and supramolecular synthons. **Chem. Commun.**, n. 16, p. 1475–1482, 1997.

DESIRAJU, G. R. Hydrogen bridges in crystal engineering: interactions without borders. **Accounts of chemical research**, v. 35, n. 7, p. 565-73, 2002.

DESIRAJU, G. R. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering - A New Organic-Synthesis. **Angewandte Chemie-International Edition in English** **34**, 2311-2327 (1995).

DIAS, M.L. **Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutamatérgicos e do óxido nítrico.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

DOLOMANOV, O.V., et al., OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. **Journal of Applied Crystallography**, 2009. **42**(2): p. 339-341.

DOUROUMIS, Dennis; ROSS, Steven A.; NOKHODCHI, Ali. Advanced methodologies for cocrystal synthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 117, p.178-195, ago. 2017.

FLORENCE, Alexander T.; ATTWOOD, David. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

HASEGAWA, K. **The Rigaku Journal**, **28** (1), 2012, 14-18.

HEALY, A. M., et al. "Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals." **Adv Drug Deliv Rev** **117**: 25-46, 2017.

HIGUCHI, T. and CONNORS, K.A., **Phase-solubility techniques. Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, 1965. 4: 117–212.

HOFER, O.; GREGER, H.; ROBIEN, W.; WERNER, A. ¹³C NMR and ¹H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkaloids with cyclic amide moieties: amides from *Achillea falcata*. **Tetrahedron Lett**, v. 42, p. 2707–2716, 1986.

KATZUNG, B.G., Susan B. Masters, and Anthony J. Trevor., **Basic & clinical pharmacology**. 15th ed. ed. 2012, New York: McGraw-Hill Medica.

LACHMAN, Leon; LIEBERMAN, Herbert A.; KANIG, Joseph L.. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1517 p.

LI, Y. et al. Recrystallization of puerarin using the supercritical fluid antisolvent process. **Journal Of Crystal Growth**, [s.l.], v. 340, n. 1, p.142-148, fev. 2012. Elsevier BV

LIAO, Y. Y. et al. Temperature dependent phonon Raman scattering of highly a-axis oriented CoFe₂O₄ inverse spinel ferromagnetic films grown by pulsed laser deposition. **Applied Physics Letters**, [s.l.], v. 100, n. 7, p.071905-071909, 13 fev. 2012. AIP Publishing

LONG, D. A., *Effect The Raman Effect A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, 1a Ed., vol. 8. Chichester: JOHN WILEY & SONS LTD, 2002.

LOPALCO, Antonio et al. Pharmaceutical preformulation studies and paediatric oral formulations of sodium dichloroacetate. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 127, p.339-350, jan. 2019.

LOPES, Iardja Stéfane et al. Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 120, p.33-42, nov. 2018.

MACRAE, C.F., Mercury: visualization and analysis of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, 2006: p. 453.

MALAMATARI, Maria et al. Experimental cocrystal screening and solution based scale-up cocrystallization methods. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 117, p.162-177, ago. 2017.

MARQUES, A.D.S., et al., Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III. **Journal of Molecular Structure**, 2005. **753**(1-3): p. 13-21.

MATLINSKA, Maria A. et al. Capturing Elusive Polymorphs of Curcumin: A Structural Characterization and Computational Study. **Crystal Growth & Design**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.5556-5563, 9 ago. 2018. American Chemical Society (ACS).

MCKINNON, J. J., Spackman, M. a. & Mitchell, A. S. (2004). **Novel tools for visualizing and exploring intermolecular interactions in molecular crystals**.

MELO, C.T., et al., Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, 2013. **27**(1): p. 104-12.

MENCZEL, J.D.; PRIME, R.B. **Thermal analysis of polymers. Fundamentals and applications**. Canadá: John Wiley & Sons, 2009. 699 p.

MOURA, Elisana de et al. Solid-State Form Characterization of Riparin I. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1615-1621, 9 out. 2017. MDPI AG.

MUKHERJEE, A. et al. Synthon identification in co-crystals and polymorphs with IR spectroscopy. Primary amides as a case study. **CrystEngComm**, v. 15, n. 23, p. 4640- 4654, 2013.

NEWMAN, A. Specialized Solid Form Screening Techniques. **Organic Process Research & Development**, v. 17, n. 3, p. 457-471, 2013.

NEWMAN, A. W.; BYRN, S. R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 898-905 (2003).

PAIVA, Donald L. et al. **Introdução À Espectroscopia**: Tradução da 5ª Edição Americana. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 733 p.

PARWANI, A. V. (2009). Yearbook of Pathology and Laboratory Medicine 2009, 93-95.

PEDRETTI, A., L. Villa, and G. Vistoli, VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 2004. **18**(3): p. 167-173.

RAMOS, Rafael Rodrigues et al. Polymorphism and conformerism in chalcones. **Crystengcomm**, [s.l.], v. 18, n. 12, p.2144-2154, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC).

SHELDRICK, G.M., A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A**, 2007. **64**: p. 10.

SHELDRIK, G.M., **Crystal structure refinement with SHELXL**. 2015. **71**: p. 6.

SIGFRIDSSON, Kalle; LINDSJÖ, Martin; PAULSSON, Stefan. The crystalline salt form of a selected candidate drug showed photo-, thermal- and humidity induced form transitions. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 128, p.128-136, fev. 2019. Elsevier BV.

SILVEIRA, Alethéia Lacerda da. **TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DOS ANÁLOGOS DAS RIPARINAS I, II E III UTILIZANDO MODELOS IN VITRO**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. P. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SMITH, A.J., et al., Cocrystals of Quercetin with Improved Solubility and Oral Bioavailability. **Molecular Pharmaceutics**, 2011. **8**(5): p. 1867-1876.

TEXEIRA, C.P., et al., Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam Clin Pharmacol**, 2013. **27**(2): p. 129-37.

THAKRAL, N.K., *et al.*, Applications of Powder X-Ray Diffraction in Small Molecule Pharmaceuticals: Achievements and Aspirations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018. **107**(12): p. 2969-2982.

THAKUR, T. S., et al. (2015). "Crystal structure and prediction." **Annu Rev Phys Chem** **66**: 21-42.

TILLEY, Richard J. D.. **Cristalografia**: cristais e estruturas cristalinas. São Paulo: Oficina de Textos, 2014.

VASCONCELOS, Auriana S. et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.394-403, 24 abr. 2015.

ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of diamondoid networks. **Chem. Soc. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 283, 1994.