



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudis d'Enginyeria Cristal·lina i Polimorfisme dels compostos nutraceutics Pterostilbé, Ubiquinol i Vitamina D3

Lidia Bofill Herrera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**Estudis d'Enginyeria Cristal·lina i Polimorfisme dels
compostos nutracèutics Pterostilbé, Ubiquinol i
Vitamina D₃**

Lidia Bofill Herrera, 2021

Estudis d'Enginyeria Cristal·lina i Polimorfisme dels compostos nutracèutics Pterostilbé, Ubiquinol i Vitamina D₃.

Memòria presentada per Lidia Bofill Herrera per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Director
Rafel Prohens López

Doctoranda
Lidia Bofill Herrera

Tutora
Yolanda Carlota Cajal Visa

Barcelona, 2021

AGRAÏMENTS

La realització de la tesi doctoral ha suposat una etapa enriquidora tant en l'àmbit professional com en el personal. No tan sols ha estat important la meva dedicació sinó també la de totes aquelles persones que m'han recolzat.

En primer lloc agrair al meu director de tesi, en Dr. Rafel Prohens, la confiança dipositada en mi per realitzar aquesta tesi i obsequiar-me amb tot el seu coneixement i experiència.

En segon lloc, al Fernando Barrera, per oferir-me l'oportunitat laboral de formar part de l'equip de CIRCE SL i poder emprar els projectes de l'empresa en aquesta tesi.

Donar les gràcies als meus companys de feina Dafne i Rafa pel seu recolzament i consells.

En resum, agrair-vos a tots el que hagi format part directa d'aquesta tesis.

Agrair també a la col·laboració del Prof. Toni Frontera de la Universitat de les Illes Balears pels càlculs DFT realitzats, a la Mercè Font-Bardia per la resolució de les estructures cristal·lines, a la Dra. Clara Ràfols pels estudis de solubilitat i velocitats de dissolució i al Dr. Joan Albertí per els estudis de farmacocinètica realitzats.

Per concloure, al més important la meva família. A la meva parella Xavi, que ha estat sempre el meu costat sent un dels meus grans suports.

A la meva mare i al Cristian per ensenyar-me que rendir-me no és una opció, per ser un exemple, per estimar-me i estar sempre amb mi quan ho he necessitat. Als meus germans, Cristina i Javi, quina sort tenir-vos i haver crescut amb vosaltres. Als meus nebots Jan i Martina, per donar-me tant d'amor sense esperar res a canvi, us estimo moltíssim. Sense tots vosaltres això no hagués estat possible. Finalment dedicar en especial aquest treball al meu àngel, t'estimo papa.

ACRÒNIMS

API	Principi actiu farmacèutic
Gas-PES	Energia potencial en fase gasosa
$\Delta\theta_{\max}$	Angle de torsió màxima
RMSD	Desviació quadràtica mitjana
ΔC_p	Variació de la Capacitat calorífica
ΔmH_i	Entalpia de fusió
G_i	Energia de Gibbs
P_f	Punt de fusió
T_r	Temperatura de transició
GIT	Tracte gastrointestinal
DRX	Difracció de raigs X
PXRD	Difracció de raigs X de pols
TGA	Termogravimetria
DSC	Calorimetria diferencial d'escombratge
SSIP	Punts d'interacció específics de superfícies moleculars
MEPS	Superfícies de potencial electrostàtic molecular (Molecular Electrostatic Potential Surface)
E_{\min}	Energia mínima
E_{\max}	Energia màxima
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EAFUS	<i>Everything Added to Food in the United States</i>

GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
DFT	Teoria del funcional de la densitat (<i>Density Functional Theory</i>)
E_{latt}	Energia reticular (<i>Lattice Energy</i>)
CSP	Predicció d'estructura cristal·lina (<i>Crystal Structure Prediction</i>)
QTAIM	<i>Quantum theory of atoms in molecules</i>
NCI	Interaccions no covalents (<i>Non Covalent Interactions</i>)
RDG	Densitat de gradient reduït
W (r)	Funció de pes
d_{norm}	Distància normalitzada
Kps	Producte de solubilitat
FASSIF	Medi/ dissolució que simula els fluids intestinals secretats en condicions de règim de dejuni
FESSIF	Medi/dissolució que simula els fluids intestinals secretats després de alimentar-se
UV	Ultraviolat visible
MS	Espectroscòpia de masses
D-PAS	<i>Dip Probe Absorption Spectroscopy</i>
AUC	Àrea sota la corba
ACN	Acetonitril
C_{max}	Concentració plasmàtica màxima del fàrmac
T_{max}	Temps màxim en assolir la concentració plasmàtica màxima del fàrmac

ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
D65/ID65	Llum de dia estàndard
BFDH	Mètode de <i>Bravais-Fridel-Donnay-Harker</i>
DG	<i>Drop-grinding</i>
RC	<i>Reaction Crystallization</i>
SY	<i>Slurry</i>
DVS	<i>Dynamic vapor sorption</i>
SXRD	Difracció de raigs X de monocristall
1,4-DMP	1,4-dimetilpiperazina
2,3,5- TMP	2,3,5-trimetilpirazina
TCTD	1,4,8,11-tetrazaciclohexandecà
DABCO	1,4-diazabiclo [2.2.2] octà

SUMARI

La salut ha estat sempre una de les principals preocupacions de la societat, i més encara amb la situació de pandèmia actual produïda pel virus (SARS-CoV-2) s'és conscient de que portar un estil de vida amb bons hàbits alimentaris influeix directament en la salut, existint nombroses investigacions que així ho demostren. Per tant, l'adquisició de nutrients adequats juga un paper vital en el manteniment de la funció normal del cos i la prevenció de malalties, sobretot aquelles que estan relacionades amb l'envelliment (malalties cardiovasculars, neurodegeneratives, diabetis tipus II, així com diversos tipus de càncer).

És per això que la demanda d'aliments funcionals que promouen la salut ha rebut una àmplia atenció, tant entre professionals de la salut com entre el públic en general, emergint així nous conceptes com els nutracèutics.

El terme nutracèutic combina dues paraules "nutrient" i "farmacèutic" i va ser introduït per Stephen DeFelice, metge endocrinòleg, l'any 1989. DeFelice defineix el compost nutracèutic com "aquell aliment o part d'un aliment que proporciona un benefici en la salut, incloent-hi la prevenció o el tractament d'una malaltia".

Desafortunadament, la majoria d'aquests compostos solen presentar propietats fisicoquímiques limitants, com ara una baixa biodisponibilitat oral, baixa solubilitat i en alguns casos baixa estabilitat química.

El pterostilbé, l'ubiquinol i la vitamina D₃ són tres compostos nutracèutics coneguts per les seves importants funcions bioquímiques i nutricionals. Lamentablement no sempre es poden aprofitar completament els seus potencials beneficis ja que presenten una baixa biodisponibilitat oral en el cas del pterostilbé i inestabilitat química com en els casos de l'ubiquinol i la vitamina D₃.

En la present tesi doctoral es descriu el descobriment, la síntesi i la caracterització de noves formes sòlides cristal·lines, en particular cocristalls amb millora de les propietats fisicoquímiques d'aquests tres compostos nutracèutics. Els cocristalls presenten avantatges respecte als compostos de partida en quant a biodisponibilitat i estabilitat i han demostrat ser alternatives amb potencial aplicabilitat industrial.

Per a aquest estudi es van utilitzar diferents tècniques experimentals com ara la mòlta, la suspensió, la cristal·lització i l'evaporació lenta. Dels més de 1.500 experiments de cribatge, s'han obtingut 25 noves formes cristal·lines, entre ells polimorfs i cocristalls dels tres compostos nutracèutics. Les estructures cristal·lines d'11 de les noves formes han estat resoltes i analitzades en detall. En particular, dues d'elles s'han resolt mitjançant mètodes d'espai directe amb dades de difracció de raigs X de pols. A més, s'han utilitzat diverses tècniques computacionals, com ara l'anàlisi de les interaccions intermoleculars, el càlcul de l'energia reticular, la construcció de superfícies de potencial electrostàtic molecular (MEP) i superfícies de Hirshfeld per tal d'aprofundir en el coneixement a nivell cristal·logràfic i supramolecular dels 3 principis actius nutracèutics.

SUMARIO

La salud ha sido siempre una de las principales preocupaciones de la sociedad, y más aún con la situación de pandemia actual producida por el virus (SARS-CoV-2) se es consciente de que llevar un estilo de vida con buenos hábitos alimentarios influye directamente en la salud, existiendo numerosas investigaciones que así lo demuestran. Por lo tanto la adquisición de los nutrientes adecuados juega un papel vital en el mantenimiento de la función normal del cuerpo y la prevención de enfermedades, sobre todo aquellas que están relacionadas con el envejecimiento (enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo II, así como varios tipos de cáncer).

Es por ello que la demanda de alimentos funcionales que promueven la salud ha recibido una amplia atención, tanto entre profesionales de la salud como entre el público en general, emergiendo así nuevos conceptos como los nutracéuticos.

El término nutracéutico combina dos palabras "nutriente" y "farmacéutico" y fue introducido por Stephen DeFelice, médico endocrinólogo, en el año 1989. DeFelice define el compuesto nutracéutico como "aquel alimento o parte de un alimento que proporciona un beneficio en la salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad".

Desafortunadamente, la mayoría de estos compuestos suelen presentar propiedades fisicoquímicas limitantes, tales como una baja biodisponibilidad oral, baja solubilidad y en algunos casos baja estabilidad química.

El pterostilbeno, el ubiquinol y la vitamina D₃ son tres compuestos nutracéuticos conocidos por sus importantes funciones bioquímicas y nutricionales. Lamentablemente no siempre se pueden aprovechar completamente sus potenciales beneficios ya que presentan una baja biodisponibilidad oral en el caso del pterostilbeno e inestabilidad química en el caso del ubiquinol y la vitamina D₃.

En la presente tesis doctoral se describe el descubrimiento, la síntesis y la caracterización de nuevas formas sólidas cristalinas, en particular cocristales, con mejoras en las propiedades fisicoquímicas de estos tres compuestos nutracéuticos. Los cocristales presentan ventajas respecto a los compuestos de partida en cuanto a

biodisponibilidad y estabilidad y han demostrado ser alternativas con potencial aplicabilidad industrial.

Para este estudio se utilizaron diferentes técnicas experimentales tales como la molienda, la suspensión, la cristalización y la evaporación lenta. De los más de 1.500 experimentos de cribado, se han obtenido 25 nuevas formas cristalinas, entre ellas polimorfos y cocristales de los tres compuestos nutraceuticos. Las estructuras cristalinas de 11 de las nuevas formas han sido resueltas y analizadas en detalle. En particular, dos de ellas se han resuelto mediante métodos de espacio directo a partir de datos de difracción de rayos X de polvo. Además, se han utilizado diversas técnicas computacionales tales como el análisis de las interacciones intermoleculares, el cálculo de la energía reticular, la construcción de superficies de potencial electrostático molecular (MEP) y superficies de Hirshfeld con el fin de profundizar en el conocimiento a nivel cristalográfico y supramolecular de los 3 principios activos nutraceuticos.

SUMMARY

Health has always been one of the main concerns of society, and even more so with the current pandemic situation caused by the virus (SARS-CoV-2). It is well accepted that following a lifestyle with good eating habits directly influences health, as numerous studies prove. Therefore, acquisition of the right nutrients plays a vital role in maintaining normal body function and preventing disease, especially those related to aging (cardiovascular disease, neurodegenerative diseases, type II diabetes, as well as different types of cancer).

This is why the demand for functional foods that promote health has received widespread attention, both among health professionals and the general public, thus emerging new concepts such as nutraceuticals.

The term nutraceutical, combining two words "nutrient" and "pharmaceutical", was introduced by Stephen DeFelice, an endocrinologist, in 1989. DeFelice defines the nutraceutical compound as "food or part of a food that provides a benefit in the health, including the prevention or treatment of a disease".

Unfortunately, most of these compounds tend to show limiting physicochemical properties, such as low oral bioavailability, low solubility, and in some cases low chemical stability.

Pterostilbene, ubiquinol and vitamin D₃ are three nutraceutical compounds known for their important biochemical and nutritional functions. Unfortunately, their potential benefits cannot always be fully exploited as they have low oral bioavailability in the case of pterostilbene and chemical instability in the case of ubiquinol and vitamin D₃. The present PhD thesis describes the discovery, synthesis and characterization of new crystalline solid forms, in particular cocrystals with improved physicochemical properties of these three nutraceutical compounds. Cocrystals can show certain advantages over parent compounds in terms of bioavailability and stability and have proven to be alternatives with potential industrial applicability.

Different experimental techniques such as grinding, slurry, reaction crystallization and solution crystallization were used for this study. From more than 1,500 screening experiments, 25 new crystalline forms have been discovered, including polymorphs and cocrystals of the three nutraceutical compounds. The crystal structures of 11 out of the

new forms have been determined and analyzed in detail. In particular, two of them have been solved by means of direct space methods from powder X-ray diffraction data. In addition, several computational techniques have been used, such as the analysis of intermolecular interactions, the calculation of lattice energies, molecular electrostatic potential surfaces (MEPS), and Hirshfeld surfaces in order to get deeper insight and knowledge at crystallographic and supramolecular level of the 3 active nutraceutical principles.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	
1.1 Compostos nutracèutics	1
1.2 Formes sòlides dels principis actius	3
1.2.1. Polimorfs	3
1.2.2. Hidrats/Solvats	8
1.2.3. Sals	9
1.2.4. Amorfs i coamorphs	10
1.2.5. Cocristalls	10
1.3. Enginyeria cristal·lina i virtual cocrystal screening	12
1.4. Tècniques experimentals per a la síntesi de cocristalls	15
1.5. El fenomen de la cristal·lització	18
1.6. Resolució d'estructures cristal·lines mitjançant difracció de raigs X de pols.	20
1.7. Estudi de les interaccions intermoleculares.	22
1.8. Propietats fisicoquímiques	30
1.8.1. Solubilitat	30
1.8.2. Biodisponibilitat	33
1.8.3. Estabilitat	36
1.9. Propietat intel·lectual	38
2. OBJECTIUS	43
3. RESULTATS	47
4. DISCUSSIÓ	115
4.1. Pterostilbé	119
4.1.1. Article 1: Hydrogen bond polarization overcomes unfavorable packing in the most stable high Z' polymorph of Pterostilbene	121
4.1.2. Article 2: A late appearing polymorph of nutraceutical Pterostilbene	126
4.1.3. Article 3: Novel Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene	133
4.1.4. Article 4: DFT Analysis of uncommon $\pi\cdots\text{H}$ -bond array interaction in a new Pterostilbene/Theophylline Cocrystal	140
4.2. Ubiquinol	153
4.2.1. Article 5: New Cocrystal of Ubiquinol with High Stability to Oxidation	155
4.3. Vitamina D ₃	161
4.3.2. Article 6: A New and Highly Stable Cocrystal of Vitamin D3 for its use in enhanced food supplements	162
5. CONCLUSIONS	171
6. BIBLIOGRAFIA	175
7. APÈNDIX	191
7.1. Material suplementari Article 1	191
7.2. Material suplementari Article 2	203

7.3. Material suplementari Article 3	213
7.4. Material suplementari Article 4	239
7.5. Material suplementari Article 5	259
7.6. Material suplementari Article 6	273

1.INTRODUCCIÓ

1.1. ELS COMPOSTOS NUTRACÈUTICS

En els darrers anys el rol dels components dietètics ha adquirit especial importància degut a la consciència del consumidor per mantenir una alimentació i/o estil de vida saludable. El coneixement sobre com una alimentació adequada pot ajudar a prevenir malalties i afrontar molts altres problemes relacionats amb la salut ha incrementat la demanda de nutracèutics entre la població. [1]

El terme nutracèutic combina els mots "nutrient" (component alimentari nutritiu) i "farmacèutic" (referit als fàrmacs) i va ser creat el 1989 per Stephen DeFelice, metge endocrinòleg fundador i president de la Fundació per a la Innovació en Medicina, organització nord-americana situada a Nova Jersey. DeFelice va definir un compost nutracèutic com aquell "aliment o part d'un aliment que proporciona un benefici per a la salut, incloent-hi la prevenció o el tractament d'una malaltia". [2] Aquests es poden classificar segons la font d'obtenció, el mecanisme d'acció o la naturalesa química. Alguns exemples de nutracèutics són les vitamines, els carotens, els flavonoides, els curcuminoides, les proteïnes, els àcids grassos poliinsaturats, etc. [3]

Els efectes beneficiosos dels nutracèutics s'utilitzen per tractar i prevenir malalties com el càncer, la inflamació, la hipertensió, malalties cardiovasculars, aterosclerosi, obesitat, diabetis, entre d'altres. [4] Alguns nutracèutics com la curcumina, la vitamina E, l'àcid docosahexaenoic, la colina i la fosfatidilcolina s'utilitzen per tractar i prevenir l'esteatosi (síndrome caracteritzat per la presència de dipòsits de greix en el fetge en pacients que no consumeixen alcohol i en absència d'altres causes de malaltia hepàtica). [5] L'àcid gàl·lic, la cafeïna i la curcumina actuen com a agents anti-envelliment i antioxidants. [6,7] Així mateix, el galat d'epigallocatequina i la curcumina són exemples de compostos nutracèutics que tracten diferents tipus de càncer, com el de mama i el de pròstata. [8] Malauradament, molts dels beneficis potencials dels compostos nutracèutics no poden ser aprofitats completament degut a la seva baixa solubilitat, baixa biodisponibilitat i en alguns casos a la seva baixa termo i fotoestabilitat. Per mitigar alguns d'aquests problemes existeixen diverses metodologies àmpliament utilitzades en la indústria farmacèutica com per exemple la reducció de la mida de partícula del producte per tal d'augmentar la seva superfície específica, l'ús de solucions micel·lars, de ciclodextrines, etc. [9]

Alternativament, es poden emprar diferents formes sòlides cristal·lines (polimorfs, hidrats/solvats, sals i cocristalls) i amorfes per tal de modificar les propietats fisicoquímiques del compost d'interès. [10] La diversitat de formes sòlides en les quals pot existir un principi actiu nutracèutic és deguda a l'existència de múltiples interaccions no covalents així com a la possibilitat de diferents formes d'empaquetament cristal·lí. [11] (Figura 1)

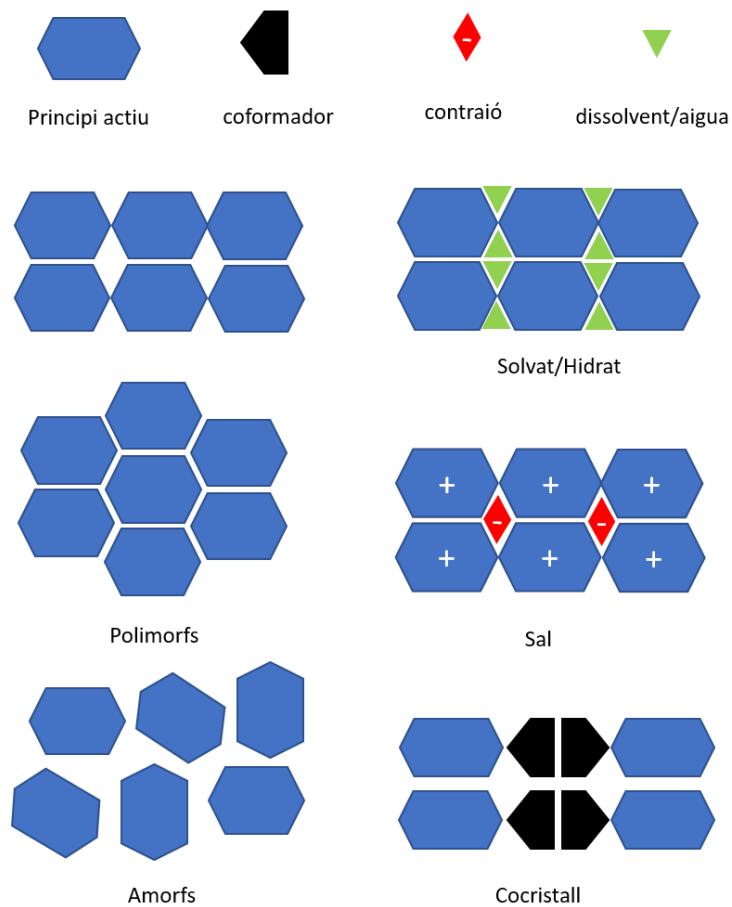


Figura 1. Diferents formes sòlides d'un principi actiu (polimorfs, solvats / hidrats, sals, amorfs i cocristalls) (Adaptat de la referència [12])

1.2. FORMES SÒLIDES DELS PRINCIPIS ACTIUS

Cada possible forma sòlida d'un principi actiu, ja sigui polimorf, solvat, hidrat, sal, cocristall o amorf presenta propietats fisicoquímiques úniques. Descobrir aquella forma sòlida amb les propietats desitjades per a un principi actiu determinat pot ser la clau del seu desenvolupament com a producte eficient per al consum humà i/o animal. En les següents seccions es descriuran cadascuna d'aquestes categories de formes sòlides.

1.2.1. POLIMORFISME

L'acció d'un principi actiu es pot veure afectada pel polimorfisme, ja que diferents polimorfs poden tenir velocitats de dissolució diferents en el cos humà i per tant produir una acció farmacològica inferior o superior a la desitjada. També és important conèixer l'estabilitat relativa entre polimorfs, ja que generalment és el polimorf més estable el que es comercialitza per tal d'evitar transformacions polimòrfiques durant la fabricació i emmagatzematge.

Per tant, conèixer el polimorfisme així com l'estabilitat relativa entre els polimorfs d'un principi actiu és de vital importància i és per això, que les agències reguladores del medicament requereixen la descripció del polimorfisme del principi actiu emprat en la formulació del fàrmac.

El terme polimorfisme (del grec: polys - múltiple, morfé - forma) es defineix com la capacitat d'una substància a existir en diferents formes cristal·lines, cadascuna d'elles amb la mateixa composició química però diferents disposicions i/o conformacions de les molècules dins la xarxa cristal·lina. Les molècules en l'estat sòlid poden interactuar a través de diferents tipus de forces no covalents, principalment l'enllaç d'hidrogen, les forces de van der Waals i les interaccions aromàtiques. La formació de diferents interaccions intermoleculares produeix variacions en la disposició de les molècules a les xarxes cristal·lines generant formes sòlides que difereixen entre elles en el seu valor d'energia lliure. [13] El terme polimorfisme va ser emprat per primer cop l'any 1822 per Mitscherlich en el context de la cristal·lografia. [14] Els diferents polimorfs d'un compost químic poden presentar diferències en les seves estructures cristal·lines derivades del tipus d'empaquetament, donant lloc al fenomen que en anglès es denomina *packing*

polymorphism, o de les conformacions de les molècules, el que es coneix en anglès com *conformational polymorphism*. A més i en relació a l'empaquetament cristal·lí existeixen diversos fenòmens relacionats com són la isoestructuralitat i el morfotropisme i respecte a la conformació molecular els fenòmens de polimorfisme conformacional i d'ajust conformacional.

La isoestructuralitat es relaciona amb la similitud en les disposicions espacials relatives de les molècules en les seves estructures cristal·lines, podent presentar diferències petites en les dimensions de la cel·la. [15-18] Mentre que el morfotropisme esdevé quan dues estructures cristal·lines es relacionen entre elles a través d'operacions de simetria no cristal·logràfiques (rotacions [19] o traslacions [18]).

Finalment, la diferència entre polimorfs deguda a conformacions moleculars es pot classificar a través de dos fenòmens: l'ajust conformacional i el canvi conformacional. L'ajust conformacional es produeix quan una molècula flexible adapta la seva conformació lleugerament a l'entorn cristal·lí per tal de minimitzar l'energia reticular molt a prop d'un mínim d'energia potencial. Per contra, un canvi conformacional, implica un canvi de mínim local d'energia potencial. Aquests dos fenòmens es descriuen de manera esquemàtica en el diagrama d'energia potencial en relació a un angle de torsió molecular (Figura 2). [20]

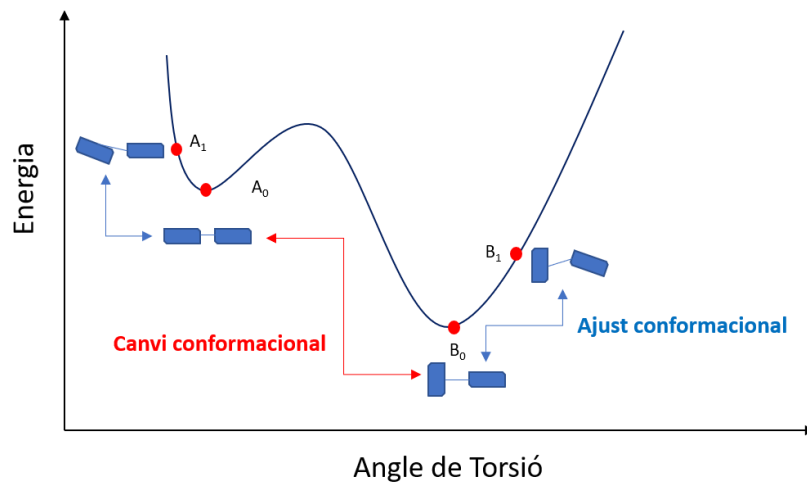


Figura 2. Representació esquemàtica del canvi conformacional i de l'ajust conformacional. La variació d'un angle de torsió pot generar un simple ajust conformacional o un canvi de mínim d'energia i per tant una nova conformació (Adaptat de la referència [20])

Per tal de definir si dos polimorfs es relacionen a través d'un canvi o un ajust conformacional, Cruz-Cabeza i Bernstein van definir els següents paràmetres:

El càlcul de la desviació quadràtica mitjana (RMSD) permet determinar la semblança entre dues conformacions a través de la mesura de la distància mitjana entre els àtoms de dues molècules superposades.

1. Si el valor de RMSD és superior a 0,375 Å les dues conformacions es relacionen a través d'un canvi conformacional, mentre que si el valor està per sota d'aquest valor es considera un ajust conformacional.
2. En relació a la variació de l'angle de torsió màxima $(\Delta\theta)_{\max}$ entre els enllaços flexibles:
 - Si $(\Delta\theta)_{\max} < 25^\circ$, els dos polimorfs es relacionen a través d'un ajust conformacional.
 - Si $25^\circ \leq (\Delta\theta)_{\max} < 45^\circ$, els dos polimorfs es relacionen segons un ajust conformacional amb un 92% de probabilitat.
 - Si $45^\circ \leq (\Delta\theta)_{\max} < 95^\circ$, no es pot realitzar una predicció fiable, de manera que els enllaços s'han d'analitzar individualment.

- Si $(\Delta\theta)_{\max} \geq 95^\circ$, els dos polimorfs es relacionen a través d'un canvi conformacional amb un 99% de probabilitat.

Per altra banda, és particularment important en la indústria farmacèutica determinar la relació d'estabilitat termodinàmica entre els diferents polimorfs d'un principi actiu. En aquest sentit les regles de Burger-Ramberger permeten avaluar l'estabilitat relativa entre parells de polimorfs i definir la seva relació com enantiotròpica o monotròpica. [13, 21, 22] En un sistema monotròpic, una forma cristal·lina és més estable que l'altra a qualsevol temperatura per sota del seu punt de fusió. En canvi, dos polimorfs estan relacionats enantiotròpicament quan existeix una temperatura de transició per sota del punt de fusió en la qual s'inverteix l'ordre d'estabilitat entre ells. Les regles de Burger-Ramberger es resumeixen en els punts següents:

- **Regla de la calor de transició (*Heat of transition rule*):** si s'observa en un experiment de DSC una transició endotèrmica entre dues formes cristal·lines existeix un punt de transició per sota d'aquesta temperatura i els dos polimorfs estan relacionats enantiotròpicament
- **Regla de la calor de fusió (*Heat of fusion rule*):** dos polimorfs estan relacionats enantiotròpicament si el polimorf amb el punt de fusió més alt té l'entalpia de fusió més baixa, la situació inversa es correspondria amb un sistema monotròpic.
- **Regla de la densitat:** la forma més estable és aquella que té una major densitat a temperatura ambient, però existeixen excepcions: si les molècules formen enllaços d'hidrogen dins l'estructura cristal·lina pot no complir-se aquesta regla.

Burger i Ramberger van proposar els diagrames d'energia per a un sistema polimòrfic monotròpic i enantiotròpic, en els quals es representen l'energia lliure de Gibbs i l'entalpia d'ambdós polimorfs enfront de la temperatura. En un sistema enantiotròpic les corbes d'energia lliure de Gibbs (G_A i G_B) es creuen en el punt de transició (Figura 3a), mentre que en un sistema monotròpic no es creuen mai (Figura 3b). L'entalpia de la transició en un sistema enantiotròpic es defineix com la diferència entre els valors

d'entalpia de cada polimorf a aquella temperatura ($\Delta_{tr}H_{B-A} = H_B - H_A$). Per altra banda, les corbes d'energia lliure permeten visualitzar les entalpies de fusió de cada polimorf com la diferència entre les corbes d'entalpia de cada polimorf i l'estat líquid ($\Delta_m H_A$ i $\Delta_m H_B$) a la temperatura de fusió corresponent.

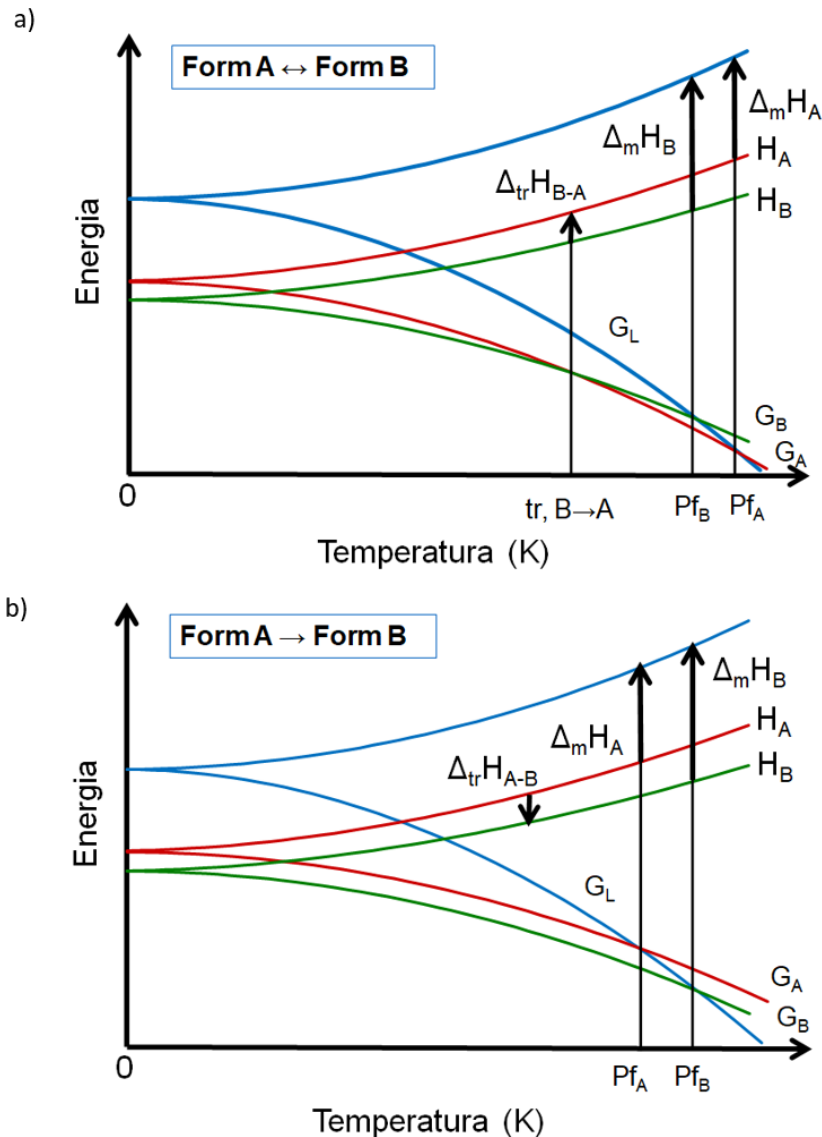


Figura 3. Diagrames d'energia de Burger i Ramberger. a) Enantiotropia i b) Monotropia

Una altra forma de determinar l'estabilitat relativa entre polimorfs és mitjançant el càlcul de l'energia reticular (*lattice energy*, E_{latt}), utilitzant mètodes *ab initio* basats en la *Density Functional Theory* (DFT). Les tècniques DFT són de gran utilitat i no suposen un elevat cost computacional. La teoria del funcional de la densitat permet donar solució a l'equació de Schrödinger (Equació 1), on el funcional de l'energia electrònica es

minimitza respecte de la densitat electrònica. L'equació de Schrödinger defineix l'estat quàntic d'un sistema i , per tant, una vegada resolta permet determinar qualsevol propietat física del mateix.

$$\hat{H}\Psi(\{R_A\}, \{r_i\sigma_i\}) = E\Psi(\{R_A\}, \{r_i\sigma_i\})$$

Equació 1. Equació de Schrödinger

L'energia reticular es defineix com l'energia necessària per traslladar una molècula des de l'infinit, en fase gas, fins a la cel·la cristal·lina (Equació 2). El terme E_{mol} correspon a l'energia de la molècula aïllada en fase gas, el terme E_{cryst} correspon a l'energia de la molècula dins de la cel·la cristal·lina i n és el nombre de molècules que es troben dins del sistema emprat en el càlcul.

$$E_{\text{latt}} = \frac{E_{\text{cryst}}}{n} - E_{\text{mol}}$$

Equació 2. Energia reticular

Valors negatius de l'energia reticular indiquen interaccions intermoleculares atractives. Per altra banda els valors positius indiquen interaccions intermoleculares repulsives. L'energia reticular es pot calcular, entre d'altres aproximacions, amb el mòdul DMOL³ del software Materials Studio. [23,24]

Les energies reticulars de diferents polimorfs poden presentar valors similars, amb diferències de 2 kJ/mol o inferiors. [25] Això fa que el seu ús per a la interpretació de l'estabilitat relativa entre polimorfs és limitat.

1.2.2. HIDRATS/SOLVATS

Els hidrats i solvats són formes cristal·lines multicomponents que contenen molècules d'aigua (hidrat) o de dissolvent (solvat) dins la xarxa cristal·lina. La presència de molècules d'aigua o de dissolvent a la xarxa cristal·lina genera una cel·la diferent a la de la forma anhidra i, en conseqüència, les propietats fisicoquímiques (solubilitat, velocitat de dissolució, estabilitat i biodisponibilitat) difereixen de les de l'anhidre. [14,26]

En el cas dels hidrats, la molècula d'aigua presenta àtoms donadors i acceptors d'enllaços d'hidrogen i és per això que és més habitual la formació d'hidrats que no pas

la de solvats. [27] A més, les molècules d'aigua poden estabilitzar aquelles estructures cristal·lines en les quals hi ha un desequilibri en el nombre d'acceptors i donadors, a través de la formació d'interaccions per enllaç d'hidrogen. De fet, en molts casos un hidrat és la forma cristal·lina més estable d'un principi actiu, fent difícil la formació d'una forma anhidra. [28]

Morris i Rodríguez-Hornedo [29] van proposar un sistema de classificació dels hidrats en tres classes: [22]

- 1) Classe I: xarxa tipus canal: les molècules d'aigua interactuen entre si per formar canals dins de la xarxa cristal·lina.
- 2) Classe II: *isolated lattice site*: les molècules d'aigua no estan directament unides per enllaços d'hidrogen entre si.
- 3) Classe III: *metal-ion coordinated hydrates*: les molècules d'aigua formen fortes interaccions amb metalls de transició o metalls alcalins.

Cal destacar que la desolvatació també pot conduir a la formació de noves formes sòlides com ara altres polimorfs anhidres, sòlids amorfs o desolvats isomorfs. Un desolvat isomorf conserva el mateix tipus d'empaquetament molecular que el solvat original, però canvia la composició del sòlid.

1.2.3. SALS

El terme sal farmacèutica s'utilitza per referir-se a un principi actiu ionitzable que s'ha combinat amb un contra-íon per formar un complex neutre. [30] La formació de sals s'utilitza àmpliament per millorar propietats fisicoquímiques dels principis actius amb grups ionitzables. Els avantatges de les sals farmacèutiques poden incloure una velocitat de dissolució i/o una solubilitat millorades, a més d'altres propietats desitjables en l'estat sòlid, com ara un increment del punt de fusió. [31]

La conversió d'un principi actiu amb grups àcids o bàsics en una sal es produeix a través d'una reacció de neutralització. L'ús de diferents àcids o bases per a la neutralització del principi actiu pot generar una gran diversitat de compostos. Les sals farmacèutiques més freqüents són els clorhidrats, sulfats, acetats i fosfats.

El principal avantatge de les sals és la seva elevada solubilitat en aigua, la qual és funció del pH. Com que el pH del tracte gastrointestinal (sigles en anglès GIT) varia entre 1 i 7,5 (per exemple, a l'estómac el pH varia entre 1 i 3 i a l'intestí prim entre 5 i 7), és possible optimitzar la ubicació en el GIT amb major solubilitat seleccionant una sal adequada ja que cada sal té un valor de pH_{max} associat a la seva màxima solubilitat. [32]

1.2.4. AMORFS I COAMORFS

Els sòlids amorfs es caracteritzen per l'absència d'ordre tridimensional de llarg abast, el qual es pot identificar a través de la presència d'un halo en el seu diagrama de difracció de raigs X de pols. En principi qualsevol substància es pot solidificar en forma amorfa si la fase líquida es refreda prou ràpidament.

L'ús d'amorfs permet subministrar un fàrmac poc soluble en aigua amb una millor biodisponibilitat. El principal inconvenient de l'ús de fàrmacs amorfs és la seva forma de dosificació, la qual presenta una estabilitat limitada i en gran mesura imprevisible ja que un sòlid amorf és inestable termodinàmicament i té tendència a recristal·litzar en la forma cristal·lina més estable i per tant menys soluble. Recentment ha sorgit un nou concepte a la indústria farmacèutica que ha rebut un interès especial, el sòlid coamorf, el qual incorpora un segon component que impedeix cinèticament la recristal·lització i a la vegada incrementa la solubilitat del principi actiu. [33,34]

1.2.5. COCRISTALLS

Un cocristall és un sòlid cristal·lí multicomponent format per dos o més compostos diferents en proporcions estequiomètriques. Els diferents components interactuen mitjançant interaccions no covalents, principalment d'enllaç d'hidrogen, forces de van der Waals i interaccions aromàtiques. [8,35] En el cas d'un cocristall farmacèutic, els components són un principi actiu i un coformador farmacèuticament acceptable, és a dir, un compost que no té cap efecte farmacològic advers o tòxic. Generalment per a la seva elecció es segueixen els criteris de la *Food and Drug Administration* (FDA), i en concret el compendi de compostos denominat *Everything Added to Food in the United States* (EAFUS), que conté més de 3000 substàncies, inclosos els ingredients que

s'afegeixen als aliments i que la FDA ha aprovat com a additius alimentaris segurs per a la seva ingesta i que s'anomenen *Generally Regarded as Safe* (GRAS). [36]

El primer cocristall va ser sintetitzat l'any 1844 i denominat quinhidrona, essent un cocristall d'estequiometria 1:1 format per benzoquinona i hidroquinona. [37] Històricament ha existit una certa controvèrsia sobre l'ús del terme cocristall [38,39] i recentment s'ha publicat una nova actualització de la classificació regulatòria dels cocristalls a la guia de la FDA. En particular, el nou document de la FDA diu que "des d'una perspectiva química, física i regulatòria, els cocristalls es poden considerar com un cas especial de solvats i hidrats, en els quals el segon component, el coformador, no és un dissolvent (inclosa l'aigua), i no sol ser volàtil" i des d'una perspectiva regulatòria, els productes farmacèutics dissenyats com cocristalls es consideren anàlegs a un nou polimorf del principi actiu. [40]

A part dels cocristalls moleculars de compostos neutres, existeixen dues altres classes de cocristalls: els cocristalls iònics i els híbrids sal-cocristall (Figura 4). [41,42,43] Els cocristalls iònics inclouen el principi actiu en forma neutra i una sal inorgànica a la mateixa xarxa cristal·lina (Figura 4a). Mentre que els híbrids sal-cocristall inclouen el principi actiu i el coformador estant el principi actiu tant en forma neutra com en forma de sal a la mateixa xarxa cristal·lina (Figura 4b). També pot existir una híbrid sal-cocristall en la qual el principi actiu està en forma neutra i el coformador en forma de sal o a la inversa (Figura 4c i d). A més, aquestes formes també poden presentar polimorfisme i/o formar solvats/ hidrats. [10]

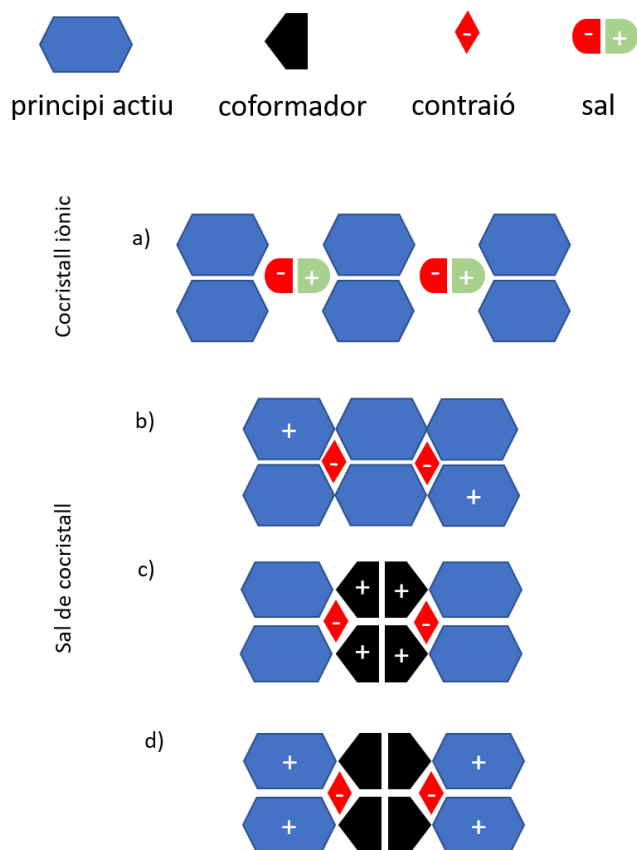


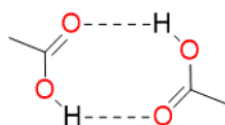
Figura 4. Diferents formes sòlides dels cocrystals: cocristall iònic i híbrids sal-cocristall (Adaptat de la referència [12])

Convé ressaltar que la cocrystal·lització és la millor alternativa a la formació d'una sal a fi d'incrementar la seva solubilitat per a principis actius no ionitzables. A més, el nombre de coformadors potencials i aptes per a consum humà supera el nombre de contraïons disponibles per a la formació de sals, la qual cosa permet explorar un gran nombre de combinacions principi actiu/coformador. [10] Cal insistir en que la major aplicació dels cocrystals es troba en la possibilitat d'alterar propietats fisicoquímiques de rellevància industrial com són el punt de fusió, la solubilitat, la biodisponibilitat i/o estabilitat del principi actiu.

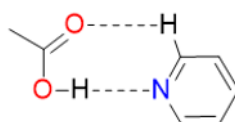
1.3. ENGINYERIA CRISTAL·LINA I VIRTUAL COCRYSTAL SCREENING

Un dels principals reptes en el desenvolupament de cocrystals farmacèutics és la selecció de coformadors compatibles amb el principi actiu d'interès. La capacitat de predir quins coformadors poden interactuar fortament amb el principi actiu i formar cocrystals és una eina complementària al *screening* experimental, de manera que

permet reduir temps i costos. L'enginyeria cristal·lina i el cribatge virtual de cocristalls (*virtual cocrystal screening*) són dues de les tècniques utilitzades amb aquesta finalitat. Per una banda l'enginyeria cristal·lina es pot considerar una disciplina derivada de la química supramolecular i la cristal·lografia que té com a objectiu el disseny i la preparació de nous materials cristal·lins amb propietats fisicoquímiques desitjades. El coneixement i comprensió de les interaccions intermoleculares més freqüents que tenen lloc en un cristall es poden emprar per dissenyar i predir configuracions intermoleculares de cocristalls i d'aquesta manera incidir en aquelles propietats directament relacionades amb elles. [44] En aquest sentit, el concepte de sintons supramoleculares és de gran utilitat i es defineixen segons Desiraju, com “aquelles unitats estructurals que es poden reconèixer dins d'una supramolècula a un cristall i que es poden formar a través d'operacions sintètiques implicant interaccions no covalents”. [45] N'hi ha de dos tipus: homosintons i heterosintons. Els homosintons es formen entre grups funcionals iguals, a diferència dels heterosintons formats entre grups funcionals diferents. (Figura 5)



Homosínton



Heterosínton

Figura 5. Dos exemples de sintons supramoleculares. (Homosínton i Heterosínton)

D'altra banda, el cribatge virtual de cocristalls és un mètode computacional de predicció desenvolupat per Hunter *et. al* [46] basat en la determinació dels punts superficials d'interacció intermolecular a través del càlcul de superfícies de potencial electrostàtic molecular (MEPS). Per tal d'estudiar quines interaccions intermoleculares entre un principi actiu i un coformador estan més afavorides, és important conèixer la distribució de càrrega a la superfície de la molècula ja que permet establir quines regions de la

superfície de van der Waals són riques o deficientes en densitat electrònica. La MEPS mostra com es distribueix el potencial electrostàtic sobre la superfície d'una molècula, i per tant el tipus d'interacció electrostàtica que pot exercir cada regió de la superfície amb una altra. El potencial electrostàtic molecular es defineix com la força que actua en les proximitats d'un punt $p(x,y,z)$ determinat de la superfície molecular sobre una càrrega positiva puntual i és generat pel conjunt de nuclis i electrons de la molècula. La representació de l'energia potencial es fa sobre la superfície de van der Waals, de manera que també ofereix informació sobre la topologia de la molècula. Un valor negatiu de potencial indica atracció sobre una càrrega positiva puntual, és a dir, correspon a grups acceptors d'enllaç d'hidrogen, aquestes zones es representen en color vermell. Per altra banda un valor de potencial positiu indica repulsió cap a les càrregues positives, per tant són zones de baixa densitat electrònica on la càrrega dels nuclis es troba només parcialment apantallada i corresponen a grups donadors d'enllaç d'hidrogen. Aquestes regions són representades en color blau. (Figura 6)

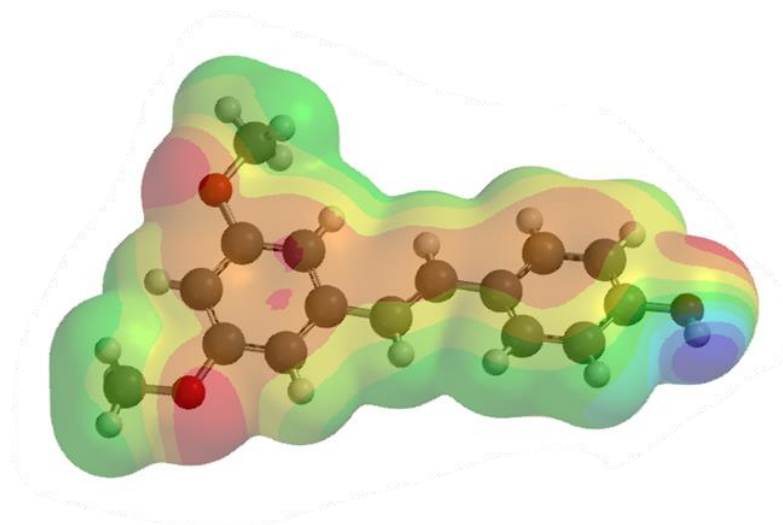


Figura 6. Representació del potencial electrostàtic molecular (MEP) de la molècula de pterostilbé

El cribatge virtual de cocristalls estudia la possibilitat de formar cocristalls basats en un model electrostàtic que defineix les interaccions intermoleculares com contactes entre punts d'interacció específics de les superfícies moleculars (*Surface Site Interaction Points*, SSIP). [47]

Els SSIP són els punts més representatius de les propietats d'interacció intermolecular superficials d'una molècula de forma simplificada. Per exemple, l'aigua es descriu

mitjançant quatre SSIPs, dos llocs acceptors d'enllaç d'hidrogen (els dos parells de electrons no compartits de l'àtom d'oxigen) i dos llocs donadors d'enllaç d'hidrogen (els dos àtoms d'hidrogen). [46] Els SSIPs es poden caracteritzar a través dels màxims i mínims de la superfície de potencial electrostàtic molecular (MEPS) amb els paràmetres d'enllaç d'hidrogen, α i β , els quals corresponen a versions adimensionals normalitzades dels valors màxim i mínim del MEPS, E_{\max} i E_{\min} respectivament.

El valor α es relaciona amb l'habilitat donadora d'enllaç d'hidrogen d'una regió de la superfície de la molècula (E_{\max} , MEP_{\max}) caracteritzada per una deficiència d'electrons i amb caràcter àcid. Mentre que el valor de β es relaciona amb l'habilitat acceptora d'enllaç d'hidrogen d'una regió de la superfície de la molècula (E_{\min} , MEP_{\min}) caracteritzada per una elevada densitat electrònica i amb caràcter bàsic. Aquests valors es poden estimar mitjançant les següents equacions (Equació 3), deduïdes a partir de dades experimentals. [48]

$$\alpha = 0.0000162 \text{ MEP}_{\max}^2 + 0.00962 \text{ MEP}_{\max}^2$$

$$\beta = 0.0000146 \text{ MEP}_{\min}^2 - 0.00930 \text{ MEP}_{\min}$$

Equació 3. Càlcul dels valors α i β mitjançant els valors d'energia extrets de la superfície de potencial electrostàtic molecular (MEP)

Alguns valors de α i β , segons el grup funcional, han estat tabulats. [46] Per altra banda, el producte $\alpha \times \beta$ es relaciona amb la força de la interacció entre un grup donador i un altre acceptor, de manera que aquest paràmetre adimensional es pot emprar per classificar els diferents contactes intermoleculars observats a una estructura cristal·lina dins d'una escala quantitativa.

1.4. TÈCNiques EXPERIMENTALS PER A LA SÍNTESI DE COCRISTALLS

Un cop seleccionats els coformadors s'empren diverses tècniques experimentals per al descobriment i preparació dels cocristalls. A l'hora de dissenyar la cerca de cocristalls el ventall de condicions experimentals que es poden utilitzar és molt divers. [49] En aquesta tesi s'ha emprat un corpus de metodologies experimentals en la cerca de cocristalls desenvolupat a la Unitat de Polimorfisme i Calorimetria dels Centres Científics

i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. [50] Aquesta experiència es troba recollida en un protocol, el qual requereix d'un estudi qualitatiu de la solubilitat del principi actiu i de cada coformador. Aquest procés implica l'ús de trenta dissolvents amb diferents grups funcionals (alcohols, cetones, alcans, èters, etc.) la qual cosa proporciona una àmplia diversitat química que augmenta la probabilitat d'explorar eficientment els diversos dominis de cristal·lització del compost en estudi. Aquesta informació qualitativa permet en una primera fase seleccionar aquells dissolvents en els quals principi actiu i coformador són solubles o parcialment solubles per tal de realitzar experiments de transformació mediada pel dissolvent (*Drop grinding*, DG). Aquesta tècnica es basa en la mòlta conjunta d'una quantitat estequiomètrica de principi actiu i coformador emprant boles d'acer dins d'una cambra metàl·lica i amb l'addició d'una gota de dissolvent per tal d'induir la formació de cocristalls. S'ha demostrat que l'activació mecànica i la reducció de la mida de partícula incrementa la velocitat de cocrystal·lització. [51] L'ús del dissolvent té un paper catalitzador en la formació dels cocristalls, sent, per tant, una tècnica més eficient respecte del mètode en sec (*Neat-grinding*). [52] El desavantatge d'aquesta tècnica es troba en la possible conversió incompleta del cocrystal·litzat, així com en la formació de defectes cristal·lins i la possible generació de sòlids amorfs. A diferència de les tècniques en solució la tècnica de DG evita l'ús excessiu de dissolvent, de manera que es tracta d'un desenvolupament més sostenible des d'un punt de vista medioambiental. En aquesta tesi s'ha utilitzat la tècnica de DG com a mètode de cribratge inicial de coformadors amb l'ús de petites quantitats de material i dissolvent. Els sòlids resultants dels experiments de *drop-grinding* s'han caracteritzat mitjançant difracció de raigs X de pols. Quan s'han observat evidències d'una nova fase cristal·lina (a través de la comparació amb les difraccions de raigs X de pols del principi actiu i coformador), s'ha passat a una segona fase en la qual s'augmenta l'escala de treball mitjançant tècniques de *reaction crystallization* (RC) i suspensions (*slurries*, SY). [53]

La tècnica de RC consisteix en la preparació d'una solució saturada del compost més soluble i posterior addició del compost menys soluble fins a generar una suspensió i amb agitació, utilitzant condicions semblants a les que han generat indicis de cocrystal·lització en els experiments de DG. Aquesta tècnica s'utilitza generalment quan principi actiu i coformador presenten solubilitats significativament diferents.

D'altra banda, la tècnica de preparació de suspensions (SY) consisteix en mesclar el principi actiu i el coformador en quantitats equimolars en el dissolvent escollit. La mescla s'agita i s'estudia la seva evolució durant un període de temps. Aquesta tècnica també s'utilitza per estudiar l'estabilitat relativa entre polimorfs a través de la preparació d'una barreja equimolar de les dues formes cristal·lines. Aquesta tècnica generalment s'aplica quan principi actiu i coformador presenten solubilitats similars.

Un altre dels mètodes en solució freqüentment utilitzat per preparar els cocrystals és l'evaporació lenta a partir d'una solució d'una composició estequiomètrica determinada de principi actiu i coformador. [54, 55] No obstant, amb aquest procediment es corre el risc de cristal·litzar les fases individuals d'un component o una mescla d'elles. [56] La selecció de dissolvents i la construcció del diagrama ternari de fases ternàries és una eina que permet dissenyar de forma eficaç les condicions experimentals (composició estequiomètrica principi actiu:coformador, volum de dissolvent i temperatura) per a la preparació de cocrystals seguint processos de cristal·lització a partir de dissolucions. La forma del diagrama ternari està condicionat per la solubilitat del principi actiu i del coformador, l'estequiometria del cocrystal i la temperatura. [57]

En relació a la solubilitat, si principi actiu i coformador presenten solubilitats similars aleshores el diagrama és simètric (Figura 7a), mentre que si les solubilitats són molt diferents presenten diagrames asimètrics (Figura 7b). [58]

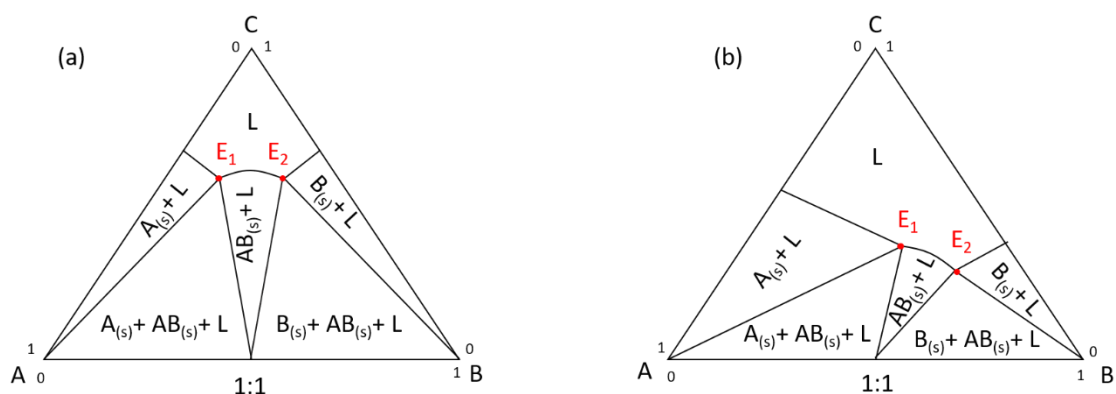


Figura 7. Diagrama ternari de fases ternari. Principi actiu (A), coformador (B), dissolvent (C). En la representació es representa el cocrystal (AB) i els punts eutèctics (E_1 i E_2)

En el primer cas (Figura 7a), és possible aïllar el cocristall mitjançant l'evaporació d'una dissolució estequiomètrica (1:1) de principi actiu (A) i coformador (B). D'altra banda, quan la solubilitat del principi actiu (A) és significativament inferior a la del coformador (B), el domini on el cocristall és l'espècie dominant es mourà cap al costat dret del diagrama (Figura 7b), la qual cosa requereix l'ús d'excés de principi actiu i coformador per poder aïllar el cocristall. Per altra banda, l'evaporació del dissolvent en una composició estequiomètrica que creua en mig dels punts eutèctics representats com a E_1 i E_2 en la Figura 7 permet obtenir el cocristall en forma pura. [59,60]

1.5. EL FENOMEN DE LA CRISTAL·LITZACIÓ

La tècnica experimental d'evaporació lenta descrita en l'apartat anterior també s'utilitza per generar monocristalls adequats per a estudis de difracció de raigs X de monocristall a fi de resoldre l'estructura cristal·lina i conèixer la relació estequiomètrica entre principi actiu i coformador, així com les seves característiques d'empaquetament cristal·lí. Però, la resolució de l'estructura cristal·lina del cocristall mitjançant la tècnica de difracció de raigs X de monocristall és també important des d'una perspectiva regulatòria. En aquest sentit, la FDA i l'Agència Europea de Medicaments exigeixen durant els tràmits regulatoris d'un nou cocristall que hi hagi una confirmació experimental de la presència tant de l'API com del coformador a la cel·la unitat, essent la resolució de l'estructura cristal·lina la tècnica més apropiada amb aquesta finalitat. [40]

L'evaporació lenta implica la nucleació i el creixement d'un cocristall a partir d'una solució sobresaturada d'ambdós components. Fer créixer un monocristall utilitzant aquesta tècnica és un repte molt exigent, ja que hi ha una forta tendència a què els compostos en dissolució formin nuclis espontàniament, els quals donen lloc a cristalls molts petits que creixen al mateix temps en lloc de formar-ne un únic cristall de grans dimensions. [61] Per això, és important entendre el fenomen de la cristal·lització i quines són les condicions favorables per a la formació d'un monocristall. En aquest sentit, la solubilitat en un medi líquid és de vital importància. La cristal·lització consisteix en la formació d'una fase cristal·lina a partir d'una solució termodinàmicament metastable, és a dir una solució sobresaturada. [62] El fenomen de cristal·lització es produeix a través de dues etapes: la nucleació i el creixement cristal·lí. La nucleació succeeix quan les

molècules de solut es reuneixen en grups de manera definida formant els anomenats clústers. Depenent del mecanisme seguit existeixen dos tipus de nucleació: la primària i la secundària. La nucleació primària té lloc sense la presència inicial de cristalls de solut en suspensió. A més, aquesta pot ser homogènia, quan la formació espontània de cristalls té lloc en una solució perfectament lliure d'impureses sòlides, i heterogènia, quan la formació de cristalls és induïda per la presència de partícules sòlides inerts. Tot i així, les solucions totalment lliures de partícules sòlides en suspensió són pràcticament impossibles d'aconseguir, per tant, es pot assumir que qualsevol nucleació primària que es produeix és heterogènia. Per altra banda, la nucleació secundària té lloc en presència de cristalls del material que s'està cristal·litzant. Hi ha dues maneres diferents de formar nous cristalls en presència de cristalls preexistents. Per una banda, es poden generar cristalls nous a través de la formació de fragments que es produeixen pel trencament de cristalls existents (col·lisions dels cristalls amb les parets del recipient, entre si, amb l'agitador, etc.). La segona forma és a través de la sembra de cristalls, consistent en afegir cristalls ja purificats del mateix compost a una solució cristal·litzant per tal de nuclear i/o fer créixer més cristalls. Diversos investigadors han optimitzat les tècniques de sembra de cristalls. [63] Finalment, una vegada s'han format els clústers durant la nucleació comença el creixement cristal·lí. Alguns dels nuclis poden créixer fins a una mida prou gran per formar sistemes estables, els quals finalment formaran els cristalls. [64,65] Però, un sistema no necessàriament es transforma directament en l'estat termodinàmicament més estable, ja que poden existir diversos estats intermitjos metastables, tal i com descriu la regla de les etapes d'Ostwald (*rule of stages*). [66] Ostwald va afirmar que en un sistema inestable (sobresaturat), el polimorf menys estable termodinàmicament (amb velocitat de nucleació més ràpida) tendeix a nuclear primer i després a transformar-se en el més estable. No obstant, existeixen molts sistemes que no segueixen estrictament aquesta regla. Com per exemple en el cas del polimorfisme concomitant, el qual es produeix quan hi ha una nucleació simultània de dos o més polimorfs. [67,68]

1.6. RESOLUCIÓ D'ESTRUCTURES CRISTAL·LINES MITJANÇANT DIFRACCIÓ DE RAIGS X DE POLS.

Moltes vegades la formació de cristalls de mida suficient i/o qualitat adequades per als estudis de difracció de raigs X de monocristall no és possible, i en aquests casos es pot resoldre l'estructura cristal·lina mitjançant mètodes d'espai directe a partir de dades de difracció de raigs X de pols. [69]

El procés de determinació d'una estructura cristal·lina per mètodes d'espai directe a partir de dades de difracció de raigs X de pols comença amb l'adquisició de dades amb suficient precisió en un interval ampli de rang angular (2θ). Mitjançant el valor de les distàncies entre plans hkl (*d-spacing*) de les reflexions disponibles en el patró de difracció és possible obtenir els paràmetres de cel·la ($a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$) a través d'un procés d'indexació, el qual consisteix en l'assignació dels índexs de Miller [70] per a cadascuna de les reflexions del difractograma. DICVOL04, [71] és el programa que s'ha fet servir en aquesta tesi per indexar fases cristal·lines. A més, s'han utilitzat com a indicadors de qualitat de la indexació les figures de mèrit ($M(N)$ i $F(N)$) [72,73]. Una vegada indexada una fase cristal·lina cal determinar el grup espacial a través de l'anàlisi de les absències sistemàtiques. Després es realitza l'ajust de perfil del patró de difracció (*pattern matching*) utilitzant el mètode de Le Bail, [74] en el qual s'ajusta un perfil calculat per al patró de difracció de pols experimental en base al refinament de les intensitats, la forma i amplada dels pics, el fons (*background*) i el paràmetre d'error instrumental zero. En aquesta tesi s'ha utilitzat el programa FullProf, [75] el qual permet representar gràficament la diferència entre les dades observades i les calculades (Figura 8), a més de generar numèricament els valors de R_{wp} i X^2 , paràmetres emprats com a indicadors de la bondat de l'ajust.

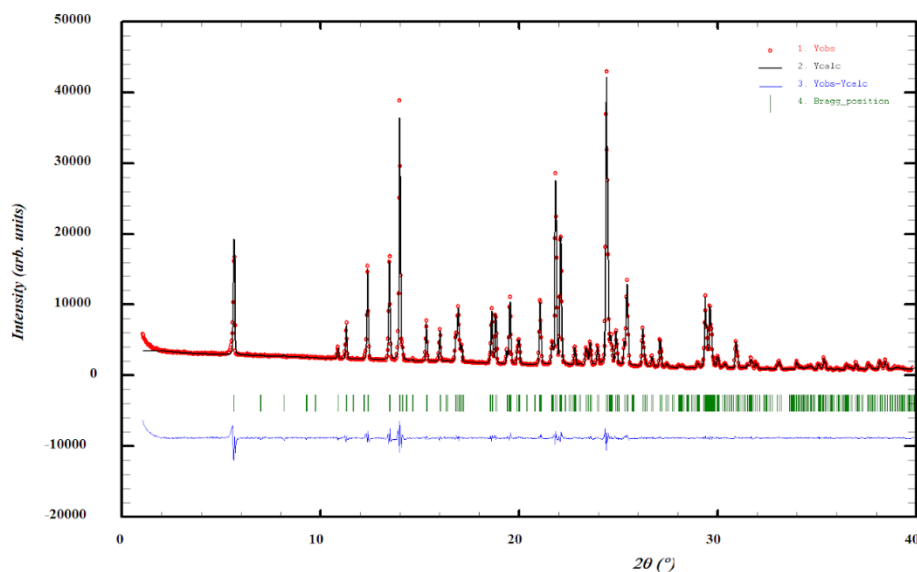


Figura 8. Difractograma experimental (vermell), perfil calculat (negre), la diferència entre ambdós (blau). Les marques verdes verticals indiquen la posició dels pics de difracció

A continuació, es genera una aproximació inicial de l'estructura a través de mètodes d'espai directe, en aquesta tesi s'ha utilitzat el mètode de Montecarlo. [76] Els diferents models estructurals es generen mitjançant el moviment aleatori d'un fragment estructural dins de la cel·la, acceptant o rebutjant cada estructura de prova mitjançant la seva comparació directa entre els patrons de difracció de pols calculat i l'experimental. Una vegada s'han generat les diverses solucions estructurals, la millor estructura (amb el paràmetre d'ajust més baix i amb sentit químic) es selecciona com a model estructural inicial per al posterior refinament estructural. Aquest procés es realitza mitjançant el programa FOX. [77] Finalment es realitza el refinament d'una sèrie de paràmetres (background, paràmetres de cel·la, paràmetres de forma, agitacions tèrmiques, etc.) utilitzant el mètode de Rietveld. [78] Aquest consisteix en minimitzar, mitjançant un algoritme de mínims quadrats, la diferència entre el patró de difracció de raigs X de pols experimental i el calculat a partir de l'estructura cristal·lina. El perfil d'aquest últim s'obté amb informació dels paràmetres de cel·la, les posicions atòmiques i els paràmetres de desplaçament, les funcions analítiques que depenen del valor de 2θ i que descriuen la forma i amplada dels pics de difracció i una descripció del background.

En definitiva, les tècniques experimentals emprades habitualment per a la caracterització de cocristalls són la difracció de raigs X de pols o monocristall, l'anàlisi tèrmica (calorimetria diferencial d'escombratge, DSC, i anàlisi termogravimètrica, TGA), ressonància magnètica nuclear de protó (^1H -RMN), sorció dinàmica de vapor (DVS) i espectroscòpia IR i Raman. [79]

1.7. ESTUDI DE LES INTERACCIONS INTERMOLECULARS

El coneixement de l'estructura cristal·lina del cocristall ens permet disposar de valuosa informació estructural (les posicions de cada àtom, la geometria molecular, els enllaços entre àtoms i informació sobre la força i direcció de les interaccions intermoleculars). Les interaccions intermoleculars determinen les propietats fisicoquímiques d'un compost en l'estat sòlid, com per exemple la solubilitat en aigua ja que les substàncies que presenten interaccions iòniques són generalment solubles en aigua, mentre que les que només presenten forces de dispersió de London són generalment insolubles en aquest medi. Respecte a les interaccions intermoleculars més freqüents en cocristalls: [80]

- L'enllaç d'hidrogen és, amb diferència, la interacció més important en el disseny de cocristalls. Aquesta es produeix generalment entre un àtom d'hidrogen unit a un àtom d'oxigen o nitrogen (grup donador) i un parell d'electrons no compartit d'un àtom d'oxigen o nitrogen d'una altra molècula (grup acceptor).
- Forces de van der Waals produïdes pels moments dipolars instantanis deguts a l'oscil·lació ininterrompuda de la densitat electrònica d'una molècula, la qual indueix un moment dipolar en una altra molècula, creant una força atractiva instantània (dipol instantani-dipol induït). Aquesta interacció depèn de l'àrea de contacte.
- Efecte inductiu o polaritzant produït per la distorsió de la densitat electrònica d'una molècula polaritzable generat per les molècules polars veïnes (dipol permanent-dipol induït). Un canvi en el moment dipolar d'una molècula per una altra s'anomena polarització.

També existeixen altres tipus d'interaccions com ara les interaccions aromàtiques [81,82] o l'enllaç d'halogen que es donen en presència de grups aromàtics o dobles enllaços i en presència d'un àtom halogen respectivament. [83]

Generalment i tal i com ja s'ha esmentat, la interacció més important que s'observa en cocristalls de compostos orgànics és l'enllaç d'hidrogen, per tant l'estudi dels seus patrons de formació permet obtenir el coneixement per identificar les preferències de formació de sintons supramoleculars probables que condueixen a la formació dels cocristalls. Les regles empíriques de formació d'enllaços d'hidrogen, basades en evidències experimentals proposades per *M. C. Etter* [84], són eines útils per predir la formació d'un enllaç d'hidrogen en una forma cristal·lina. Les tres primeres regles s'apliquen en general a grups funcionals de molècules orgàniques neutres. A més va proposar regles addicionals específiques per a altres grups funcionals. Es resumeix a continuació:

1. Tots els bons donadors i acceptors de protons s'utilitzen en la formació dels enllaços d'hidrogen.
2. Es formen preferentment els enllaços d'hidrogen intramoleculars de sis anells respecte als enllaços d'hidrogen intermoleculars.
3. Els millors donadors i acceptors de protons que queden després de la formació d'un enllaç d'hidrogen intramolecular formen enllaços d'hidrogen intermoleculars els uns amb els altres.

Els grups funcionals amb major potencial per formar enllaços d'hidrogen en un cocristall són els àcids carboxílics, les amides i els alcohols. A més, els enllaços d'hidrogen més forts inclouen les següents interaccions (N-H...O), (O-H...O), (N-H...N,) i (O-H...N). Altres enllaços d'hidrogen més febles inclouen interaccions com (C-H...O). [10] A la Figura 9 es mostren els sintons supramoleculars més comuns observats en estructures cristal·lines.

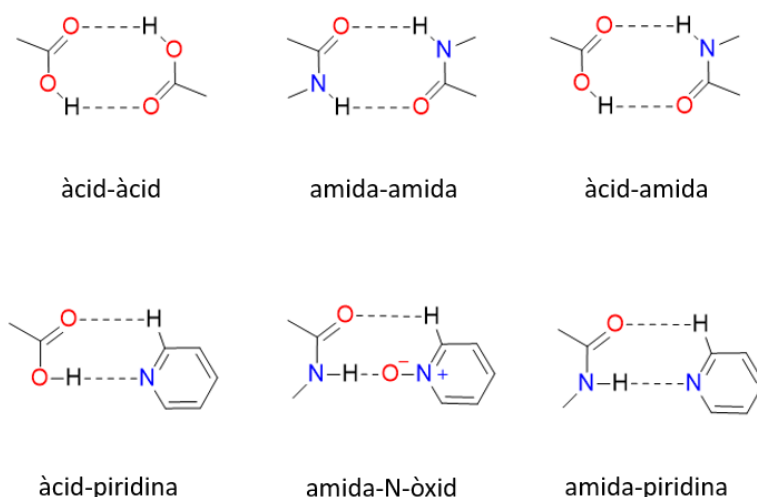


Figura 9. Alguns dels sintons supramoleculars més representatius

La nomenclatura utilitzada per definir les interaccions intermoleculares és la proposada per Etter *et al.* [84] El conjunt de molècules que hi ha unides entre si per enllaços d'hidrogen s'anomena motiu, i es caracteritza per un dels quatre designadors que indiquen si el motiu és infinit, finit, cíclic o alifàtic. Els designadors són C (cadena), R (anell), i D (dímer o un altre conjunt finit), mentre que S denota un enllaç d'hidrogen intramolecular. També s'afegeix el nombre de donadors i acceptors que són presents en cada motiu i s'assignen com a subíndex i superíndex, respectivament. Finalment, s'indica el nombre d'àtoms a la unitat de repetició entre parèntesis. La Figura 10 representa alguns exemples d'aquesta nomenclatura.

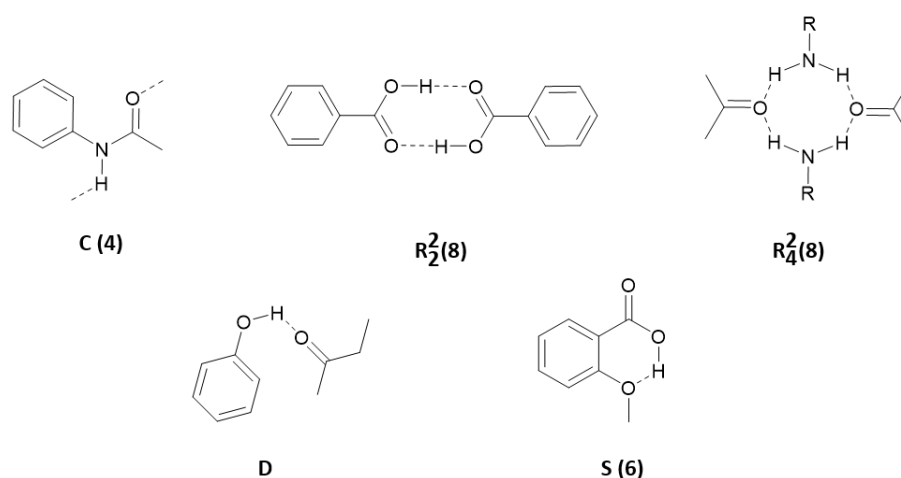


Figura 10. Representació d'enllaços d'hidrogen amb la nomenclatura corresponent segons Etter. (Adaptat de la referència [84])

Existeixen també mètodes computacionals com els càlculs *Quantum Theory of Atoms in Molecules* (QTAIM) [85] i els *Non-covalent interactions* (NCI), [86] els quals s'utilitzen generalment per identificar interaccions covalents i no covalents d'una molècula, ja que no solen tenir un cost computacional massa elevat. Aquests es poden aplicar a molècules, clústers moleculars, cristalls de baix pes molecular, proteïnes, emparellaments i apilament de bases d'ADN, etc. [87]

La base d'aquesta teoria és que cada àtom està rodejat per una superfície en la qual el vector gradient de densitat electrònica és zero. Aquest s'anomena gradient de densitat reduït (sigles en anglès, RDG) i es calcula utilitzant la densitat $\rho(r)$ i la seva primera derivada $S(r)$ (Equació 4):

$$S(r) = \frac{1}{2(3\pi^2)^{1/3}} \frac{|\nabla\rho(r)|}{\rho(r)^{4/3}}$$

Equació 4. Primera derivada de la densitat

Per determinar el tipus d'interacció, s'utilitza el signe del Laplacà de la densitat, $\nabla^2\rho(r)$. Per fer-ho, es calculen els tres valors propis λ_i de la matriu Hessiana de la densitat electrònica ($\lambda_1 \leq \lambda_2 \leq \lambda_3$). La Hessiana és la matriu simètrica (3x3) de les segones derivades parcials. La suma dels termes diagonals és el que s'anomena Laplacà (Equació 5).

$$\nabla^2\rho(r) = \frac{\partial^2\rho(r)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\rho(r)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\rho(r)}{\partial z^2}$$

Equació 5. Fórmula del Laplacà

Per determinar un punt crític s'utilitzen dos conceptes anomenats rang i signatura. El rang del punt crític es defineix com el nombre de valors propis diferents de zero, mentre que la signatura es defineix com la suma algebraica dels signes dels valors propis. Els diferents punts crítics definits per Bader són:

- Punt crític atòmic: es considera la posició d'un àtom.

- Punt crític d'enllaç: Punts que es troben entre dos àtoms veïns que defineixen un enllaç entre ells.
- Punt crític d'anell: Aquest punt es troba enmig de diversos enllaços que formen un anell.
- Punt crític de gàbia: aquest punt es troba quan diversos anells formen una gàbia (en anglès *cage*).

S'ha representat a mode d'exemple la molècula 4-metil-1,12-difluoro [4]-helicene amb els diferents punts crítics definits per Bader. (Figura 11) [88]

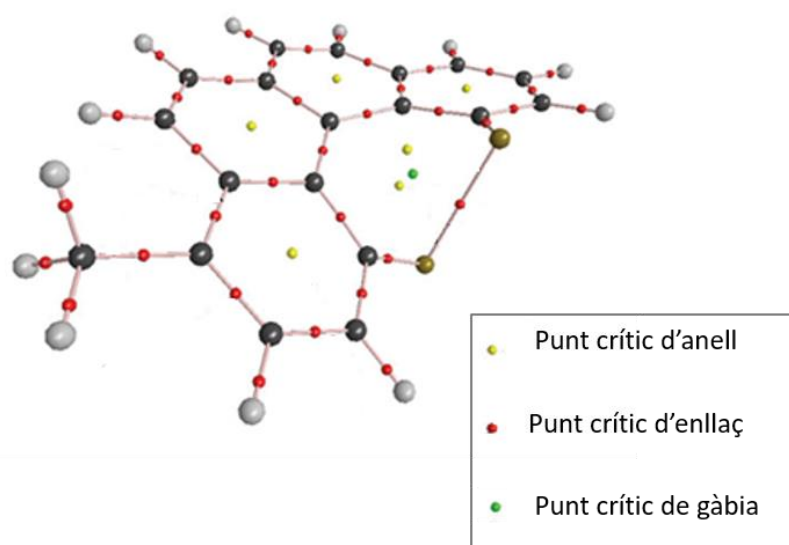


Figura 11. Representació dels punts crítics del 4-methyl-1,12- difluoro[4] helicene (Adaptat de la referència [88])

En definitiva, la teoria QTAIM localitza els diversos punts crítics de la densitat i utilitza cada punt crític d'enllaç com a punt de partida per a la cerca de les superfícies interatòmiques de flux zero en el camp vector gradient de la densitat electrònica.

L'índex d'interaccions no covalents proporciona essencialment la mateixa informació que la QTAIM, però a diferència d'aquesta, permet caracteritzar la força de la interacció indicant si aquesta és favorable o desfavorable a través del signe del producte entre el valor propi λ_2 i la densitat, la qual distingeix entre interaccions enllaçades ($\lambda_2 < 0$) i no lligades ($\lambda_2 > 0$). Per visualitzar la ubicació de les interaccions es poden estudiar les isosuperfícies de gradient de densitat reduïda baixa (NCIplot). Les isosuperfícies es representen en funció del valor del signe de λ_2 . Les regions blaves, amb grans valors

negatius de signe λ_2 , mostren interaccions atractives, com ara les interaccions dipol-dipol o d'enllaç d'hidrogen, mentre que les regions vermelles mostren impediments estèrics ($\lambda_2 > 0$). El color verd indica interaccions dèbils, com ara les interaccions π - π i les de van der Waals. (Figura 12)

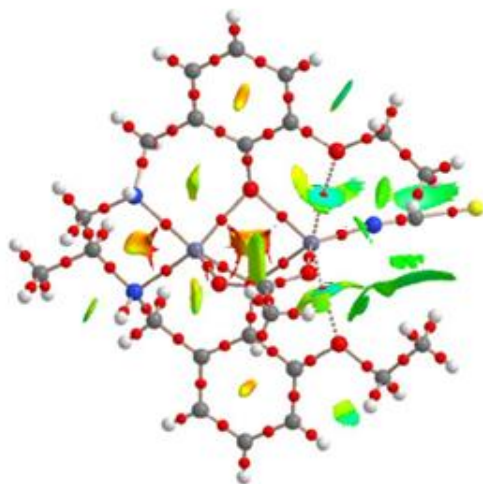


Figura 12. Representació dels punts crítics i l'isosuperfície obtingudes pels mètodes QTAIM i NCI d'un complex de Zn (II) $[Zn_2(\mu_{1,3}\text{-OAc})(L^2)(NCS)]$ (Adaptat de la referència [89])

Per altra banda, el càlcul de la superfície de Hirshfeld [90] és una altra eina important que serveix per visualitzar i analitzar les interaccions intermoleculares en una estructura cristal·lina. Aquesta permet identificar i examinar ràpidament similituds i diferències entre diverses formes polimòrfiques i analitzar els tipus d'empaquetament cristal·lí. Hirshfeld va definir l'anomenada funció de pes per a cada àtom d'una molècula en un cristall. (Equació 6)

$$W_A(r) = \frac{\sum_{i \in \text{molècula}} \rho_i^{\text{at}}(r)}{\sum_{i \in \text{cristall}} \rho_i^{\text{at}}(r)} = \frac{\rho_{\text{molècula}}(r)}{\rho_{\text{cristall}}(r)}$$

Equació 6. Funció de pes $W(r)$ per a una molècula A

El numerador correspon a la densitat electrònica de la molècula d'interès (promolècula), i el denominador és la suma anàloga aplicada a tot el cristall. La funció de pes $W(r)$ descriu per a una determinada molècula la seva contribució en densitat electrònica respecte a la total del cristall en un punt r . És a dir, sobre cada punt de la isosuperfície de la molècula la densitat electrònica provinent de tots els àtoms inclosos dins de la

isosuperfície és igual a la densitat electrònica provinent de la resta d'àtoms del cristall (és per això que cada punt de la isosuperfície té un valor de $W(r) = 0.5$). La superfície de Hirshfeld es construeix en base a aquest concepte, per tant, considera la densitat electrònica de la molècula ($\rho_{\text{molècula}}$), en interrelació amb les molècules veïnes (ρ_{cristall}) dins l'empaquetament periòdic cristal·lí. A més, per a cada punt d'aquesta isosuperfície es defineixen dues distàncies: la distància des d'un punt de la superfície fins al nucli més proper de fora de la superfície d_e , i la distància fins al nucli més proper dins de la mateixa, d_i . (Figura 13)

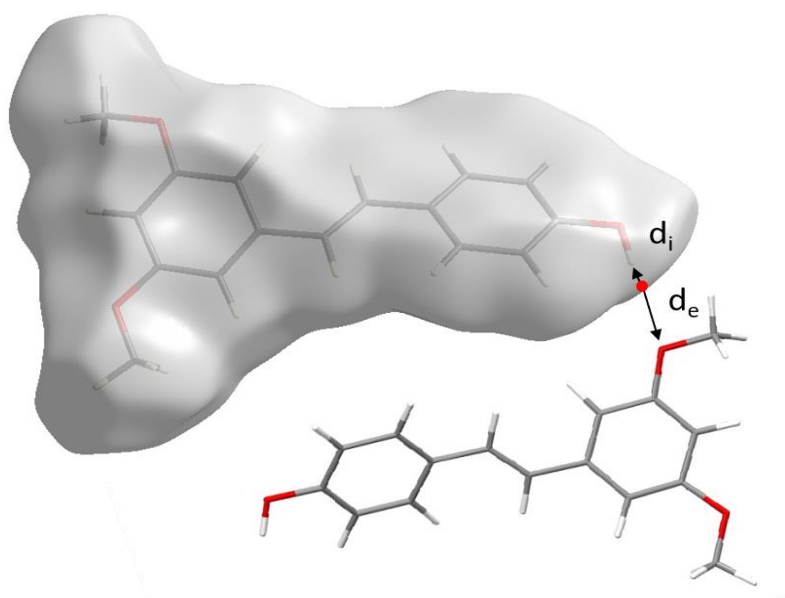


Figura 13. Superfície nua en la que s'il·lustren de forma esquemàtica les distàncies d_i i d_e per a un punt determinat (punt en color vermell) per al polimorf III de pterostilbé

Per tal de saber si els contactes entre àtoms són més curts que la suma dels radis de van der Waals (vdW), tal i com succeiria en una interacció favorable, s'introdueix el terme de la distància normalitzada (d_{norm}) que té en compte els radis de vdW. (Equació 7) [91]

$$d_{\text{norm}} = \frac{d_i - r_i^{\text{vdW}}}{r_i^{\text{vdW}}} + \frac{d_e - r_e^{\text{vdW}}}{r_e^{\text{vdW}}}$$

Equació 7. Equació de la distància normalitzada

Els paràmetres r_i^{vdW} i el r_e^{vdW} són els radis de van der Waals dels àtoms propers dintre i fora de la superfície de Hirshfeld respectivament. Les distàncies abans definides (d_i i d_e) s'utilitzen per generar un gràfic bidimensional anomenat empremta dactilar (2D-

fingerprint plot) que conté un resum concís d'interaccions intermoleculares de la molècula en el cristall. També proporciona la contribució d'àrea per a cada tipus d'enllaç en forma de percentatge (%). (Figura 14)

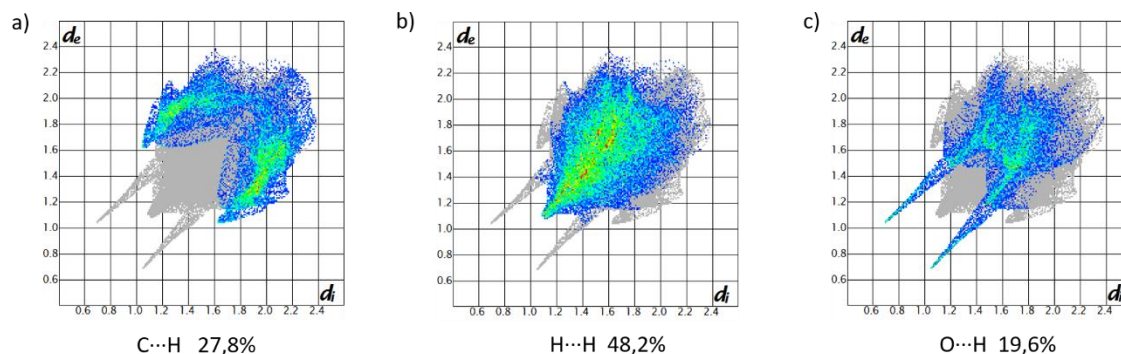


Figura 14. empremta dactilar i contribució de l'enllaç (%) (a) per a les interaccions de tipus C...H, (b) de tipus H...H i (c) de tipus O...H per al polimorf III de la molècula de pterostilbé

La proximitat dels contactes s'observa en la superfície de Hirshfeld mitjançant una escala de colors que varien des del blau, indicador de contactes més llargs que la suma dels r_i^{vdW} , el color blanc que defineix una separació igual a la suma dels r_i^{vdW} i el color vermell que indica contactes més curts que la suma dels r_i^{vdW} , per tant aquells on hi ha interaccions favorables. (Figura 15) [92]

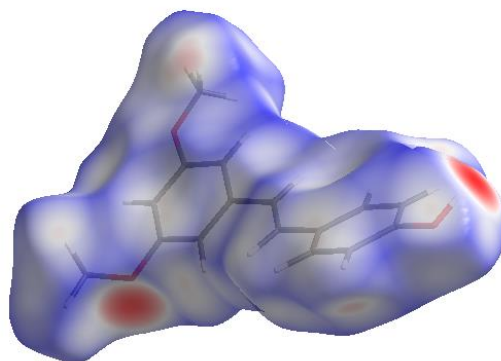


Figura 15. Superfície de Hirshfeld (distància normalitzada) per al polimorf III de pterostilbé

Existeixen altres maneres de representar la superfície de Hirshfeld que tenen en compte les propietats derivades, tal com l'índex de curvatura (*curvedness index*) o la forma (*shape index*). Aquestes es defineixen en base a la topologia de la molècula en l'entorn de la xarxa cristal·lina. Tant l'índex de curvatura com el de forma serveixen per

identificar modes d'empaquetament característics, en particular, disposicions d'apilament pla i, fins i tot, les formes en que les molècules adjacents es posen en contacte. Per exemple, si existeix un contacte d'apilament aromàtic (π - π) s'observaria una superfície plana en la zona de l'anell aromàtic. [93] Per a la realització de les superfícies de Hirshfeld s'ha emprat el software *Crystal Explorer*. [94,95]

1.8. PROPIETATS FÍSICOQUÍMIQUES DELS COCRISTALLS

Els cocristalls es dissenyen generalment amb l'objectiu d'obtenir propietats físicoquímiques superiors als materials de partida. La formació d'un cocristall dona lloc a una nova forma sòlida cristal·lina. Així doncs, aquesta té un nou conjunt de propietats físicoquímiques diferenciades de qualsevol dels materials de partida. Per tant, cal avaluar si les noves propietats físicoquímiques de la nova forma sòlida són més adients que les dels materials de partida per als objectius particulars de l'estudi.

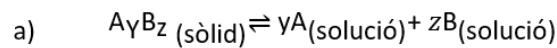
En les següents seccions es realitza una descripció detallada de les propietats físicoquímiques estudiades en aquesta tesi, així com la seva avaluació.

1.8.1. SOLUBILITAT I VELOCITAT DE DISSOLUCIÓ

La solubilitat i la velocitat de dissolució són factors clau per determinar l'eficàcia i l'activitat d'un cocristall. De fet, són els principals aspectes que se solen investigar durant el desenvolupament del cocristall d'un principi actiu, particularment en aquells destinats a l'administració oral.

La solubilitat es pot definir com la quantitat d'una substància que es dissol en un determinat volum de dissolvent a una temperatura específica. [96] Existeixen diferents formes d'expressar aquesta propietat: solubilitat en equilibri o intrínseca (com a paràmetre termodinàmic) i velocitat de dissolució (com a paràmetre cinètic). [97] La solubilitat termodinàmica d'una substància es defineix com la concentració de solut en una solució saturada i en equilibri amb el solut pur en estat sòlid. És freqüent que quan es prepara una solució resulti en la formació d'una solució sobresaturada, on es dissol una quantitat de solut que supera la solubilitat termodinàmica. Les solucions sobresaturades són metastables des d'un punt de vista termodinàmic, i qualsevol valor de concentració obtingut en aquestes condicions representa una solubilitat cinètica i no un valor de solubilitat en equilibri. Per altra banda, quan es treballa amb substàncies

ionitzables, es parla de solubilitat a un pH determinat. La solubilitat intrínseca fa referència a la solubilitat d'equilibri de l'àcid o la base lliure d'un compost ionitzable a un pH on no està en forma iònica. La solubilitat d'un cocristall pot variar si es troba en situació de no equilibri, segons la seva puresa i segons les condicions del medi (pH, presència d'additius, etc.). A més, el valor de la solubilitat depèn de la composició en la solució dels components que formen el cocristall, essent en aquestes condicions el producte de solubilitat (K_{ps}) una constant, emprant-se generalment aquest valor com a paràmetre que descriu la solubilitat. [98] El producte de solubilitat és la constant d'equilibri que regeix la dissociació del cocristall (A_yB_z) en el principi actiu (A_y) i el coformador (B_z), on y i z són els coeficients estequiomètrics. (Equació 8a)



$$b) \quad K_{ps} = \frac{a_A^y a_B^z}{a_{A_yB_z}}$$

$$c) \quad K_{ps} = [A]^y [B]^z$$

Equació 8. (a) Equilibri de dissociació d'un cocristall (A_yB_z) en solució i (b i c) constant d'equilibri per a aquesta reacció a través de les activitats de cada component i en base a les seves concentracions, respectivament

El valor de K_{ps} per a un cocristall s'expressa través de les activitats (Equació 8b) assumint que l'activitat de la fase sòlida és constant i igual a 1, d'aquesta manera el valor de K_{ps} és directament proporcional a la solubilitat del principi actiu i el coformador i, augmenta segons la solubilitat del segon. (Equació 8c) Les concentracions es calculen en el punt eutèctic on hi ha l'equilibri trifàsic entre les dues fases sòlides (cocristall i principi actiu o coformador) i la fase líquida (solució). En aquest punt la solució està saturada de dues fases sòlides de manera que les concentracions són independents de la relació de fases. [98,99]

Com ja s'ha esmentat anteriorment, el pH pot fer variar la solubilitat, ja que els cocristalls poden presentar propietats àcides, bàsiques, amfòteres o zwitteriòniques. Si un o tots els components del cocristall són ionitzables (amb freqüència ho és el coformador), a més de l'equilibri de dissociació del cocristall també existiran equilibris d'ionització que s'han de tenir presents a l'hora de calcular el K_{ps} . Cadascun d'aquests equilibris han estat

descrits detalladament per Rodríguez-Hornedo *et. al.* La mateixa autora suggereix que la solubilitat del coformador hauria de ser unes 10 vegades superior a la del principi actiu per tal de millorar la solubilitat del cocristall respecte a la del principi actiu de manera significativa. [100]

En aquesta tesi s'ha determinat la solubilitat d'equilibri utilitzant el mètode *Shake-flask* [101] per a determinar la solubilitat d'equilibri.

A més de la solubilitat termodinàmica d'un cocristall, també és rellevant conèixer la rapidesa amb que s'assoleixen els límits de solubilitat (velocitat de dissolució). [102,103]

Un principi actiu pot tenir una baixa solubilitat en un dissolvent, i tenir una elevada velocitat de dissolució o viceversa. La velocitat de dissolució determina la quantitat de principi actiu que es dissol en funció del temps.

La velocitat de dissolució es mesura mitjançant els mètodes de disc on aquest pot estar de forma estàtica (Figura 16a) o rotativa (Figura 16b). Existeixen altres mètodes menys utilitzats com els mètodes de la pols gruixuda, on el compost sòlid s'afegeix directament al vial i el mètode de suspensions, on s'utilitza una mida de partícula controlada del fàrmac en pols.

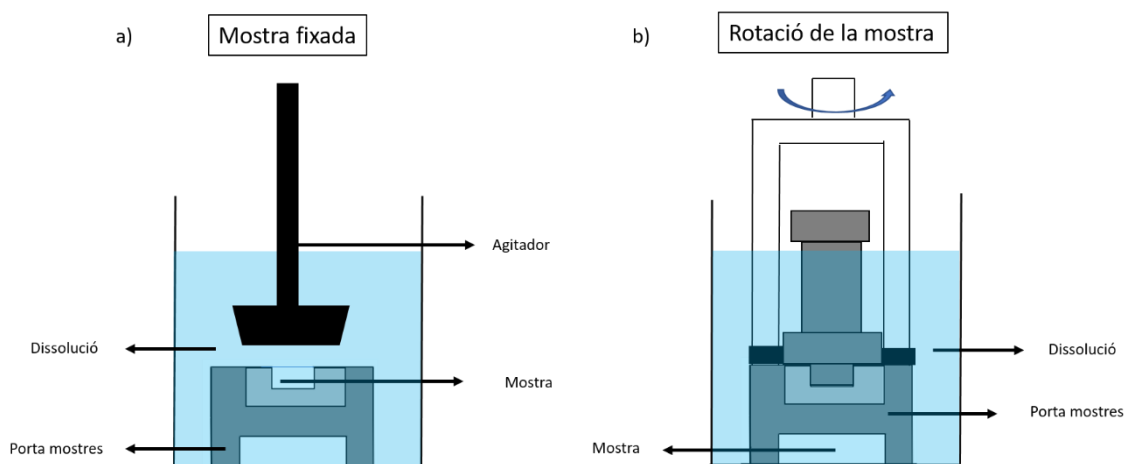


Figura 16. Representació esquemàtica dels dos mètodes habitualment utilitzats per a la mesura de la velocitat de dissolució mitjançant els mètodes de disc on aquest pot estar de forma estàtica o rotativa

En aquesta tesi, s'ha determinat la velocitat de dissolució a través del mètode de dissolució GI, el qual permet utilitzar quantitats petites de principi actiu i que és generalment aplicat en etapes de preformulació. [104]

El procés de dissolució del cocristall es pot descriure a través del mecanisme anomenat en anglès *spring and parachute*. [105] (Figura 17) La major solubilitat del cocristall genera una sobresaturació del principi actiu, el qual depenent de la cinètica del procés pot recristal·litzar lentament, generant en aquest cas l'efecte *spring* consistent en un període de sobresaturació del principi actiu sense cristal·lització. Aquest fenomen ve acompanyat de l'efecte *parachute*, el qual es produeix quan hi ha la transformació lenta de l'amorf a una fase cristal·lina estable i/o el creixement de nous cristalls. La transformació pot quedar inhibida però finalment la fase amorfa es transformarà (en alguns casos a través de polimorfs metaestables del principi actiu) en el polimorf termodinàmicament més estable tal com prediu la llei d'Ostwald. [106]

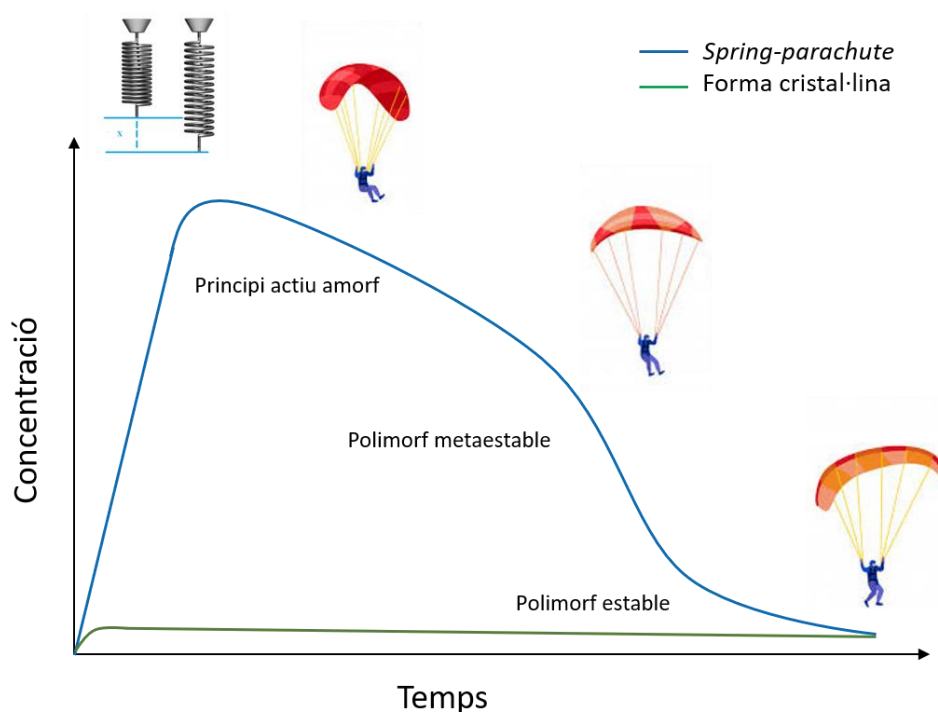


Figura 17. Representació gràfica del mecanisme de dissociació d'un cocristall en solució (*spring and parachute*).

1.8.2. BIODISPONIBILITAT

La biodisponibilitat d'un cocristall es defineix com l'extensió i la velocitat amb la que el principi actiu aquest assoleix la circulació sistèmica i està disponible al lloc d'acció (on es produirà l'efecte farmacològic). [107] Els estudis de biodisponibilitat d'un principi actiu farmacèutic serveixen per establir els paràmetres farmacocinètics (velocitat d'absorció,

extensió d'absorció, velocitats d'excreció i metabolisme i la vida mitjana d'eliminació) després d'una administració de dosi única o múltiple. [108]

La quantitat de cocristall absorbit es dedueix amb dades experimentals dels perfils de concentració de principi actiu en funció del temps (Figura 18) i a partir d'aquest es calcula l'àrea sota la corba (sigles en anglès, AUC). L'AUC és directament proporcional a la quantitat total de principi actiu que arriba a la circulació sistèmica. Per tant a major sigui l'absorció, major serà la concentració del principi actiu (AUC). No obstant, no només és important la quantitat de principi actiu absorbit sinó també la velocitat a la qual s'absorbeix. L'absorció ràpida d'un principi actiu pot ser beneficiós per a fàrmacs que necessiten una elevada concentració en un temps curt (com ara el subministrament d'adrenalina durant un xoc anafilàctic). D'altra banda una velocitat d'absorció lenta garanteix concentracions de principi actiu més sostingudes en el temps i perllongarien l'efecte del fàrmac. Però, en el cas d'una absorció molt lenta, la corba de concentració plasmàtica seria tan plana que les concentracions obtingudes mai podrien arribar a una concentració mínima efectiva.

La determinació de la concentració màxima del principi actiu (C_{max}), i el temps màxim en el qual aquesta és assolida (T_{max}) són variables que s'utilitzen per avaluar la velocitat d'absorció. La C_{max} s'observa en el moment en el que la velocitat d'entrada en la circulació sistèmica del fàrmac és igual a la velocitat d'eliminació de la mateixa. Això indica que el procés d'absorció està pròxim al seu final, per tant el T_{max} és una mesura indirecta i aproximada de la durada del procés d'absorció. [109]

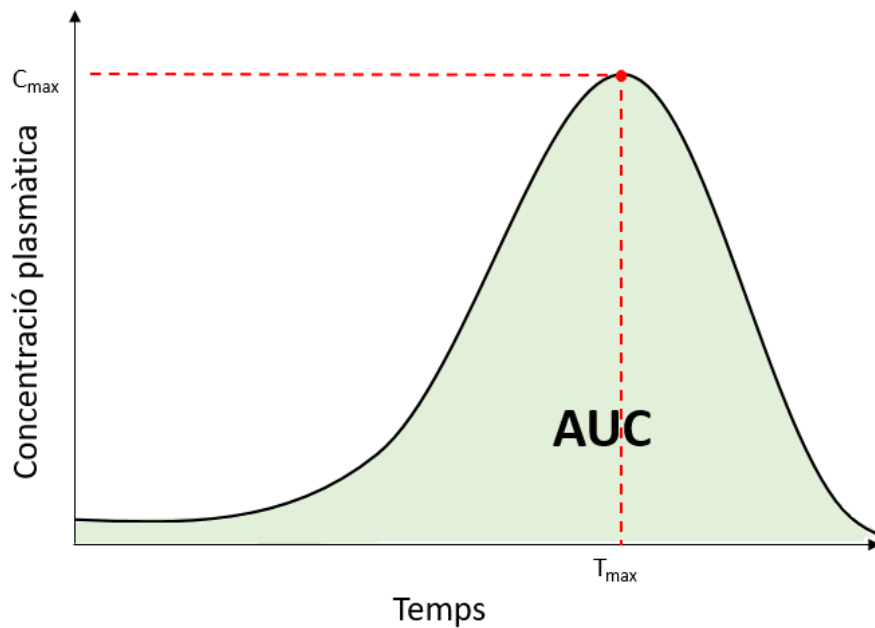


Figura 18. Representació de la relació entre la concentració plasmàtica i el temps un cop administrat un fàrmac per via oral

La biodisponibilitat es pot expressar en forma absoluta o relativa. La biodisponibilitat absoluta d'una formulació farmacèutica es refereix a la fracció o percentatge de fàrmac que ingressa a la circulació sistèmica després de l'administració d'una dosi via extravascular (oral, transdèrmica, subcutània, etc). Aquesta es basa en assumir que després de l'administració de la mateixa dosi per via intravenosa, el 100% del fàrmac ingressa a la circulació sistèmica. L'estimació de la biodisponibilitat absoluta expressada en percentatge de la dosi absorbida després d'una administració intravenosa es realitza segons l'Equació 9. [110]

$$\text{Biodisponibilitat absoluta (\%)} = \frac{X_{ev}}{X_{iv}} \cdot 100$$

Equació 9. Biodisponibilitat absoluta en percentatge

On X_{ev} i X_{iv} són les quantitats de fàrmac presents en plasma després d'una administració extravascular i intravascular respectivament.

Per altra banda la biodisponibilitat relativa entre dues formulacions farmacèutiques (test (T) i referència (R)) es refereix a la fracció o percentatge de fàrmac que ingressa a

la circulació sistèmica després de l'administració via extravascular (oral, transdèrmica, subcutània, etc) d'una dosi de la formulació T respecte de la mateixa dosi administrada per via extravascular de la formulació R. En aquest cas, la fracció biodisponible és relativa perquè és estimada sense fer referència a una administració intravascular. L'estimació de la biodisponibilitat relativa expressada en percentatge de la dosi absorbida es realitza segons l'Equació 10. [110]

$$\text{Biodisponibilitat relativa de T (\%)} = \frac{X_T}{X_R} \cdot 100$$

Equació 10. Biodisponibilitat relativa de la formulació denominada test en percentatge

On X_T i X_R són les quantitats de fàrmac presents en plasma després de l'administració per via extravascular d'una mateixa dosi de les formulacions T i R respectivament.

1.8.3. ESTABILITAT

L'estabilitat d'un cocristall és un paràmetre important des d'un punt de vista regulatori. I aquesta és avaluada al llarg del temps sota la influència de factors ambientals (temperatura, humitat i llum) per tal de garantir la seva eficàcia i seguretat. Així mateix, estableixen la seva vida útil i les condicions d'emmagatzematge.

L'estabilitat d'un cocristall es relaciona amb la durada de les seves qualitats terapèutiques, així com amb la conservació de les seves propietats físiques i químiques. Aquesta es pot expressar com a estabilitat física/química. L'estabilitat física fa referència a canvis que no impliquen la composició química, com ara l'aparença, mida, duresa, etc. En canvi, l'estabilitat química fa referència a l'alteració de la composició química, mitjançant reaccions com per exemple les d'hidròlisi, oxidació, reducció, fotòlisi, etc.

Les proves d'estrès, també anomenades estudis de degradació forçada, es realitzen per tal d'avaluar l'estabilitat dels cocristalls i identificar les principals vies de degradació. A més, són una eina per definir les condicions òptimes d'emmagatzematge. L'objectiu principal és documentar els canvis fisicoquímics que pateix una forma sòlida quan s'exposa a diferents condicions de temperatura, humitat o d'exposició a la llum. Cal tenir en compte quin tipus d'estabilitat es vol estudiar en funció de l'estructura i les característiques del compost. Les directrius *International Conference on Harmonisation* (sigles en anglès ICH), en particular les ICH Q1A i Q1B [112,113] descriuen les condicions

experimentals necessàries per determinar l'estabilitat tèrmica/humitat relativa i la fotoestabilitat. Aquestes normes es varen crear amb l'objectiu de racionalitzar i harmonitzar la regulació dels productes farmacèutics per a la Unió Europea, Japó i els Estats Units, facilitant d'aquesta manera l'acceptació mútua de les autoritats regulatòries d'aquestes jurisdiccions.

L'estudi d'estabilitat es pot classificar com de llarg termini, intermig i accelerat segons les condicions experimentals de temperatura i humitat relativa, les quals són factors que incrementen la velocitat de degradació química i física. Els experiments es realitzen en cambres climàtiques que mantenen controlada la temperatura i la humitat relativa i es duu a terme un mostreig periòdic (Taula 1).

Taula 1. Condicions tèrmiques i d'humitat relativa per a estudis d'estrès segons la norma ICH Q1A.

Tipus d'estudi	Condicions d'emmagatzematge	Període mínim de mostreig
Llarg termini	25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR	12 mesos
Intermig	30°C ± 2°C/65% HR ± 5% HR	6 mesos
Accelerat	40°C ± 2°C/75% HR ± 5% HR	6 mesos

Una altra característica rellevant és la fotoestabilitat del cocristall per tal de demostrar que l'exposició a la llum no produeix cap transformació d'aquest. La fotoestabilitat d'una substància farmacològica, la qual es pot definir com la resposta d'un principi actiu farmacèutic a l'exposició solar, UV i llum visible que comporta un canvi físic o químic a través d'una reacció de fotodegradació (fotòlisi). Aquesta es produeix a través de la formació de radicals lliures o reaccions de fotosensibilització per transferència d'energia intermolecular (absorció d'un fotó amb la posterior dissipació a través de conversió interna, fluorescència, fotoionització, fosforescència o formació de radicals). [114]

Les proves de fotoestabilitat consisteixen en l'elecció d'una font de llum adequada segons la directriu específica de l'ICH. Això normalment requereix l'ús d'un fluorescent artificial de llum natural, una làmpada de xenó o una làmpada d'halogenurs metàl·lics, que emetin en la regió UV i visible amb una sortida similar a la llum de dia estàndard

D65 / ID65. Al final del període d'exposició, les mostres s'han d'examinar per tal de detectar canvis en les seves propietats i, si és possible, identificar els productes generats per la degradació. Simultàniament a l'anàlisi de la mostra exposada a la llum s'ha de realitzar la revisió periòdica de la mateixa mostra protegida de la llum com a control. [115]

1.9. PROPIETAT INTEL·LECTUAL

Si un cop avaluades les propietats fisicoquímiques d'un nou cocristall s'ha observat que alguna d'elles presenta avantatges amb un potencial comercial respecte a les del material de partida aleshores pot ser desitjable la protecció de la seva propietat intel·lectual.

Actualment, la manera de tenir drets exclusius sobre un descobriment en un període de temps específic és mitjançant l'ús de patents. Aquests drets exclusius impliquen que altres persones o empreses no poden utilitzar ni vendre el descobriment. Tot i això, la responsabilitat de vigilar i protegir aquests drets recau en l'inventor.

En el cas de voler patentar una nova entitat química cal complir tres criteris. Ha de ser nova, útil i no òbvia. La novetat implica que l'objecte de la invenció reclamada no s'ha divulgat públicament abans de l'intent de protecció. La utilitat fa referència a un ús beneficiós de la invenció i generalment inclou processos industrials de fabricació i nous materials o productes. Finalment, la no obvietat requereix una demostració de que la invenció no és trivial per a una persona entrenada i amb experiència en la matèria de la invenció. [116]

Els cocristalls proporcionen modificacions alternatives de l'estat sòlid d'un principi actiu que compleixen tots els requisits per a ser protegits. La utilitat d'un cocristall generalment és compartida amb l'aplicació terapèutica patentable del principi actiu, però els cocristalls poden oferir altres oportunitats com ara la millora de propietats fisicoquímiques com els perfils de solubilitat, així com l'estabilitat. Per exemple, els cocristalls del fàrmac antifúngic itraconazol, amb diversos àcids dicarboxílics farmacèuticament acceptables, presentaven taxes de dissolució superiors a la base lliure d'itraconazol cristal·lí. De fet, alguns d'aquests cocristalls presentaven perfils de dissolució que rivalitzaven amb el de la base lliure d'itraconazol amorf. Com a conseqüència els nous cocristalls van ser patentats. [117]

Finalment, el concepte de no obvietat és anàleg a la noció científica de predictibilitat. Tenint en compte que la formació de cocristalls no es pot predir encara de manera totalment eficient (secció 1.3.), els cocristalls compleixen amb aquest requisit i prova d'això són els importants esforços que s'han dedicat durant els darrers anys en el camp de la predicció computacional, amb rellevants però encara insuficients avenços que puguin posar en dubte la condició de no obvietat dels cocristalls. [118,119,120].

2.OBJECTIUS

El consum de compostos nutracèutics està relacionat amb la disminució del risc de múltiples malalties cròniques. Tanmateix, molts nutracèutics tenen baixa solubilitat, biodisponibilitat oral i inestabilitat, de forma que es disminueix significativament la seva eficiència com agents de prevenció de malalties. El pterostilbé, l'ubiquinol i la vitamina D₃ són tres compostos nutracèutics molt importants des d'un punt de vista biològic amb baixa biodisponibilitat oral (en el cas del pterostilbé) i elevada inestabilitat (en els casos de l'ubiquinol i la vitamina D₃). Aquestes limitacions comprometen el desenvolupament i/o la comercialització dels tres compostos nutracèutics. Envers aquesta problemàtica es va plantejar la cocrystal·lització com un enfocament eficaç per a la modificació de l'estructura cristal·lina i, per tant, de les propietats fisicoquímiques del compost nutracèutic.

Així, amb la finalitat de millorar les propietats fisicoquímiques del pterostilbé, l'ubiquinol i la vitamina D₃ es va estructurar un pla de treball que permetés, en primer lloc, explorar les possibilitats d'obtenció de nous cocristalls dels compostos nutracèutics pterostilbé, ubiquinol i vitamina D₃ i, en funció dels resultats obtinguts desenvolupar metodologies robustes i reproduïbles per a la seva síntesi, caracterització i avaluació de les seves propietats fisicoquímiques. Aquestes etapes queden definides en els següents punts:

- Recerca dels antecedents bibliogràfics dels tres compostos nutracèutics.
- Utilització d'estratègies d'enginyeria cristal·lina per a la selecció dels coformadors.
- Realització de la recerca experimental de noves formes sòlides utilitzant tècniques de *screening* de cocristalls.
- Caracterització estructural de les noves formes sòlides mitjançant (DSC, TGA, ¹H-RMN, PXRD, SCXRD i DVS).
- Avaluació de les propietats fisicoquímiques de les noves formes sòlides obtingudes mitjançant estudis d'estabilitat, solubilitat, velocitat de dissolució i biodisponibilitat.

3.RESULTATS

La realització d'aquesta tesi doctoral ha permès la publicació de sis articles científics i dos patents, aquests resultats es resumeixen i es detallen a continuació en els següents punts:

3.1 Article 1: L. Bofill, D. de Sande, R. Barbas, R. Prohens. Hydrogen Bond Polarization Overcomes Unfavorable Packing in the Most Stable High Z' Polymorph of Pterostilbene. *Crystal Growth & Design*. **2019**, 19, 5, 2552-2556

Resum: El polimorfisme del compost nutracèutic pterostilbé s'ha discutit mitjançant la resolució de les estructures cristal·lines de les formes II i III mitjançant mètodes d'espai directe. S'han observat efectes de polarització en l'estructura cristal·lina de la forma I coneguda prèviament i s'han discutit les característiques estructurals del polimorf i l'estabilitat relativa entre els polimorfs d'aquest important producte natural.

3.2 Article 2: L. Bofill, D. de Sande, R. Barbas, A. Frontera, R. Prohens. A Late Appearing Polymorph of Nutraceutical Pterostilbene. *CrystEngComm*. **2020**, 22, 4680-4684.

Resum: Aquest article presenta el descobriment d'un nou polimorf de pterostilbé (*late appearing polymorphism*). Les interaccions intermoleculares observades a la nova forma de pterostilbé han estat analitzades mitjançant tècniques computacionals per tal d'explicar la seva major estabilitat enfront de les altres formes ja conegudes de pterostilbé.

3.3 Article 3: L. Bofill, R. Barbas, D. de Sande, M. Font-Bardia, C. Ràfols, J. Albertí i R. Prohens. A Novel Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene. *Crystal Growth & Design*. **2021**, 21, 4, 2315-2323.

Resum: En aquest article es presenta el descobriment i caracterització de noves formes sòlides del compost nutracèutic pterostilbé mitjançant mètodes d'*screening* de cocristalls. D'entre tots els coformadors provats, l'àcid picolínic forma un cocristall amb 10 vegades més biodisponibilitat oral en rates que el pterostilbé comercial. D'aquesta forma el pterostilbé es converteix en un molt bon candidat per a noves formulacions.

3.4 Article 4: L. Bofill, R. Prohens, R. Barbas, A. Frontera. DFT Analysis of Uncommon $\pi\cdots\text{H}$ -Bond Array Interaction in a New Pterostilbene/Theophylline Cocrystal. *Crystal Growth & Design*. **2020**, 20, 10, 6691-6698.

Resum: Aquest article presenta la síntesi i caracterització mitjançant difracció de raigs X en pols del cocrystal de pterostilbé i teofil·lina. Les interaccions intermoleculares del cocrystal es van estudiar computacionalment mitjançant la combinació de la teoria del funcional de densitat (DFT), la teoria quàntica *atoms in molecules* i enfocaments de gràfics d'interacció no covalents (NCI). L'anàlisi va revelar una matriu d'enllaços d'hidrogen $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ que és la primera descripció d'aquest tipus d'interacció en què el sistema π -donador és un doble enllaç.

S'ha estudiat també la participació de la molècula de dissolvent CH_2Cl_2 cocrystal·litzada en les interaccions del tipus $\text{Cl}\cdots\text{Cl}$ i $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ mitjançant càlculs superficials de DFT i superfícies de Hirshfeld. També, s'ha realitzat una recerca a la *Cambridge Structural Database* (CSD) a fi d'investigar si la interacció de matriu $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ és freqüent en altres cocrystals de teofil·lina.

3.5 Article 5: L. Bofill, D. de Sande, R. Barbas, R. Prohens. New Cocrystal of Ubiquinol with High Stability to Oxidation. *Crystal Growth & Design*. **2020**, 20, 8, 5583-5588.

Resum: En aquest article es presenta el disseny i el descobriment d'un nou cocrystal del compost nutracèutic ubiquinol el qual presenta alta resistència a l'oxidació. S'han seleccionat àcids hidroxibenzoics i fenols com coformadors amb l'objectiu de transferir les seves propietats antioxidants al cocrystal i protegir ubiquinol de l'oxidació. El nou cocrystal d'ubiquinol i àcid 3,4-dihidroxibenzoic mostra una estabilitat notablement alta en condicions d'estrès estàndard i ofereix estratègies alternatives de formulació per a un important problema industrial.

3.6 Article 6. L. Bofill, D. de Sande, R. Barbas, R. Prohens New and Highly Stable Cocrystal of Vitamin D₃ for its use in enhanced food supplements. *Crystal Growth & Design*. **2021**, 21, 3, 1418-1423.

Resum: En aquest article es presenta el descobriment i caracterització d'un nou cocristall de vitamina D₃ (colecalfiferol) i resorcinol mitjançant l'*screening* de cocristalls. S'ha estudiat la seva elevada estabilitat envers la llum, la calor i els productes químics presents en les premescles d'aliments animals per tal de desenvolupar una formulació nova i alternativa als mètodes actuals de microencapsulació per protegir la vitamina D de l'oxidació. El nou cocristall mostra una extremada estabilitat, de forma que pot convertir-se en la base de formulacions molt eficients de vitamina D₃.

3.7 Patent WO2019162429A1: La invenció es refereix als cocristalls d'ubiquinol amb àcid 3-Hidroxibenzoic (1:1), cocristall hidratat d'ubiquinol amb àcid 3,4-dihidroxibenzoic (1:1:1) i cocristall d'ubiquinol amb àcid 3,5-dihidroxibenzoic (1:1) on es descriu la seva preparació i el seu ús com a medicament o suplement dietètic.

3.8 Patent WO2020025781A1: La invenció es refereix als cocristalls d'ubiquinona amb àcid 4-Hidroxibenzoic (1:1), cocristall d'ubiquinona amb hidroquinona (2:1), cocristall d'ubiquinona amb orcinol (2:3), cocristall monohidratat d'ubiquinona amb floroglucinol (2:1:1) i cocristall d'ubiquinona amb resorcinol (2:1), es descriu la seva preparació i el seu ús com a medicament o suplement dietètic.

3.1. ARTICLE 1: *Hydrogen Bond Polarization Overcomes Unfavorable Packing in the Most Stable High Z' Polymorph of Pterostilbene.*

Crystal Growth & Design, **2019**, 19, 5, 2552-2556

L. Bofill¹, D. de Sande², R. Barbas², R. Prohens^{1,2}.

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

Hydrogen Bond Polarization Overcomes Unfavorable Packing in the Most Stable High Z' Polymorph of Pterostilbene

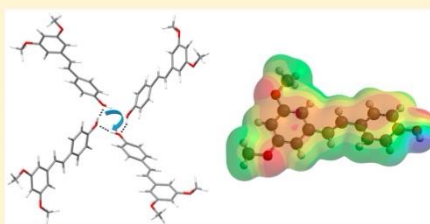
Lidia Bofill,[†] Dafne de Sande,[†] Rafael Barbas,[§] and Rafel Prohens^{*,†,§}

[†]Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., 07121, Palma de Mallorca, Spain

[§]Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The polymorphic landscape of the nutraceutical pterostilbene has been analyzed by solving the crystal structure of forms II and III from PXRD data. Polarization effects in the previously known form I crystal structure have been observed and the structural features of the most stable high Z' polymorph have been discussed in relation to the relative stability between the polymorphs of this important natural product.



In recent years the role of dietary active components in human nutrition has acquired special interest in research due to the increased consciousness of the consumer to maintain proper nutrition. A new product category has emerged from it, which is the nutraceutical compound.¹ The term “nutraceutical” combines two words—“nutrient” (a nourishing food component) and “pharmaceutical” (a medical drug)—and that name was coined in 1989 by Stephen DeFelice, and defined as a “food, or parts of a food, that provide medical or health benefits, including the prevention and treatment of disease.”²

Recent studies have shown promising results for these compounds in various pathological complications such as diabetes,^{3–5} atherosclerosis,⁶ cardiovascular diseases (CVDs),⁷ cancer,⁸ and neurological disorders.^{9,10} There are many classes of nutraceutical compounds found in natural and processed foods, for example, vitamins, carotenoids, flavonoids, curcuminoids, polyunsaturated fatty acids, proteins peptides dietary fibers, oligosaccharides, and minerals.¹¹ Pterostilbene (trans-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) is a naturally occurring stilbenoid classified as a nutraceutical compound¹² which is a dimethyl ether analog of resveratrol. It can be found in different varieties of blueberries, grapes, and wine.^{13,14} In recent years, Pterostilbene has generated special interest due to its perceived health benefits. Several studies have found that it reduces cholesterol,^{5,15–17} regulates blood sugar levels,¹⁸ and acts as an anticarcinogenic agent.¹⁹ On the contrary, it exhibits poor solubility and bioavailability and is easily oxidized by various enzymes.^{12,20} In recent years, as a consequence of this poor solubility, which has produced difficulties with incorporating it as a food supplement or extract, several publications improving it have emerged; one example is the complexation

of Pterostilbene with cyclodextrins.²¹ Pterostilbene (Figure 1) has been described as existing in five polymorphs, and some

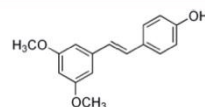


Figure 1. Molecular structure of Pterostilbene.

thermal and stability data between polymorphs have been previously reported.²² Moreover, four cocrystals of Pterostilbene have been described elsewhere with caffeine, carbamazepine, glutaric acid, and piperazine.²³

Due to the importance of this nutraceutical compound, the characterization of its polymorphic landscape is well established. However, not much is known about its crystallographic characteristics since only the crystal structure of form I has been determined so far.²⁴ In this Communication, we have completed the knowledge about the solid state of Pterostilbene by solving the crystal structures of anhydrous forms II and III from PXRD data, and conducted a compared analysis with form I from a packing and intermolecular interactions point of view, which has allowed the assessment of the polymorphs' relative stability with regard to the polarization of hydrogen bond interactions.

The crystal structures of the anhydrous forms II and III were solved by means of direct space strategies from PXRD data and

Received: March 20, 2019

Published: April 1, 2019

share several structural features (Table 1). Both solid forms crystallize with one molecule of Pterostilbene in the

Table 1. Crystallographic Data of Forms I–III of Pterostilbene

Structure	Form I	Form II	Form III
System	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	<i>P21/c</i>	<i>P21/n</i>	<i>P21/c</i>
<i>a, b, c</i> (Å)	15.4310(9)	9.5466(3)	15.7225(8)
	5.7893(3)	4.11726(9)	11.0550(5)
	30.8114(19)	33.6694(13)	7.6201(3)
α, β, γ (deg)	90	90	90
	93.277(2)	93.162(2)	94.025(2)
	90	90	90
Volume (Å ³)	2748.0(3)	1321.39(7)	1321.20(10)
CCDC	1896241	1896242	1896244

asymmetric unit, form II in the *P21/n* and form III in the *P21/c* space group, respectively. The independent molecules in the asymmetric unit of both structures show a very similar molecular conformation with a RMSD value computed using Mercury of 0.292; thus, the subtle differences can be considered as conformational adjustments of the same gas-phase conformer.²⁵ Moreover, the strongest intermolecular interactions present in both structures correspond to the same hydrogen bonds formed between the phenol hydrogen donor and the methoxy oxygen acceptor. However, there are important packing differences between both polymorphs. Thus, while in form II helicoidal chains of self-assembled molecules of Pterostilbene grow along the *b* axis, in form III layers are formed instead through the same zigzag self-assembling motif. Both structures share also a common secondary interaction motif, which pack helices in form II and layers in form III. This motif corresponds to the weak R–OCH₃⋯OH₃–R hydrogen bond (Figure 2).

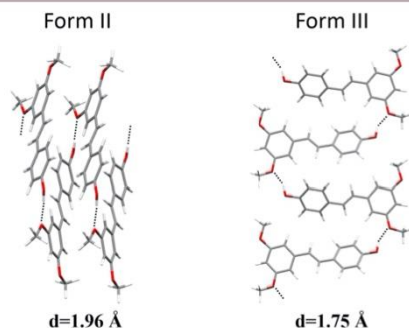


Figure 2. H-bonded aggregates of Pterostilbene in forms II and III. H-bond distances are shown for each form.

The most relevant differences of forms II and III with respect to the previously reported structure of form I is the hydrogen bonding arrangement. Thus, while in form I self-assembling OH⋯OH interactions of the phenol moieties are arranged in a helicoidal fashion (Figure 3), in forms II and III

OH⋯OMethoxy interactions are established in a head-to-tail motif.

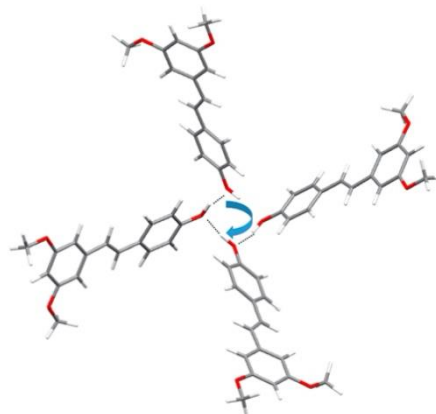


Figure 3. Helicoidal arrangement of Pterostilbene in form I.

Crystal structure of form I previously solved in the *P21/c* space group at 125 K (ref. Code 905140) contains two molecules of Pterostilbene in the asymmetric unit, and in order to compare with forms II and III we have solved its crystal structure at 298 K from PXRDX using direct space methodologies. There are relevant structural differences with respect to the other two polymorphs. First, from a conformational point of view, both symmetry independent molecules of form I correspond to a different gas-phase conformer in which the two methoxy groups are rotated approximately 180° around the O–benzene bond together with other differences in torsions, which produce a RMSD value between molecule 1 of form I and form II and form III of 0.5853 and 0.5849 Å, respectively, on one hand, and a RMSD value between molecule 2 of form I and form II and form III of 0.5966 and 0.5822 Å, respectively, on the other hand.

Table 2 summarizes all the parameters determined to assess the relative stability of the three forms. Interestingly, the

Table 2. Parameters Used to Assess the Relative Stability of Forms I–III of Pterostilbene

	Form I	Form II	Form III
Number of independent molecules (<i>Z'</i>)	2	1	1
Density (mg/m ³)	1.250	1.288	1.288
Packing Coefficient ²⁶	0.76	0.83	0.84
GGA-PBE Lattice Energy ^a	−40.06	−40.72	−40.23
LDA-PWC Lattice Energy ^a	−96.43	−107.46	−108.81

^aLattice energy in kcal/mol.

experimental most stable form is the one with the lowest density and packing coefficient and the highest value of *Z'*. This combination of parameters would suggest form I to be the less stable form.²⁷

However, experimental data discard this assumption. Relative stability of each pair of forms has been determined

from solvent-mediated transformations of 1:1 polymorph mixtures and reveals that forms II and III are metastable to form I. Since equimolar mixtures of forms I/II and I/III convert into pure form I when slurried in heptane at room temperature. Moreover, forms II and III melt and recrystallize at a temperature lower than the melting point of form I (see SI).

Additionally, to assess the relative order of stability, lattice energies were calculated with dispersion-correction DFT methods as provided by the module DMOL³ in Materials Studio²⁸ software at two different levels of computation (GGA and LDA functionals), and the double numerical with polarization (DNP) basis set was used for the structural optimization and energy calculation. The lattice energy for the three polymorphs was computed by using a supercell of 48 molecules and periodic boundary conditions.²⁹

Thus, in both methods form I has the least negative lattice energy, which does not describe correctly the experimental relative stability. However, it has been shown in the literature that GGA functionals describe better than LDA the lattice energy of organic compounds,^{30,31} and according to this method, the difference between form I and form II is only 2.7 kJ/mol. Moreover, a computational study by Day et al.³² showed that since conventional periodic DFT calculations ignore the energetic vibrational contribution to the molecular energy, relative stabilities could change if they were computed with typical values lower than 2 kJ/mol.

Then, in order to find an explanation to this apparent contradiction, we have analyzed the Molecular Electrostatic Potential Surface (MEPS) of hydrogen-bonded aggregates in both self-assembled motifs by computing the hydrogen bond acceptor ability of the donors and acceptors present in the Pterostilbene molecule. This has two different hydrogen bond acceptors with different acceptor ability, the methoxy and the phenol oxygens, and we have extracted from the crystal structures of forms I and II the atomic coordinates of the isolated molecule of both aggregates built with the two different observed supramolecular synthons and used Spartan³³ to calculate the MEPS on the 0.002 Bohr Å⁻³ electron density isosurface using DFT and a B3LYP/6-31G* basis set. Surface Site Interaction Points, which describe the ability of a particular atom to interact as a hydrogen bond donor (defined by the parameter α) or acceptor (defined by the parameter β) were calculated from the MEPS following the approach developed by Hunter and described elsewhere.³⁴

Besides the strong hydrogen bond donor (phenol group $\alpha = 3.5$) two acceptors are present in the molecule of pterostilbene, the methoxy oxygens ($\beta = 3.7$) and the phenol oxygen ($\beta = 4.3$) and thus two possible donor/acceptor combinations are a priori possible in the crystal. Form I shows the best donor/best acceptor combination, while forms II and III show the best donor/second best acceptor combination. However, the strength of this intermolecular contact alone cannot explain the higher stability of form I, since other weak interactions could balance the energy in a better-packed structure as it occurs with forms II and III. Recently, Hunter et al.³⁵ studied enhanced solvation properties of alcohol aggregates and concluded that they are due to an increase in the polarity of the terminal hydroxyl groups on the ends of linear polymeric chains. Thus, guided by this cooperative phenomenon we have calculated the H-bond parameters of aggregates containing up to four units of the two types of hydrogen-bonded motifs observed in the three forms of Pterostilbene.

Figure 4 shows the MEPS of H-bonded tetramers of Pterostilbene calculated from the crystal structures of the three

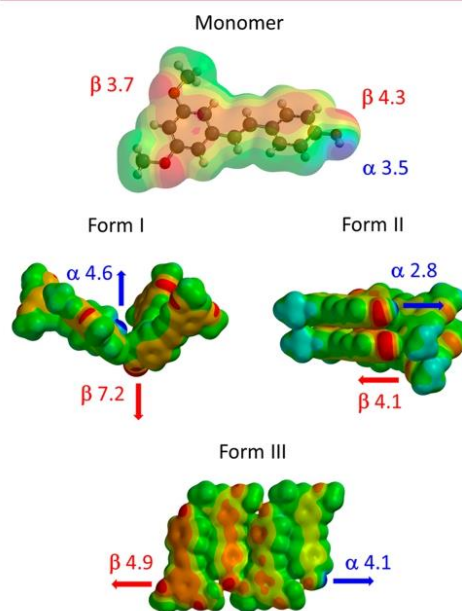


Figure 4. MEPS of the monomer and the tetramers in the three forms of Pterostilbene. H-bond parameters of the terminal groups are shown and red and blue arrows show the direction of acceptor and donor hydrogen bonding, respectively.

polymorphs. As it occurs with alcohols in linear polymers, the phenol engaged in the helicoidal motif of form I increases both the donor and acceptor capability with an asymptotic value reached with the tetramer (see SI). On the other hand, in form II the acceptor H-bond parameter of the terminal methoxy oxygen increases with the number of units in the aggregate, but the donor H-bond parameter decreases in a similar proportion, with the energy of the hydrogen bond interaction, which can be estimated using the product $\alpha\beta$, remaining almost constant. Moreover, in form III both α and β values increase with the number of units in the aggregates but to a lesser extent than in form I (Table S3).

Figure 5 shows the product of the H-bond parameters calculated for the donor (α) and acceptor (β) polar sites in

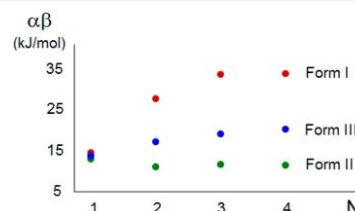


Figure 5. $\alpha\beta$ product as a function of the number of units (N) in the aggregates of the three polymorphs of Pterostilbene.

both types of aggregates, which is a measure of the strength of the intermolecular contact, being significantly higher in form I.

Thus, these data demonstrate that an enthalpic polarization effect can compensate the entropic penalty in the packing frustration of form I when failing to fill up the voids created in the helicoidal motif and be a strong driving force to stabilize very inefficient crystal packing in the most stable polymorph of Pterostilbene.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.cgd.9b00374.

Crystal data and structure characterization of the solids: DSC and TGA thermograms, PXRD diffractograms of Pterostilbene Forms I, II, and III (PDF)

Accession Codes

CCDC 1896241–1896242 and 1896244 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, or by emailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: rafel@ccit.uib.edu.

ORCID

Rafael Barbas: 0000-0002-1603-3689

Rafel Prohens: 0000-0003-0294-1720

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Joaquín Ortega (Universitat de les Illes Balears) for his help with lattice energy calculations and Dr. Mercè Font-Bardia (University of Barcelona) for X-ray measurements.

■ REFERENCES

- Kalra, E. Nutraceutical definition and introduction. *AAPS PharmSci.* **2003**, *5*, 1–2.
- Aronson, J. K. Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2017**, *83*, 8–19.
- Davi, G.; Santilli, F.; Patrono, C. Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovasc. Ther.* **2010**, *28*, 216–226.
- Modak, M.; Dixit, P.; Londhe, J.; Ghaskadby, S.; Paul, T. Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2007**, *40*, 163–173.
- Bhakkialakshmi, E.; Sireesh, D.; Sakthivadivel, M.; Sivasubramanian, S.; Gunasekaran, P.; Ramukmar, K. M. Anti-hyperlipidemic and anti-peroxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *777*, 9–16.
- Massaro, M.; Scoditti, E.; Carluccio, M. A.; Caterina, R. Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: focus on ω -3 polyunsaturated fatty acids and mediterranean diet polyphenols. *Cardiovasc. Ther.* **2010**, *28*, 13–19.
- Mokbel, A. E.; Ferns, G. A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *J. Nutr. Metab.* **2012**, *1*–16.
- Nobili, S.; Lippi, D.; Witort, E.; Donnini, M.; Bausi, L.; Minia, E.; Capaccioli, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.* **2009**, *59*, 365–378.
- Sun-Edelstein, C.; Mausekopp, A. Alternative headache treatments: nutraceuticals, behavioral and physical treatments. *Headache* **2011**, *51*, 469–483.
- Tarnopolsky, M. A.; Flint Beal, M. Potential for creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders. *Ann. Neurol.* **2001**, *49*, 561–574.
- McClements, D. J.; Li, F.; Xiao, H. The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2015**, *6*, 299–327.
- Bethune, S. J.; Schultheiss, N.; Henck, J. Improving the Poor Aqueous Solubility of Nutraceutical Compound Pterostilbene through Cocrystal Formation. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 2817–2823.
- Ren, G.; Rimando, A. M.; Mathews, S. T. AMPK activation by pterostilbene contributes to suppression of hepatic gluconeogenic gene expression and glucose production in H4IIE cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *498*, 640–645.
- Alarcón de la Lastra, C.; Villegas, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1156–1160.
- Mazed, M. A.; Mazed, S. Nutritional supplement for the prevention of cardiovascular disease, alzheimer's disease, diabetes, and regulation and reduction of blood sugar and insulin resistance. U. S. Patent 2009/0252796 A1.
- Rimando, A. M.; Nagamani, R.; Feller, D. R.; Yokoyama, W. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3403–3407.
- Riche, D. M.; Riche, K. D.; Blackshear, C. T.; McEwen, C. L.; Sherman, J. J.; Wofford, M. R.; Griswold, M. E. Pterostilbene on metabolic parameters: a randomized, double-blind, and placebo-controlled trial. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* **2014**, *2014*, 1–8.
- Amarnath Satheesh, M.; Pari, L. Effect of pterostilbene on lipids and lipid profiles in streptozotocin–nicotinamide induced type 2 diabetes mellitus. *J. Appl. Biomed.* **2008**, *6*, 31–37.
- McCormack, D.; McFadden, D. Pterostilbene and cancer: current review. *J. Surg. Res.* **2012**, *173*, 53–61.
- Tsai, H.; Ho, C.; Chen, Y. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *25*, 134–147.
- Nicolás, J. M. L.; Bonilla, P. R. L. M. Cazorla and F. G. Carmona. Physicochemical Study of the complexation of Pterostilbene by natural and modified cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5294–5300.
- Mahesh, M.; Subbaraju, V. G.; Ivanisevic, I.; Andres, M.; Stephens, K. Solid forms of Pterostilbene. International Patent WO 2010/141107 A1.
- Schultheiss, N.; Bethune, S. Pterostilbene cocrystals. International Patent WO 2011/097372 A2.
- Rossi, M.; Caruso, F.; Antonioletti, R.; Viglianti, A.; Traversi, G.; Leone, S.; Basso, E.; Cozzi, R. Scavenging of hydroxyl radical by resveratrol and related natural stilbenes after hydrogen peroxide attack on DNA. *Chem.-Biol. Interact.* **2013**, *206*, 175–185.
- Cruz-Cabeza, A. J.; Bernstein, J. Conformational polymorphism. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2170–2191.
- Dunitz, J. D.; Filippini, G.; Gavezzotti, A. A statistical study of density and packing variations among crystalline isomers. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6595–6601.
- Steed, K. M.; Steed, J. W. Packing problems: high Z' crystal structures and their relationship to cocrystals, inclusion compounds, and polymorphism. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2895–2933.
- Materials Studio*, v 7.0, Accelrys Software, Inc., 2013.
- Curnan, M. T.; Kitchin, J. R. Investigating the energetic ordering of stable and metastable TiO₂ polymorphs using DFT+U and hybrid functionals. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 21060–21071.

- (30) Feigl, C.; Russo, S. P.; Barnard, A. S. A comparative density functional theory investigation of the mechanical and energetic properties of ZnS. *Mol. Simul.* **2011**, *37*, 321–333.
- (31) Stampfl, C.; Mannstadt, W.; Asahi, R.; Freeman, A. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **2001**, *63*, 155106.
- (32) Nyman, J.; Day, G. M. Static and lattice vibrational energy differences between polymorphs. *CrystEngComm* **2015**, *17*, 5154–5165.
- (33) *Spartan'10*, v 1.1.0.; Wavefunction, Inc., Irvine, CA, 2010.
- (34) Calero, C. S.; Farwer, J.; Gardiner, E. J.; Hunter, C. A.; Mackey, M.; Scuderi, S.; Thompson, S.; Vinter, J. G. Footprinting molecular electrostatic potential surfaces for calculation of solvation energies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 18262–18273.
- (35) Henkel, S.; Misuraca, M. C.; Troselj, P.; Davidson, J.; Hunter, C. A. Polarisation effects on the solvation properties of alcohols. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 88–99.

3.2. ARTICLE 2: Novel Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene.

Cryst. Growth Des. **2021**, *21*, 4, 2315-2323.

L. Bofill¹, R. Barbas², D. de Sande², M. Font-Bardia³, C. Ràfols⁴, J. Albertí, R.¹ Prohens^{1,2}.

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

³Unitat de Difracció de Raigs X, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Espanya

⁴ Departament de Enginyeria Química i Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Espanya

A Novel, Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene

Lidia Bofill, Rafael Barbas, Dafne de Sande, Mercè Font-Bardia, Clara Ràfols, Joan Albertí, and Rafel Prohens*

Cite This: *Cryst. Growth Des.* 2021, 21, 2315–2323

Read Online

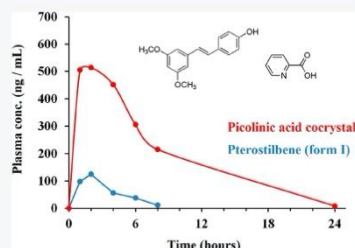
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: New multicomponent solid forms of the nutraceutical pterostilbene have been discovered and characterized through experimental cocrystal screening. Among the cofomers tested, picolinic acid formed a cocrystal with a 10-fold enhancement of oral bioavailability in rats, which converts the new cocrystal into a very promising candidate for new formulations of pterostilbene with improved performance.



1. INTRODUCTION

Nutraceutical ingredients are natural compounds, usually extracted and purified from both food and nonfood plants.¹ In recent years, nutraceuticals have been experienced an increased interest because their presumed safety and potential therapeutic effects allow health claims as food supplements with a variety of health benefits for humans and animals.²

Pterostilbene (*trans*-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) is a phytoalexin found in fruits such as grapes, deerberries, blueberries, and peanuts and in wine.^{3,4} It has been evidenced that pterostilbene may have preventive and therapeutic properties in a long list of human diseases which include neurological,^{5,6} cardiovascular,^{7,8} metabolic,^{9,10} and hematologic disorders.^{11,12} In addition, it has been reported that it can act as a nontoxic modulator of anticancer response in drugs such as sertraline and gefitinib.¹³

Pterostilbene is known to exist as a variety of polymorphs, and the crystal structures of forms I–IV have been reported recently by some of us.^{14,15} It is structurally similar to resveratrol, another nutraceutical present in red wine but with a better human bioavailability probably due to its higher lipophilicity,¹⁶ which has motivated their use as dietary supplements claiming antioxidant,¹⁷ anti-inflammatory,¹⁸ and anticarcinogenic properties.¹⁹ However, in the search for a safe formulation of a nutraceutical it is desirable to have a further increase in bioavailability because this allows reduction of as much as possible the side effects by reducing the dosage. For instance, it has been recently reported that pterostilbene could cause an increment of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol²⁰ in humans. Thus, a more bioavailable formulation of pterostilbene could preserve the health benefits with a reduced effect of known or unknown side effects.

In this sense, the use of crystal engineering approaches has produced successful and promising case studies of both nutraceutical and pharmaceutical compounds with bioavailability enhancement.^{21,22} This is because each solid form of a drug compound shows unique properties and some of them can offer certain advantages with regard to solubility and dissolution rate, which converts cocrystal formation into a viable strategy toward improving the pharmacokinetic data of active ingredients. Thus, the discovery of multicomponent solid forms of nutraceuticals is currently a very active field of research which requires the selection of acceptable cofomers in order to form cocrystals with the nutraceutical having suitable physicochemical properties.²³

Moreover, the importance of the cofomer is not just structural (i.e., a compound able to reduce the free energy of the system by establishing strong intermolecular interactions and favoring efficient packing) since its role as a counter partner can provide to the new entity not only with advantageous physicochemical properties but also with the ability to generate potential synergetic health benefits in a single solid form that can also be exploited.²⁴

On the other hand, due to the low solubility of pterostilbene, the development of potential new oral formulations has been focused on increasing the aqueous solubility of this compound

Received: December 21, 2020

Revised: February 23, 2021

Published: March 3, 2021



by using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a complexing agent²⁵ or by cocrystal formation²⁶ using as cofomers piperazine and caffeine²⁷ and carbamazepine and glutaric acid.²⁸ Actually, the commercial pterostilbene:caffeine cocrystal PUREENERGY has been commercially available in the US market for years (Chromadex, USA).

In this manuscript we report the discovery and characterization of eight pterostilbene cocrystals by following a multicomponent solid form experimental screen. Among the new forms, a picolinic acid cocrystal showed a remarkable enhancement in both dissolution profile and bioavailability, which makes it a very promising candidate for more efficient formulations at a lower dosage of this important nutraceutical compound.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials. Pterostilbene was purchased from Dynveo. Details of the purification and characterization of pterostilbene (form II) can be found in the Supporting Information. The cofomers picolinic acid, ethylenediamine, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, 1,4-dimethylpiperazine, theophylline, and 2,3,5-trimethylpyrazine were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Methods. **2.2.1. Cofomer Selection.** A list of 58 cofomers with potentially acceptable toxicity were tested (see section 1.1 in the Supporting Information for further details). We recently reported²⁴ the molecular electrostatic potential surface (MEPS) computed at the DFT level of computation, and it revealed that the pterostilbene molecule has highly negative values of MEPS located at the O atoms of the methoxy and phenol groups and a highly positive value at the phenolic H atom, as expected (Figure 1). Thus, when its dual

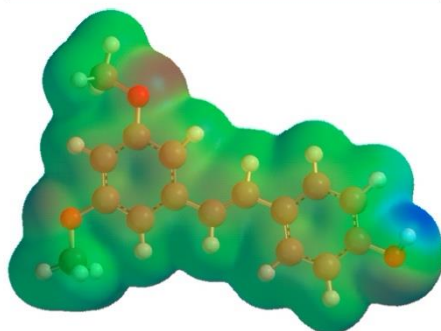


Figure 1. MEPS of pterostilbene on the $0.002 \text{ bohr } \text{\AA}^{-3}$ electron density isosurface calculated with Spartan²⁹ at the DFT level of computation using a B3LYP/6-31G* basis set. Red and blue isosurfaces represent negative and positive values of MEP.

electrostatic nature is taken into account, cofomers having both strong hydrogen bond donor and acceptor groups such as carboxylic acids, hydroxybenzoic acids, phenols, and amine compounds, having the potential to interact satisfactorily with the methoxy and phenol functional groups of pterostilbene, were chosen.

2.2.2. Solubility Determination. In order to choose the most suitable solvents in which the screening would be performed, a qualitative determination of solubility in 30 solvents was conducted for both pterostilbene (form II) and each cofomer. Pterostilbene (20 mg, 0.078 mmol) was suspended in each solvent, using a maximum volume of 2.0 mL at room temperature. When the sample was not soluble, the temperature was increased to a maximum of 90 °C. In this

qualitative solubility determination, solvents are classified as soluble, insoluble, or partially soluble at each temperature (see section 1.2 in the Supporting Information). The same procedure has been followed with all of the cofomers, and for this study mainly solvents in which both components (pterostilbene and cofomer) were partially soluble at 25 °C were selected to be tested in the grinding experiments.

2.2.3. Cocrystal Screening Methodologies. **2.2.3.1. Grinding Methodologies.** Screening through net grinding (with liquid cofomers) and liquid-assisted grinding experiments (LAG) was conducted by grinding 20–50 mg of a 1:1 mixture of pterostilbene and each cofomer together with one drop of different solvents using a Retsch MM 2000 grinding mill. The samples were placed in 2 mL volume stainless steel jars, along with two stainless tungsten grinding balls of 3 mm diameter. Grinding was performed for 15–30 min, with a mill frequency of 30 Hz. Finally, the samples were collected immediately without prior drying for PXRD analysis. The formation of a new solid form was determined by comparing PXRD patterns of the starting materials (any known crystal form of both pterostilbene and each cofomer) and the LAG experiment products.

2.2.3.2. Reaction Crystallization Methodology. When evidence of new forms was detected, reaction crystallization experiments (RC) were conducted by preparing a saturated solution of the most soluble component (pterostilbene or cofomer) in a suitable solvent in a sealed vial under stirring. A small quantity of the less soluble component was added until it did no longer dissolve. The suspension was stirred at different times, and the resulting solids were filtered and analyzed by PXRD.

2.2.3.3. Solvent-Mediated Transformation Methodology. Screening through solvent-mediated transformations (SMT) was conducted by preparing suspensions of pterostilbene and the cofomer in different molar ratios (40–300 mg of the final mixture) in suitable solvents. The sealed vials were stirred for different times, and the resulting solids were filtered and analyzed by PXRD.

2.2.3.4. Solution Crystallization Methodologies. Solutions of pterostilbene and cofomer mixtures in different molar ratios (20–1100 mg of the final mixture) were prepared in different solvents at 25 °C and heated (to 50 or 60 °C) in a stainless steel heating block. The heater was switched off, and the solutions were slowly cooled to 25 °C inside the heating block. The samples that did not crystallize were tightly sealed and kept at 4–8 or 25 °C until precipitation was observed.

2.2.3.5. Preparation of the New Solid Forms: Scale-up Batches. Experimental procedures for the preparation of picolinic acid and ethylenediamine cocrystals have been optimized, and several scale up batches were prepared for dissolution rate and pharmacokinetics studies. A summary of the experimental procedures can be found in Table S1 in the Supporting Information.

2.2.4. X-ray Crystallographic Analysis. Single-crystal X-ray diffraction (SCXRD) intensity data of the different crystal forms of pterostilbene were collected using a D8 Venture system equipped with a multilayer monochromator and a Mo microfocus ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a SAINT algorithm. Data were corrected for absorption effects using the multiscan method (SADABS).³⁰ The structure was solved and refined using the Bruker SHELXTL software package, a computer program for the automatic solution of crystal structures, and refined by a full-matrix least-squares method with ShelXle Version 4.8.0, a Qt graphical user interface for the SHELXL computer program.³¹

Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns were obtained on a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer in transmission configuration using Cu $K\alpha_{1,2}$ radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) with a focusing elliptical mirror and a PIXcel detector working at a maximum detector active length of 3.347°. Configuration of the convergent beam with a focalizing mirror and a transmission geometry with a flat sample sandwiched between low-absorbing films measuring from 2 to 40° in 2θ , with a step size of 0.026° and a total measurement time of 8–30 min at room temperature (298 K). The powder diffractogram of the picolinic acid cocrystal was indexed, the lattice parameters were refined by means of LeBail fits using Diccvol04,³² and the space group

Table 1. Crystal Data of the Different Cocrystal Forms of Pterostilbene

	coformer				
	ethylenediamine	DABCO	TCTD	1,4-DMP	2,3,5-TMP
empirical formula	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₆	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₆
formula wt	286.34	614.75	356.45	313.38	634.74
temp (K)	100(2)	100(2)	100(2)	100(2)	100(2)
cryst syst	monoclinic	monoclinic	monoclinic	monoclinic	triclinic
space group	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n
a (Å)	11.3119(3)	27.1201(16)	8.4888(3)	10.4766(4)	7.9098(9)
b (Å)	5.13890(10)	6.1642(4)	11.2401(5)	6.6402(3)	9.2397(10)
c (Å)	26.6010(8)	21.6656(13)	19.8309(9)	25.5452(12)	23.359(3)
α (deg)	90	90	90	90	83.699(5)
β (deg)	101.0990(10)	112.389(2)	95.955(2)	93.391(2)	88.189(5)
γ (deg)	90	90	90	90	79.3189(5)
V (Å ³)	1517.41(7)	3348.9(4)	1881.95(14)	1773.98(13)	1666.6(3)
Z	4	4	4	4	2
calcd density (Mg/m ³)	1.253	1.239	1.258	1.173	1.265
final R indices (I > 2σ(I))	R1 = 0.0375, wR2 = 0.0912	R1 = 0.0779, wR2 = 0.2067	R1 = 0.0437, wR2 = 0.1049	R1 = 0.0475, wR2 = 0.1318	R1 = 0.0759, wR2 = 0.1397
CCDC	2017899	2017892	2017897	2017896	2017895

was determined from the systematic absences. A summary of crystal data and relevant refinement parameters is given in Table 1.

2.2.5. Differential Scanning Calorimetry (DSC). Differential scanning calorimetry analysis was carried out by means of a Mettler-Toledo DSC-822e calorimeter. Experimental conditions: aluminum crucibles of 40 μL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 °C/min. The calorimeter was calibrated with indium of 99.99% purity (mp 156.5 °C, ΔH = 28.42 J/g).

2.2.6. Thermogravimetric Analysis (TGA). Thermogravimetric analysis was performed on a Mettler-Toledo TGA-851e thermobalance. Experimental conditions: alumina crucibles of 70 μL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 °C/min.

2.2.7. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded on a Varian Mercury 400 instrument (400 MHz). Chemical shifts for protons are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane and are referenced to residual protons in the NMR solvents (dmsd-*d*₆, δ 2.50; acetone-*d*₆, δ 2.05; chloroform-*d*, δ 7.26). Experimental conditions, delay, 1 s; pulse, 45°; scans, 32.

2.2.8. Dissolution Rate Determination. The small-scale GI dissolution method³³ was followed for dissolution rate measurements. First, tablets of 3 mm diameter were made using a manual hydraulic tablet press (Applied Measurements Ltd., U.K.). The applied pressure was 100 kg for 2 min. A 10–15 mg portion of the compound, pterostilbene or cocrystals, was weighed. The total exposed surface area was 0.5 cm².

Dissolution tests were performed in FaSSIF v2 medium (pH 6.5 using phosphoric acid 28.4 mM) with a GpKa titrator (Sirius Analytical Instruments, U.K.). Dissolution data were recorded for 120 min at 25 °C. The procedure was as follows: 15 mL of FaSSIF v2 medium was placed in the sample vial containing the tablet. Spectral collection started immediately after. Spectra were collected every 30 s between 250 and 450 nm through a Sirius D-PAS spectrometer with a bifurcated optic fiber dip probe (Hellma Analytics). The medium was stirred at a constant rate. The spectroscopic data were converted to the concentration of pterostilbene by applying the Beer–Lambert law using the molar extinction coefficient of pterostilbene determined in FaSSIF v2 by UV-metric titration. Spectral regions where the signal was saturated (*A* > 1.5) or presented medium interferences were discarded. Then, the concentration data were converted into absolute sample quantities and used to generate the graphs showing the sample quantity vs time.

The dissolution rate was obtained through the fit of the first-order Noyes–Whitney exponential equation to the data: $[X]_t = S(1 - e -$

$k_d(t - t_0))$. In this equation, $[X]$ is the weight in grams of compound in solution at the experiment time (min), S is its extrapolated solubility (g), k_d is the rate constant for dissolution (min⁻¹), and t_0 (min) is a term allowing for a temporal offset. S , k_d , and t_0 are refined in order to minimize the root-mean-square deviation between the modeled concentrations and the measured concentrations. The dissolution rate (g min⁻¹) is given by the product $k_d S$.

2.2.9. Rat Pharmacokinetics. Pharmacokinetic study in rats was conducted at the Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia (UTOX-PCB, Parc Científic de Barcelona, Spain). This pharmacokinetic study was carried in compliance with the current guidelines and animal handling protocols reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee of the Parc Científic de Barcelona.

Ten male Sprague–Dawley rats (~420 g) were used in the study and kept in overnight fasting state before administrations. Formulations of pterostilbene (20 mg/kg, free basis) and a pterostilbene:picolinic acid cocrystal (20 mg/kg, 13.5 mg/kg pterostilbene) were prepared as aqueous suspensions in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC). Both formulations were administered by oral gavage (10 mL/kg body weight). Blood samples (~0.3 mL) taken from the tail vein were collected in EDTA-K₃ tubes at predose and 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h after administration and centrifuged at 1500g for 10 min to obtain plasma. Plasma samples were stored at -70 °C until UHPLC-MS/MS analysis.

2.2.10. Plasma Bioanalysis. Concentrations of pterostilbene in rat plasma samples were determined at the Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry (University of Barcelona, Spain) by ultrahigh-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

Plasma samples (100 μL) were processed using protein precipitation with acetonitrile (1000 μL). After vortex treatment (30 s) and centrifugation (4800 rpm for 15 min), supernatants were evaporated to dryness under an N₂ stream and reconstituted in 200 μL of methanol/0.025% ammonia (3/1, v/v) and transferred to an autosampler vial. The UHPLC-MS/MS measurements were carried out on an Open Accela UHPLC instrument (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), equipped with a quaternary pump and a CTC autosampler. The UHPLC instrument was coupled to a TSQ Quantum Ultra AM triple-quadrupole mass analyzer (Thermo Fisher Scientific), equipped with hyperbolic quadrupoles and a heated-electrospray ionization (H-ESI) source. Chromatography consisted of a Kinetex C18 column (100 mm × 4.6 mm, 2.6 μm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) at room temperature with a gradient elution mode using 0.025% ammonia aqueous solution (solvent A) and methanol (solvent B) at a flow rate of 0.5 mL/min.

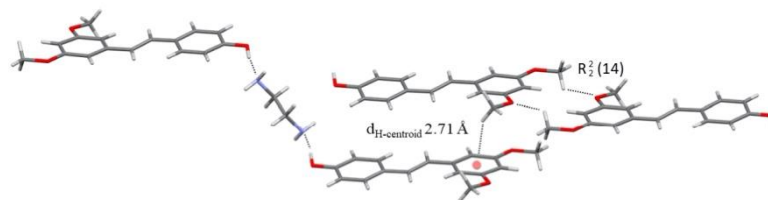


Figure 2. Crystal structure of pterostilbene:ethylenediamine cocrystal. Some of the most relevant interactions have been represented.

Quantitation of pterostilbene was based on multiple reaction monitoring in negative ESI (electrospray ionization) mode (m/z 255 \rightarrow 240). The lower limit of quantitation was 5 ng/mL, and the linear calibration range was 5–1000 ng/mL.

2.2.11. Pharmacokinetic Analysis. Pharmacokinetic analysis was performed by noncompartmental methods using the Kinetics version 5 software (Alfasoft Limited, Luton, U.K.).

2.3. Synthesis and Characterization of the New Cocrystals.

We have performed a comprehensive cocrystal screen with a set of coformers, which includes a broad array of compounds (see section 1.1 in the Supporting Information) from a variety of 28 organic solvents, which produced 634 individual crystalline solids (see Table S1 in the Supporting Information). Evidences of new solid phases with 37 out of all the coformers tested (see Table S1 in the Supporting Information) with net grinding or LAG experiments were detected. On the other hand, cocrystal formation with 7 out of all the coformers tested, picolinic acid, ethylenediamine, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, 1,4-dimethylpiperazine, 2,3,5-trimethylpyrazine, and theophylline, was confirmed through reaction crystallization and solvent-mediated transformation experiments. As a result of the cocrystal screen 8 new multicomponent solid forms were discovered with 7 out of the 58 coformers tested.

Synthesis details of bulk powder and single crystals together with characterization of pterostilbene cocrystals can be found in sections 2–4 in the Supporting Information. The stoichiometry was assessed on the basis of NMR data when the crystal structure was not available. TGA was used to confirm or discard the presence of water/solvent in the structure. Qualitative comparisons of PXRD diffractograms of bulk cocrystals and those simulated from the cif files were conducted in order to confirm the identity of the crystal form, and they are shown in the Supporting Information. Differences are due to the thermal dilatation, since the crystal structures were solved at 100 K while the PXRD diagrams were obtained at 298 K.

2.3.1. Pterostilbene:Picolinic Acid Cocrystal (1:1). The bulk powder was obtained by reaction crystallization in toluene at 25 °C. The 1:1 stoichiometry was compatible with the integration of the most relevant ^1H NMR signals in chloroform and with the volume calculated from PXRD indexed cell parameters ($a = 15.920(1)$ Å, $b = 9.5200(8)$ Å, $c = 12.870(1)$ Å, $\beta = 100.345(7)^\circ$, $V = 1918.7(3)$ Å³, $R_{\text{wp}} = 6.68\%$).

2.3.2. Pterostilbene:Ethylenediamine Cocrystal (2:1). The bulk powder was obtained by slow evaporation of a solution of pterostilbene in ethylenediamine at 25 °C. According to its crystal structure it can be attributed to a new form containing a half-molecule of ethylenediamine per one molecule of pterostilbene.

2.3.3. Pterostilbene:Ethylenediamine:Water Cocrystal Hydrate (2:1:2). The bulk powder was obtained by slurrying pterostilbene in ethylenediamine during a scale-up process at 25 °C. The 2:1:2 stoichiometry was compatible with the integration of the most relevant ^1H NMR signals in chloroform and with the volume calculated from PXRD indexed cell parameters ($a = 26.745(3)$ Å, $b = 5.1961(4)$ Å, $c = 22.971(2)$ Å, $\beta = 100.526(6)^\circ$, $V = 3138.5(6)$ Å³, $R_{\text{wp}} = 7.99\%$). The amount of water was determined by TGA.

2.3.4. Pterostilbene:DABCO Cocrystal (2:1). The bulk powder was obtained by reaction crystallization in xylene at 25 °C. According to

its crystal structure it can be attributed to a new form containing one molecule of DABCO per two molecules of pterostilbene.

2.3.5. Pterostilbene:1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane Cocrystal (2:1). The bulk powder was obtained by slow evaporation in chloroform at 25 °C. According to its crystal structure it can be attributed to a new form containing a half-molecule of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane per one molecule of pterostilbene.

2.3.6. Pterostilbene:1,4-Dimethylpiperazine Cocrystal (2:1). The bulk powder was obtained by slurrying pterostilbene in 1,4-dimethylpiperazine at 25 °C. According to its crystal structure it can be attributed to a new form containing a half-molecule of 1,4-dimethylpiperazine per one molecule of pterostilbene.

2.3.7. Pterostilbene:Theophylline:DCM Cocrystal Solvate (1:1:1). The bulk powder was obtained by reaction crystallization in dichloromethane at 25 °C. According to its crystal structure it can be attributed to a new form containing one molecule of theophylline and one molecule of dichloromethane per 1 molecule of pterostilbene. This cocrystal is the subject of a computational study we have reported elsewhere.²⁴

2.3.8. Pterostilbene:2,3,5-Trimethylpyrazine cocrystal (2:1). The bulk powder was obtained by slurrying pterostilbene in 2,3,5-trimethylpyrazine at 25 °C. According to its crystal structure it can be attributed to a new form containing a half-molecule of 2,3,5-trimethylpyrazine per one molecule of pterostilbene.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Crystal Structure Analysis. The crystal structures of the ethylenediamine, DABCO, 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, 1,4-dimethylpiperazine, and 2,3,5-trimethylpyrazine cocrystals were solved by single crystal X-ray diffraction. Single crystals of the picolinic acid cocrystal of suitable quality could not be obtained; thus, we indexed a good-quality powder diffractogram obtained from a pure polycrystalline material and refined the lattice parameters by means of LeBail fits. A 1:1 stoichiometry was deduced from ^1H NMR experiments and the indexed cell volume.

3.1.1. Crystal Structure of the Pterostilbene:Ethylenediamine Cocrystal. The crystal structure has one molecule of pterostilbene and a half-molecule of ethylenediamine in the asymmetric unit (Figure 2). As expected, a strong hydrogen bond is established between the pterostilbene phenol group and the primary amine. Moreover, $\text{CH}\cdots\pi$ interactions established between the methoxy hydrogens and the dimethoxy aromatic ring ($d_{\text{H-centroid}} = 2.71$ Å) and between methoxy hydrogens and benzene hydrogens with phenol aromatic ring ($d_{\text{H-centroid}} = 2.89$ and 2.96 Å, respectively), together with methoxy–methoxy interactions forming an $R_2^2(14)$ supramolecular synthon, are the most relevant secondary forces in the crystal.

3.1.2. Crystal Structure of the Pterostilbene:DABCO Cocrystal. The crystal structure has two molecules of pterostilbene and one molecule of DABCO in the asymmetric unit (Figure 3). Again, a strong hydrogen bond is established

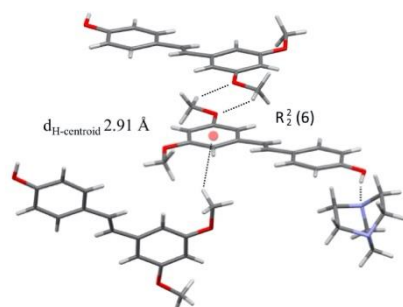


Figure 3. Crystal structure of the pterostilbene:DABCO cocrystal. Some of the most relevant interactions have been represented.

between the pterostilbene phenol group and the primary amine, together with $\text{CH}\cdots\pi$ interactions established between the methoxy hydrogens and the dimethoxy aromatic ring ($d_{\text{H-centroid}} = 2.91 \text{ \AA}$). Moreover, a $R_2^2(6)$ supramolecular synthon is established between methoxy groups. Static disorder is present in the DABCO molecule, and two different positions have been determined with different occupancy factors (52.4% and 46.7%, respectively).

3.1.3. Crystal Structure of the Pterostilbene:1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane Cocrystal. The crystal structure has one molecule of pterostilbene and a half-molecule of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane in the asymmetric unit (Figure 4). Each tetraamine molecule establishes strong hydrogen bonds with pterostilbene phenol groups by using two of the four nitrogen atoms, forming 2:1 sandwich-type assemblies, which are packed in a linear fashion.

3.1.4. Crystal Structure of Pterostilbene:1,4-Dimethylpiperazine Cocrystal. The crystal structure has one molecule of pterostilbene and a half-molecule of 1,4-dimethylpiperazine in the asymmetric unit (Figure 5). Both nitrogen atoms of the piperazine ring establish strong hydrogen bonds with pterostilbene phenol groups, and the $\text{CH}\cdots\pi$ interactions are in this case established between the methoxy hydrogens and the phenol aromatic ring ($d_{\text{H-centroid}} = 2.73 \text{ \AA}$). Again, a $R_2^2(6)$ supramolecular synthon is formed between methoxy groups. Interestingly, methoxy groups are in the less stable configuration, which is in a counterclockwise direction with the methoxy groups pointing to opposite directions.

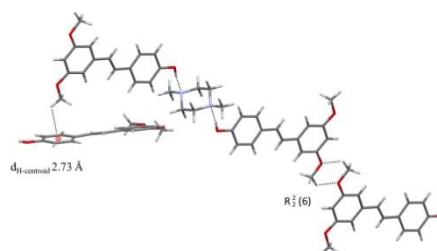


Figure 5. Crystal structure of the pterostilbene:1,4-dimethylpiperazine cocrystal. Some of the most relevant interactions have been represented.

3.1.5. Crystal Structure of the Pterostilbene:2,3,5-Trimethylpyrazine Cocrystal. The crystal structure has two molecules of pterostilbene (one having the methoxy groups in a clockwise and the other in a counterclockwise configuration) and one molecule of 2,3,5-trimethylpyrazine in the asymmetric unit (Figure 6). Similarly to previous

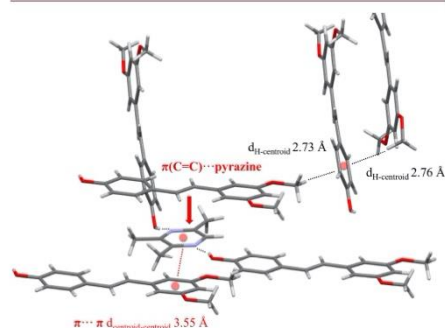


Figure 6. Crystal structure of the pterostilbene:2,3,5-trimethylpyrazine cocrystal. Some of the most relevant interactions have been represented.

structures, both nitrogen atoms of the pyrazine ring establish strong hydrogen bonds with pterostilbene phenol groups. Remarkably, an uncommon $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{pyrazine}$ ring inter-

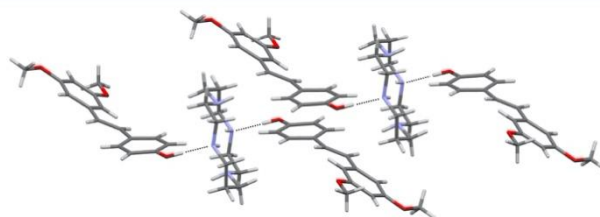


Figure 4. Crystal structure of the pterostilbene:1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane cocrystal. Some of the most relevant interactions have been represented.

action (distances between the pyrazine centroid and the carbon atoms of the double bond are 3.37 and 3.41 Å) is established between the surface of the pterostilbene double bond, which is π -basic (electron rich), and that of the pyrazine ring, which is particularly π -acidic (electron poor) due to the strong hydrogen bonds formed with the phenol groups. Actually, a similar synergistic effect has been computationally studied in pyrazine complexes, where anion- π interactions are reinforced as a consequence of halogen bonds established by the nitrogen atoms.³⁴ Moreover, $\pi \cdots \pi$ interactions are established between the dimethoxy aromatic ring and the pyrazine ring ($d_{\text{centroid-centroid}}$ 3.55 Å). Finally, $\text{CH} \cdots \pi$ interactions are established between the methoxy hydrogens and the phenol aromatic ring ($d_{\text{H-centroid}}$ = 2.73 and 2.76 Å, respectively).

3.2. Dissolution Profiles. In order to gather some basic information about the effect of the coformer on the dissolution rate, two of the new cocrystals having GRAS status and different chemical functionalities were chosen for a preliminary dissolution profile determination. Ethylenediamine and picolinic acid cocrystals were tested in FaSSIF v2 medium together with pterostilbene form I and the commercial caffeine cocrystal for comparative purposes. Figure 7 shows their

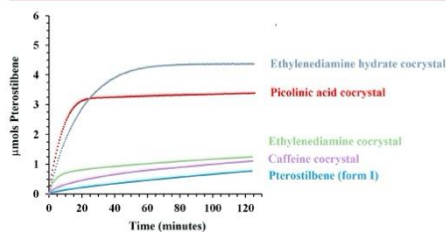


Figure 7. Average dissolution rate profiles of pterostilbene form I (blue), pterostilbene:caffeine cocrystal (purple), pterostilbene:picolinic acid cocrystal (red), anhydrous pterostilbene:ethylenediamine cocrystal (green), and pterostilbene:ethylenediamine hydrate cocrystal (gray).

average dissolution rate curves. While in tablets of pure pterostilbene the amount of pterostilbene in solution is still increasing after 120 min of dissolution, the cocrystals dissolve at a higher rate, reaching a concentration plateau after 20 and 60 min for picolinic acid and ethylenediamine cocrystals, respectively. The amount of pterostilbene in solution achieved with the dissolution of the cocrystals is 3–4 times higher than the amount reached after 2 h of dissolution of the pure compound. Although the ethylenediamine cocrystal takes longer to reach the final pterostilbene concentration, the solution obtained through the dissolution of this cocrystal is the one that contains a greater amount of dissolved pterostilbene.

Table 2 shows the dissolution rate of the studied solid forms measured in the UV range of 300–400 nm (for pterostilbene) and 350–400 nm (for the cocrystals), obtained in a 50 min time frame.

As expected, these exploratory data confirmed that very water-soluble coformers increase greatly the solubility of pterostilbene cocrystals and suggested that the bioavailability could also be favorably affected.²⁷

Table 2. Dissolution Rate of Pterostilbene Form I and Its Caffeine, Picolinic Acid, and Ethylenediamine Cocrystals

solid form	dissolution rate (nmol/min)
pterostilbene (form I)	13.2 ± 2
pterostilbene:picolinic acid cocrystal	427.8 ± 30
pterostilbene:ethylenediamine hydrate cocrystal	230.4 ± 27
pterostilbene:ethylenediamine cocrystal	176.1 ± 13
pterostilbene:caffeine cocrystal	45.4 ± 9

3.3. Pharmacokinetics Study. We decided to focus on the picolinic acid cocrystal (rather than the amine cocrystals) because the promising dissolution profile together with its GRAS status made it a good candidate for a potential formulation. Picolinic acid is an endogenous metabolite of L-tryptophan (TRP), which has been reported to possess health benefits such as neuroprotective, immunological, and anti-proliferative properties.³⁵ It is inexpensive, safe, and the most important human chelator for metal ions, such as Zn^{2+} and Fe^{3+} . Moreover, chromium picolinate is used as a dietary supplement that may promote weight loss.³⁶

The mean plasma pterostilbene concentration:time profiles after oral administration of commercial pterostilbene (20 mg/kg) and pterostilbene:picolinic acid cocrystal (20 mg/kg, 13.5 mg as pterostilbene) are represented in Figure 8. The

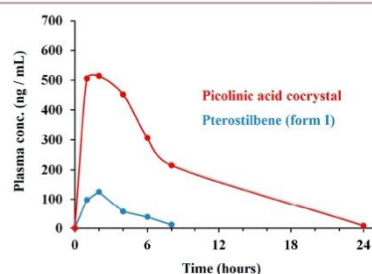


Figure 8. Pharmacokinetic profiles of pterostilbene in male SD rats following a single oral administration of pterostilbene form I (20 mg/kg) and pterostilbene:picolinic acid cocrystal (20 mg/kg, 13.5 mg as pterostilbene). Mean values ($n = 5$).

pharmacokinetic parameters of pterostilbene after oral administration of commercial pterostilbene (20 mg/kg) and pterostilbene:picolinic acid cocrystal (20 mg/kg, 13.5 mg as pterostilbene) are summarized in Table 3. The systemic exposure to pterostilbene was 4.5-fold and 6.7-fold greater in C_{max} and AUC_{inf} in spite of the fact that the cocrystal dose was not equimolar with that of commercial pterostilbene. The variability in the t_{max} value was higher for the cocrystal formulation and ranked from 1 to 6 h, which translated into a greater variability in the C_{max} values found in comparison to the commercial pterostilbene.

The relative oral bioavailability (pterostilbene dose corrected) was 9.9-fold higher following administration as a cocrystal, which was in agreement with the substantial increase in the solubility rate observed for this cocrystal in the dissolution test conducted in FaSSIF medium. These results demonstrate that the aqueous solubility of pterostilbene plays a key role in its oral absorption.

Table 3. Pharmacokinetic Parameters of Pterostilbene after Single Oral Administration of Pterostilbene form I (20 mg/kg) and Pterostilbene:Picolinic Acid Cocrystal (20 mg/kg, 13.5 mg as Pterostilbene)^a

formulation	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{0-t} (ng h/mL)	AUC _{inf} (ng h/mL)	F _{rel}
pterostilbene	124.8 ± 39.3	2 (2–2)	3.7 ± 2.0	575 ± 295	712 ± 294	
pterostilbene: picolinic acid cocrystal	567.8 ± 284.2	2 (1–6)	3.3 ± 1.2	4699 ± 3089	4772 ± 3054	9.9

^aMean values ± SD (n = 5). t_{max} is the median (minimum–maximum). F_{rel} is calculated using normalized doses for pterostilbene; F_{rel} = (AUC_{inf,cocrystal}/(13.5 mg/kg))/(AUC_{inf,ptero}/(20 mg/kg)).

In comparison, the oral administration of a commercial pterostilbene:caffeine cocrystal (1:1)²⁸ (PUREENERGY, Chromadex, USA) provided a modest increase of 1.5-fold on the oral availability of pterostilbene versus a commercial pterostilbene.³⁷ Therefore, the pterostilbene:picolinic acid cocrystal (1:1) developed in this study is an excellent solid oral formulation with an excellent potential to maximize the oral absorption of pterostilbene.

Following intravenous administration of different doses of pterostilbene (2.5, 10, and 25 mg/kg) to rats, this compound showed dose-dependent pharmacokinetics. This lack of dose proportionality was the cause for around a 2-fold reduction in the systemic clearance at higher doses. This clearance reduction can be explained by a saturation of the major phase II elimination pathway of pterostilbene in rats, leading to a limited elimination of pterostilbene at higher doses.³⁸

The oral bioavailability in the fasted state of different formulations of pterostilbene has been widely studied in the literature.^{25,37–39} Following oral administration of pterostilbene, the estimation of the absolute oral bioavailability was highly variable and dependent on the formulation used, the oral doses administered, and the pharmacokinetic intravenous data used in calculations. This is consistent with the dose-dependent proportionality showed by pterostilbene after oral and intravenous administration. The absolute oral bioavailability ranged from 59% (15 mg/kg) to 116% (60 mg/kg) on administration as a hydroxypropyl-β-cyclodextrin formulation³⁸ and from 67% (56 mg/kg) and 94% (168 mg/kg) on administration in 0.5% methylcellulose–0.2% Tween 80 suspensions.³⁹ This high variability observed between studies must be evaluated in the context of the lack of dose proportionality showed by pterostilbene after administration of high oral doses. Therefore, for a proper estimation of the absolute oral bioavailability of pterostilbene, one needs to take into account the systemic exposure (AUC_{inf}) obtained by an intravenous route as a reference value, which should be on the same order as that found after oral administration. In the two previous publications,^{37,39} the AUC_{inf} value after the intravenous route used in calculations was substantially lower than that obtained after administration of oral doses greater than 10 mg/kg; therefore, the absolute oral bioavailabilities of these formulations at those doses were clearly overestimated.

Although the intravenous pharmacokinetics in rats of pterostilbene was not evaluated in this study either as such or in the cocrystal, we can estimate the absolute oral bioavailability of the pterostilbene:picolinic acid cocrystal, taking as a reference the systemic exposure observed (AUC_{inf}) described in the literature.^{38,39} After an intravenous administration of 10 mg/kg,³⁸ the observed AUC_{inf} value (2812 ng h/mL) was comparable to that found after oral administration (13.5 mg/kg as pterostilbene) of our cocrystal (AUC_{inf} 4699 ng h/mL), which provides an absolute oral bioavailability of 125%. When the same exercise is conducted with the intravenous PK data (11.2 mg/kg) obtained by Kapetanovic

et al.³⁹ with an AUC_{inf} value of 4090 ng h/mL, the estimated absolute oral bioavailability of pterostilbene with our cocrystal would be 97%. These results confirm that the oral bioavailability of pterostilbene in rats following administration of the pterostilbene:picolinic acid cocrystal (1:1) is excellent and is close to 100%, which makes it the best potential solid oral formulation of pterostilbene.

4. CONCLUDING REMARKS

Nutraceutical compounds offer a long list of potential health benefits for humans, and in particular pterostilbene has been involved in important scientific studies intended to explore its application in different areas of health. However, the low bioavailability of many nutraceutical compounds has hindered an efficient application of their potential health benefits in humans. Our work demonstrates that crystal engineering can be very suitable to approach this intrinsic problem associated with lipophilic compounds in the form of a cocrystal. Following oral administration to rats, the pterostilbene:picolinic acid cocrystal (1:1) increased by 9.9-fold the relative oral bioavailability of pterostilbene in comparison with its commercial oral solid form. These results confirm that the oral disposition of this cocrystal is excellent and the cocrystal has a great potential to be one of the best oral solid formulations for pterostilbene in humans.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.cgd.0c01716>.

Materials and experimental methods, synthesis and characterization of the new forms, and crystal data and structure refinement (PDF)

Accession Codes

CCDC 2017892, 2017895–2017897, and 2017899 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, or by emailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Rafel Prohens – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain; Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0003-0294-1720; Email: rafel@ccitub.edu

Authors

Lidia Bofill – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Rafael Barbas – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0002-1603-3689

Dafne de Sande – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Mercè Font-Bardia – Unitat de Difracció de Raigs X, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Clara Rafols – Departament de Enginyeria Química i Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0001-7811-986X

Joan Alberti – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.cgd.0c01716>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI) for financial support (Neotec SNEO-20161021/CRYSTACURE project).

REFERENCES

- (1) Shi, J. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies*, 2nd ed.; CRC Press: 2015.
- (2) Bagchi, D.; Preuss, H. G.; Swaroop, A. *Nutraceuticals and Functional Foods in Human Health and Disease Prevention*, 1st ed.; CRC Press: 2015.
- (3) Roupe, K. A.; Remsberg, C. M.; Yáñez, J. A.; Davies, N. M. Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2006**, *1*, 81–101.
- (4) Ruiz, M. J.; Fernández, M.; Picó, Y.; Mañes, J.; Asensi, M.; Carda, C.; Asensio, G.; Estrela, J. M. Dietary Administration of High Doses of Pterostilbene and Quercetin to Mice Is Not Toxic. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3180–3186.
- (5) Poulou, S. M.; Thanthaeng, N.; Miller, M. G.; Shukitt-Hale, B. Effects of pterostilbene and resveratrol on brain and behaviour. *Neurochem. Int.* **2015**, *89*, 227–233.
- (6) Chang, J.; Rimando, A.; Pallas, M.; Camins, A.; Porquet, D.; Reeves, J.; Shukitt-Hale, B.; Smith, M. A.; Joseph, J. A.; Casasdesus, G. Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuro-modulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 2062–2071.
- (7) Park, E.; Lim, Y.; Hong, J.; Yoo, H.; Lee, C.; Pyo, M.; Yun, Y. Pterostilbene, a natural dimethylated analog of resveratrol, inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation by blocking Akt-dependent pathway. *Vasc. Pharmacol.* **2010**, *53*, 61–67.
- (8) Zhang, L.; Zhou, G.; Song, W.; Tan, X.; Guo, Y.; Zhou, B.; Jing, H.; Zhao, S.; Chen, L. Pterostilbene protects vascular endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Apoptosis* **2012**, *17*, 25–36.
- (9) Sathesh, M. A.; Pari, L. The antioxidant role of pterostilbene in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1483–1490.
- (10) Riche, D. M.; Riche, K. D.; Blackshear, C. T.; McEwen, C. L.; Sherman, J. J.; Wofford, M. R.; Griswold, M. E. Pterostilbene on metabolic parameters: a randomized, double-blind, and placebo-controlled trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2014**, *2014*, 1–8.
- (11) Mikstácká, R.; Rimando, A. M.; Ignatowicz, E. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65* (1), 57–63.
- (12) Youdim, K. A.; Shukitt-Hale, B.; MacKinnon, S.; Kalt, W.; Joseph, J. A. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2000**, *1523*, 117–122.
- (13) Schmidt, L.; Baskaran, S.; Johansson, P.; Padhan, N.; Matuszewski, D.; Green, L. C.; Elfineh, L.; Wee, S.; Häggblad, M.; Martens, U.; Westermarck, B.; Forsberg-Nilsson, K.; Uhrbom, L.; Claesson-Welsh, L.; Andäng, M.; Sintorn, L.; Lundgren, B.; Lönnstedt, I.; Krona, C.; Nelander, S. Case-specific potentiation of glioblastoma drugs by pterostilbene. *Oncotarget*. **2016**, *7* (45), 73200–73215.
- (14) Bofill, L.; de Sande, D.; Barbas, R.; Frontera, A.; Prohens, R. A late appearing polymorph of nutraceutical pterostilbene. *CrystEngComm* **2020**, *22*, 4680–4684.
- (15) Bofill, L.; de Sande, D.; Barbas, R.; Prohens, R. Hydrogen Bond Polarization Overcomes Unfavorable Packing in the Most Stable High Z' Polymorph of Pterostilbene. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 2552–2556.
- (16) Liu, Y.; You, Y.; Lu, J.; Chen, X.; Yang, Z. Recent Advances in Synthesis, Bioactivity, and Pharmacokinetics of Pterostilbene, an Important Analog of Resveratrol. *Molecules*. **2020**, *25* (5166), 1–20.
- (17) Chakraborty, A.; Gupta, N.; Ghosh, K.; Roy, P. In vitro evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative and anti-oxidant properties of pterostilbene isolated from *Pterocarpus marsupium*. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1215–1228.
- (18) Lin, W.; Valorie Leland, J. V.; Ho, C.; Pan, M. Occurrence, Bioavailability, Anti-inflammatory, and Anticancer Effects of Pterostilbene. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 12788–12799.
- (19) McCormack, D.; McFadden, D. Pterostilbene and Cancer: Current Review. *J. Surg. Res.* **2012**, *173*, 53–61.
- (20) Dellinger, R. W.; Santos, S. R.; Morris, M.; Evans, M.; Alminana, D.; Guarente, L.; Marcotulli, E. Repeat dose NRPT (nicotinamide riboside and pterostilbene) increases NAD⁺ levels in humans safely and sustainably: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *NPJ. Aging and Mechanisms of Disease*. **2017**, *3*, 1–9.
- (21) Smith, A. J.; Kavuru, P.; Wojtas, L.; Zavorotko, M. J.; Shytle, D. Cocrystals of Quercetin with Improved Solubility and Oral Bioavailability. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 1867–1876.
- (22) Smith, A. J.; Kavuru, P.; Arora, K. K.; Kesani, S.; Tan, J.; Zavorotko, M. J.; Shytle, D. Crystal Engineering of Green Tea Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Cocrystals and Pharmacokinetic Modulation in Rats. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 2948–2961.
- (23) Sinha, A. S.; Maguire, A. R.; Lawrence, S. E. Cocrystallization of Nutraceuticals. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15*, 984–1009.
- (24) Bofill, L.; Prohens, R.; Barbas, R.; Frontera, A. DFT analysis of uncommon π -H-bond arrays in a new Pterostilbene/Theophylline cocrystal. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20*, 6691–6698.
- (25) Azzolini, M.; La Spina, M.; Mattarei, A.; Paradisi, C.; Zoratti, M.; Biasutto, L. Pharmacokinetics and tissue distribution of pterostilbene in the rat. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58* (11), 2122–2132.
- (26) Vasisth, K.; Chadha, K.; Karan, M.; Bhalla, Y.; Kumar Jena, A.; Chadha, R. Enhancing biopharmaceutical parameters of bioflavonoid quercetin by cocrystallization. *CrystEngComm* **2016**, *18*, 1403–1415.
- (27) Bethune, S. J.; Schultheiss, N.; Henck, J. O. Improving the Poor Aqueous Solubility of Nutraceutical Compound Pterostilbene through Cocrystal Formation. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (7), 2817–2823.
- (28) Schultheiss, N. C. Pterostilbene cocrystals. US Patent 2011/0189277A1, 2011.
- (29) *Spartan'10*, v 1.1.0.; Wavefunction, Inc.: Irvine, CA, 2010.

- (30) SADABS; Bruker AXS: Madison, WI, USA, 2004. SAINT, *Software Users Guide*, Ver. 6.0; Bruker AXS: Madison, WI, USA, 1999. SADABS v2.03; *Area-Detector Absorption Correction*; University of Gottingen: Gottingen, Germany, 1999. Saint, Ver. 7.60A; Bruker AXS: Madison, WI, USA, 2008. SADABS, V. 2008-1; Bruker AXS: Madison, WI, USA, 2008.
- (31) Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122.
- (32) Boultif, A.; Louër, D. Indexing of powder diffraction patterns for low-symmetry lattices by the successive dichotomy method. *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 987–993.
- (33) Gravestock, T.; Box, K.; Comer, J.; Frake, E.; Judge, S.; Ruiz, R. The “GI dissolution” method: a low volume, in vitro apparatus for assessing the dissolution/precipitation behaviour of an active pharmaceutical ingredient under biorelevant conditions. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 560–567.
- (34) Estarellas, C.; Frontera, A.; Quiñonero, D.; Deyà, P. M. Theoretical Study on Cooperativity Effects between Anion– π and Halogen-Bonding Interactions. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2742–2750.
- (35) Grant, R. S.; Coggan, S. E.; Smythe, G. A. The Physiological Action of Picolinic Acid in the Human Brain. *Int. J. Tryptophan Res.* **2009**, *2*, IJTR.S2469.
- (36) Cai, S.; Sato, K.; Shimizu, T.; Yamabe, S.; Hiraki, M.; Sano, C.; Tomioka, H. Antimicrobial activity of picolinic acid against extracellular and intracellular *Mycobacterium avium* complex and its combined activity with clarithromycin, rifampicin and fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57* (1), 85–93.
- (37) Jain, R. Pterostilbene caffeine Co-Crystal: Bioavailable caffeine alternative enriched with pterostilbene. *Matrix Sci. Med.* **2020**, *4* (1), 24–26.
- (38) Yeo, S. C. M.; Ho, P. C.; Lin, H. S. Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: the impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation and dosing route on bioavailability. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57* (6), 1015–1025.
- (39) Kapetanovic, I. M.; Muzzio, M.; Huang, Z.; Thompson, T. N.; McCormick, D. L. Pharmacokinetics, oral bioavailability and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *68* (3), 593–601.

3.3. ARTICLE 3: DFT Analysis of Uncommon $\pi\cdots H$ -Bond Array Interaction in a New Pterostilbene/Theophylline Cocrystal.

Cryst. Growth Des. **2020**, 20, 10, 6691-6698.

L. Bofill¹, R. Prohens^{1,2}, R. Barbas², A. Frontera³.

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

³Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Crta de Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Espanya.

DFT Analysis of Uncommon $\pi\cdots\text{H}$ -Bond Array Interaction in a New Pterostilbene/Theophylline Cocrystal

Lidia Bofill, Rafel Prohens,* Rafael Barbas, and Antonio Frontera*

Cite This: *Cryst. Growth Des.* 2020, 20, 6691–6698

Read Online

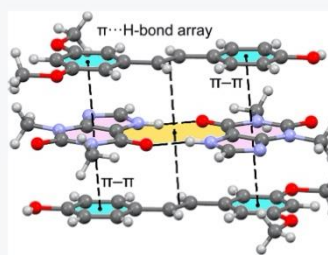
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: A new cocrystal formed between the nutraceutical compounds pterostilbene and theophylline was synthesized and X-ray characterized in the form of a dichloromethane solvate. An interesting supramolecular assembly is formed by means of a combination of common and uncommon π - π and H-bonding interactions. It was computationally studied by a combination of density functional theory (DFT), quantum theory of "atoms-in-molecules", and noncovalent interaction plot approaches, and the analyses revealed a $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ -bond array interaction, which is the first description of this type of interaction where the donor π -system is a double bond. The participation of the cocrystallized CH_2Cl_2 solvent molecule in $\text{Cl}\cdots\text{Cl}$ and $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ interactions was also studied using DFT and Hirshfeld surface calculations. The Cambridge structural database was inspected to investigate whether the $\pi\cdots\text{H}$ -bond array interaction is common in other theophylline cocrystals. Other examples where the π -system of an aromatic ring or an amido group interact with the H-bond array were found in literature and further discussed herein.



INTRODUCTION

Cocrystals between two compounds with benefits for humans, such as pharmaceutical and nutraceutical active ingredients, are currently explored as a strategy to generate potential synergetic health benefits.¹ In this sense, a cocrystal between theophylline (a methylxanthine compound, used to treat asthma, which can be found in foods such as tea, coffee, or chocolate)² and pterostilbene (a phytoalexin present in fruits such as grapes, deerberries, blueberries, peanuts, with preventive and therapeutic properties in human diseases)^{3,4} is a potential candidate for bringing together in a single solid form several health benefits simultaneously. Although a relevant body of knowledge about intermolecular interactions is available for the scientific community to design new cocrystals, strategies based on aromatic interactions are usually less followed than those based on the most easily predicted hydrogen bonds.⁵ Moreover, among the great deal of interactions involving aromatic rings (cation- π , anion- π , lone pair- π , C-H- π , σ -hole- π , etc.), one particular and less-explored case is the stacking interaction between H-bonding arrays. Several authors^{6,7} have given X-ray structural and theoretical evidence for π -stacking in a variety of H-bonded dimers, including some evidence regarding the fact that π -stacking strengthens the hydrogen bonds.⁷ Particularly relevant is that describing the interaction between 9-ethyladenine molecule and the Hoogsteen H-bonding array formed from an imide-type receptor and a second adenine molecule.⁶ A particular case of this type of interactions is formed by salt bridges (i.e., guanidinium- \cdots carboxylate groups), which are planar and adequate for

establishing efficient interactions with π -systems, as was observed in some biological systems.⁸ For example, such assembly was described in the feruloyl esterase module of xylanase (between tyrosine and the H-bonding array formed by a nearby arginine and aspartate).⁹ Moreover, Smithrud et al.^{10,11} have demonstrated using synthetic hosts that the formation of salt bridges is favored in water in the presence of aromatic rings due to the formation of salt bridge- $\cdots\pi$ interactions.⁸

In this article, we report the synthesis, X-ray characterization, and density functional theory (DFT) study of a pterostilbene/theophylline cocrystal that presents interesting $\pi\cdots\text{H}$ -bond array interactions in combination with more conventional π - π stacking interactions and hydrogen bonds. In fact, theophylline forms self-assembled planar dimers via intermolecular N-H- \cdots O hydrogen bonds [$R_2^2(10)$ motif] that are sandwiched by two pterostilbene molecules, constructing interesting supramolecular assemblies that were analyzed in detail using DFT calculations and characterized by means of a combination of the quantum theory of "atoms-in-molecules" (QTAIM)¹² and the noncovalent interaction plot (NCIplot)

Received: June 19, 2020

Revised: August 20, 2020

Published: August 20, 2020



index¹³ computational tools. The formation of uncommon π ...H-bond array stacking interaction involving the π -system of pterostilbene (central double bond) is described and rationalized using the map of electrostatic potential (MEP) surface analysis. Finally, the Cambridge structural database (CSD) was inspected to investigate if this type of bonding is common in other theophylline crystal structures.

RESULTS AND DISCUSSION

The new pterostilbene/theophylline cocrystal was obtained in the course of a cocrystal screen (which is the subject of another research paper focused on physicochemical properties of pterostilbene cocrystals) in the form of a dichloromethane solvate. Its crystal structure was solved at 100 K and shows a monoclinic cell with a 1:1:1 stoichiometry (see Table 1 and

Table 1. Crystallographic Data and Refinement Details of the Pterostilbene/Theophylline Cocrystal

structure	crystal form
system	monoclinic
space group	C2/c
<i>a</i> (Å)	20.0576(10)
<i>b</i> (Å)	10.1851(5)
<i>c</i> (Å)	25.6891(11)
α (deg)	90
β (deg)	106.925(2)
γ (deg)	90
volume (Å ³)	5020.7(4)
<i>Z</i> , density	8, 1.380
CCDC	2010505

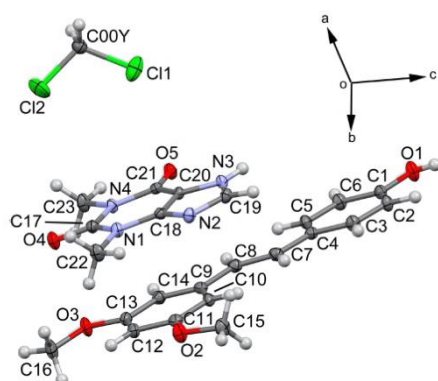


Figure 1. Asymmetric unit of the cocrystal with atom numbering scheme. Ellipsoids drawn at the 50% probability level.

Figure 1). Thermogravimetric analysis shows a weight loss of 14.3%, which is compatible with the dichloromethane desolvation. A differential scanning calorimetry thermogram shows a broad endothermic phenomenon corresponding to desolvation followed by the melting of a new phase. However, it was not possible to isolate the cocrystal in its anhydrous form neither through cocrystallization in a different solvent nor

through desolvation at high temperature. In fact, desolvation at 80 °C produced a solid which showed diffraction peaks of theophylline together with some unidentified peaks (see Supporting Information), indicating that the cocrystal collapses partially once the dichloromethane is removed with recrystallization of the individual components. This suggested the solvent has a structural role in the stabilization of the new cocrystal. A deep analysis of the X-ray crystal structure shows a complex array of hydrogen bonds and aromatic interactions together with secondary halogen–halogen interactions, which motivated us to study computationally the diversity of intermolecular forces present in the crystal.

Thus, the theoretical DFT study (see Supporting Information for details) is devoted to analyze the remarkable H-bonding and π -stacking interactions observed in the cocrystal and focusing on cooperativity effects and the π ...H-bond array stacking interactions. First of all, we have computed the MEP surface of the theophylline dimer (see Figure 2a) to investigate

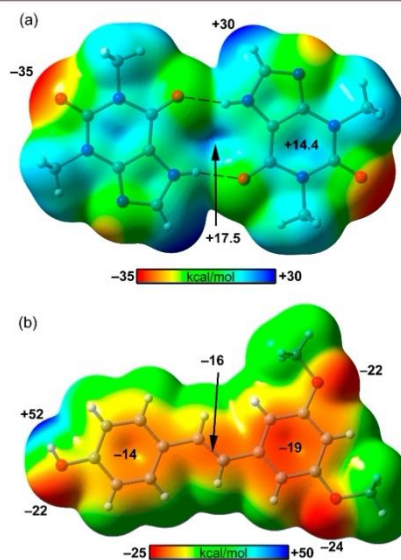


Figure 2. MEP surfaces (surface envelope 0.001 au) of theophylline dimer (a) and pterostilbene (b) at the PBE1PBE-D3/def2-TZVP level of theory. The values at selected points of the surfaces are given in kcal/mol.

the electrophilic/nucleophilic nature of the H-bond array and the π -acidity/basicity of the theophylline rings. A survey of the CSD (version 5.41 with updates to November 2019) revealed that 4 out of 14 crystal structures of theophylline polymorphs, solvates, and salts and 36 out of 92 cocrystals show the theophylline dimer (see Supporting Information for a complete list of crystal structures), indicating a high prevalence of this supramolecular synthon. It can be observed that the MEP value is positive over the $R_2^2(10)$ motif (+17.5 kcal/mol), thus adequate for interacting with electron-rich species. Remarkably, it is more positive than the MEP value over the

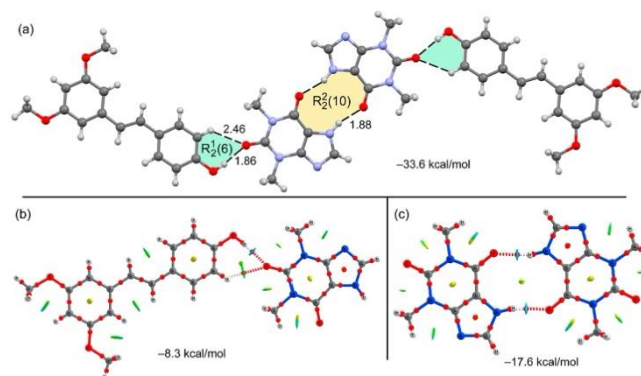


Figure 3. (a) Partial view of the tetrameric H-bonded assembly of the cocrystal. Distances in Å. (b) Distribution of bond and ring CPs (red and yellow spheres, respectively) and the NCIplot isosurface using the gradient cutoff of 0.5 au and color scale $-0.04 < \rho < 0.04$ au.

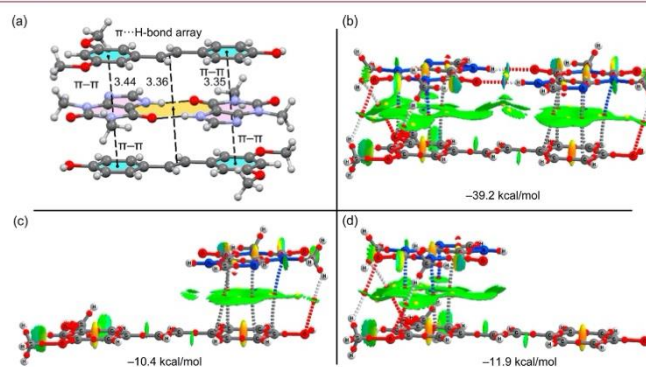


Figure 4. (a) Partial view of the tetrameric π - π assembly of the cocrystal. Distances in Å. (b) Distribution of bond and ring CPs (red and yellow spheres, respectively) and the NCIplot isosurface of several models of the X-ray structure (b-d) using the gradient cutoff of 0.5 au and color scale $-0.04 < \rho < 0.04$ au.

centers of the theophylline six-membered ring (+14 kcal/mol). Therefore, the self-assembled dimer provides an extended π -conjugated/H-bonded surface that presents positive MEP and is thus adequate for establishing π -stacking interactions with electron-rich surfaces. The MEP maximum is located at the H-atom of the C-H group belonging to the five-membered ring of theophylline. The minimum MEP value is located, as expected, at the O-atom that is not participating in the H-bonding interaction (-35 kcal/mol). The MEP surface of pterostilbene is represented in Figure 2b. In this case, the whole aromatic surface, including the conjugated double bond, is electron-rich (negative MEP values), being slightly more negative than the electron-rich dimethoxy-substituted six-membered ring. The MEP value over the exocyclic double bond is -16 kcal/mol. The most negative values of MEP are located at the O-atoms of the methoxy and phenol groups with the most positive one at the phenolic H-atom, as previously reported.¹⁴

Figure 3a shows a partial view of the X-ray structure of the cocrystal showing a tetrameric assembly. In the middle, the homodimer of theophylline shows the $R_2^2(10)$ motif generated via two symmetrically equivalent N-H \cdots O H-bonds. This dimer interacts via the available O-atoms with two adjacent pterostilbene molecules via the phenol groups, establishing two strong O-H \cdots O and two ancillary C-H \cdots O H-bonds [$R_2^1(6)$ motifs]. The binding energy of the whole assembly is large (-33.6 kcal/mol), thus confirming the strong nature of the H-bonds that govern the formation of the assembly. We have analyzed separately both motifs in order to compare the interaction energies of both motifs and analyze possible cooperativity effects (to investigate if the formation of the $R_2^2(10)$ motif influences the strength of the $R_2^1(6)$ motif and vice versa). Figure 3b shows the QTAIM distribution of critical points (CPs) and bond paths overlapped with the NCIplot of the $R_2^1(6)$ motif. Each H-bond is characterized by a bond CP (red sphere) and bond path interconnecting the H- and O-

atoms. The NCIPlot also shows the corresponding isosurfaces, which are small and blue for the O–H...O H-bond and green for the C–H...O, thus confirming their strong and weak nature, respectively. Figure 3c shows the QTAIM/NCIPlot representation of the homodimer, where the O–H...N H-bonds are characterized by the corresponding bond CPs, bond paths, and blue isosurfaces connecting the H-atoms to the N-atoms. The computed dimerization energies are -8.3 kcal/mol for the heterodimer and -17.6 kcal/mol for the homodimer, and the sum of the energies of the three motifs [one $R_2^2(10)$ and two $R_2^1(6)$ motifs] that govern the formation of the tetramer is -34.2 kcal/mol, which is almost identical to the formation energy of the tetramer (-33.6 kcal/mol), thus revealing the lack of cooperativity in this H-bonding network.

In addition to the H-bonding interactions mentioned above, the cocrystal also forms tetrameric assemblies where two pterostilbene molecules are stacked to the opposite sides of the theophylline dimer, as represented in Figure 4a. The formation of such assemblies in the solid state is in good agreement to the MEP surfaces shown in Figure 2, as the surface of the pterostilbene is π -basic (electron-rich) and that of the theophylline dimer is π -acidic (electron-poor). Therefore, the π - π interactions between both moieties are expected to be electrostatically favored. We have computed the formation energy of the ternary assembly shown in Figure 4b, which is very large and negative due to the formation of the H-bonds and π - π interactions. It can be observed that the QTAIM analysis shows several bond CPs connecting the π -systems of both molecules and also the methyl groups. Moreover, the NCIPlot shows two extended green isosurfaces located between the theophylline rings and the pterostilbene molecules, thus characterizing the π -stacking interaction. We have evaluated separately the interaction energy of the dimers shown in Figure 4b,c, and it can be observed that the stacking energy with the electron-rich dimethoxyphenyl ring is around 1.5 kcal/mol more stable than that with the phenol ring, in agreement with the MEP surface. It is worth emphasizing the large interaction energies of these π -stacking complexes [even larger than the $R_2^1(6)$ motif interaction energy shown in Figure 3b], thus confirming their relevance in the stability of the cocrystal. At this point, it is convenient to clarify that this work uses the term π - π interaction to define the interaction between the rich aromatic rings of pterostilbene and the electron-poor π -system of theophylline. However, several authors¹⁵ do not recommend the utilization of the terms " π -stacking" and " π - π interaction" because they do not accurately describe the forces that drive association between aromatic molecules. In this work, this term is simply used to describe the stacking between any aromatic ring and theophylline without any implications about the forces that dominate the interaction. A recent discussion on the nature of π - π and its importance in solid-state chemistry was also reported by Saha's group.¹⁶ Moreover, the contributions of different crystal packing forces in π -stacking were recently reviewed by Molcanov et al.¹⁷ Interestingly, these authors emphasize that aromaticity is not a *sine qua non* condition for stacking. In fact, attractive interactions are the strongest between rings with little or no π -electron delocalization and the weakest between rings with fully delocalized aromatic π -systems.

The NCIPlot of the heterotrimer shown in Figure 4a shows the presence of a green isosurface located between the double bond and the H-bond array, thus confirming the existence of a weak noncovalent interaction. We have constructed a model

based on the X-ray structure where both the phenol and dimethoxybenzene rings were replaced by H-atoms. Therefore, in this model (see Figure 5), only the $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ -bond array

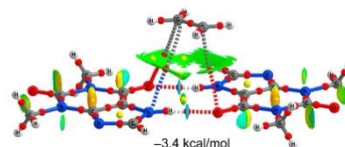


Figure 5. Theoretical model to estimate the $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ -bond array interaction, distribution of bond and ring CPs (red and yellow spheres, respectively), and the NCIPlot isosurface using the gradient cutoff of 0.5 au and color scale $-0.04 < \rho < 0.04$ au.

is evaluated as we have considered this model as a dimer and the self-assembled H-bonded $R_2^2(10)$ motif as a monomer (single molecular entity). The QTAIM analysis shows three bond CPs connecting three atoms of the $R_2^2(10)$ motif to the C-atoms of the ethene molecule. The dimerization energy is favorable (-3.4 kcal/mol), thus evidencing that the $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ -bond array interaction is energetically attractive, as also confirmed by the color of the NCIPlot isosurface.

The presence of the cocrystallized solvent was analyzed, too. The dichloromethane molecules are involved in two different intermolecular environments. First, a short CH... π interaction is established between the aromatic ring of the bismethoxy moiety of pterostilbene and the dichloromethane hydrogens acting as a stopper of the potential infinite and alternate π -stacked arrangement of pterostilbene/theophylline sandwiches (see Figure 6a). Additionally, dimers of dichloromethane are

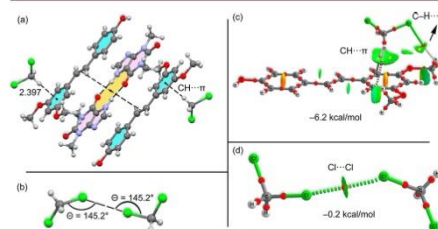


Figure 6. (a) Partial view of the cocrystal showing the dichloromethane molecules interacting with the tetrameric π - π assembly. (b) Detail of the C–Cl...Cl angles. (c) Distribution of bond and ring CPs (red and yellow spheres, respectively) and (d) NCIPlot isosurface using the gradient cutoff of 0.5 au and color scale $-0.04 < \rho < 0.04$ au.

formed through typical halogen–halogen type I interactions ($\Theta = 145.2^\circ$) (Figure 6b).¹⁸ The absence of solvent channels together with a combination of weak intermolecular interactions in which dichloromethane molecules are involved can explain the difficulties to produce anhydrous cocrystals via desolvation. Both interactions were analyzed and confirmed using the tandem QTAIM/NCIPlot analysis and evaluated energetically by DFT. The C–H... π interactions are characterized by two bond CPs and bond paths connecting the H-atom to two C-atoms of the ring. The NCIPlot shows that the green isosurface embraces the whole π -system, thus

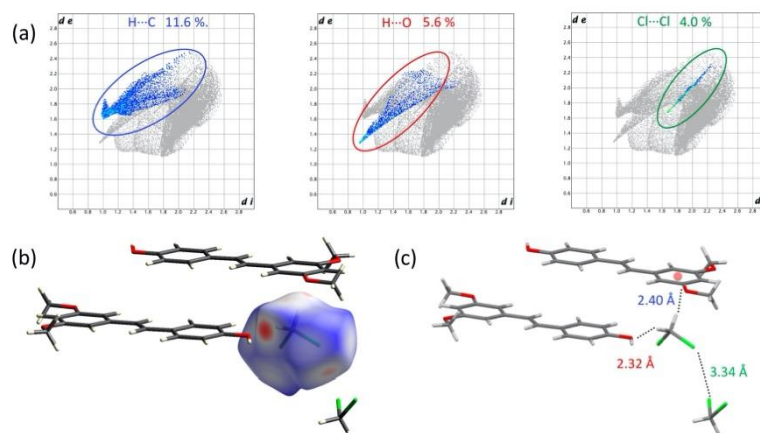


Figure 7. (a) Fingerprint plots showing from left to right H...C, H...O, and Cl...Cl interactions and their relative contributions (%) to the Hirshfeld surface. The d_i and d_e values are the closest internal and external distances (in Å) from given points on the Hirshfeld surface contacts. (b) Hirshfeld surface of the dichloromethane molecule plotted over d_{norm} and surrounded by the nearest molecules in the lattice; contacts shorter than the sum of the van der Waals radii of the interacting atoms are highlighted in red. (c) Interatomic distances of each relevant interaction.

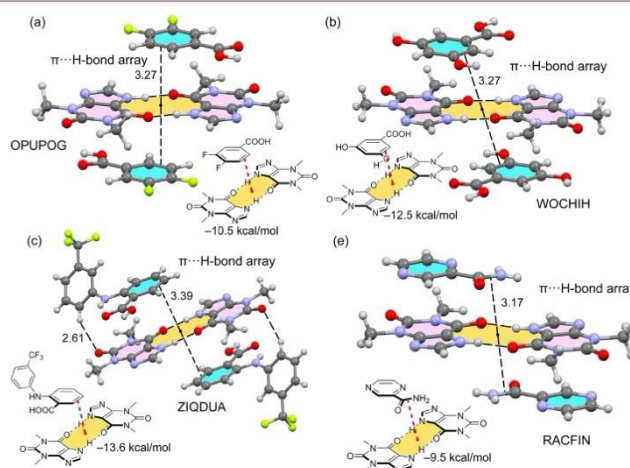


Figure 8. Partial views of the X-ray structures of OPUPOG (a), WOCHIH (b), ZIQDUA (c), and RACFIN (e). Distances in Å. The interaction energies of the different conformers with the $R_2^2(10)$ dimer of theophylline are given near the chemical drawings of the complexes.

confirming the C–H... π interaction. The binding energy is moderately strong likely due to the contribution of an ancillary C–H...Cl interaction, as revealed by both the QTAIM and NCIPLOT computational tools (see Figure 6c). The QTAIM analysis also confirms the existence of the Cl...Cl contact between the cocrystallized solvent molecules (see Figure 6d). A bond CP and bond path interconnect both Cl-atoms. Moreover, the NCIPLOT shows a small and green isosurface located between the Cl-atoms. The extremely weak nature of

the Cl...Cl interaction is confirmed by the energetic analysis (-0.2 kcal/mol) and agrees with previous studies reported in the literature.¹⁹

Finally, Hirshfeld surface analysis^{20,21} was carried out using CrystalExplorer 17.5^{22,23} to further characterize the intermolecular environment of the dichloromethane molecules. Figure 7 shows the most relevant interactions between the dichloromethane molecule and the three nearest surrounding molecules: the C–H... π interaction between a dichloro-

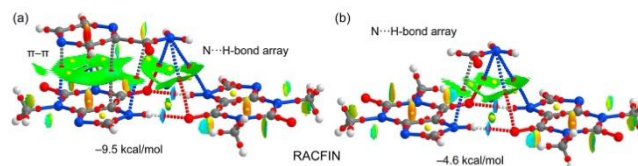


Figure 9. (a) Distribution of bond, ring, and cage CPs (red, yellow, and blue spheres, respectively) and the NCIPLOT isosurface of the RACFIN structure using the gradient cutoff of 0.5 au and color scale $-0.04 < \rho < 0.04$ au. (b) Theoretical model to estimate the π -H-bond array interaction including the distribution of bond, ring, and cage CPs (red, yellow, and blue spheres, respectively) and the NCIPLOT isosurface using the gradient cutoff of 0.5 au and color scale $-0.035 < \rho < 0.035$ au.

methane hydrogen and the dimethoxybenzyl ring of pterostilbene is characterized by a spike circled by blue ($d_{\text{C-H}\cdots\text{centroid}}$ 2.40 Å), the H-bond between a dichloromethane hydrogen and the phenol oxygen of pterostilbene is highlighted in red ($d_{\text{C-H}\cdots\text{O}}$ 2.32 Å), and finally, the weak Cl \cdots Cl interaction can be identified as a long spike circled in green ($d_{\text{Cl}\cdots\text{Cl}}$ 3.34 Å).

The CSD was also explored in order to investigate whether other theophylline cocrystals having the $R_2^2(10)$ synthon exhibit the $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ -bond array interaction described for the cocrystal reported herein. Unfortunately, there are no other cocrystals exhibiting an isolated C=C bond in the structure comparable to the one studied in this work in combination with theophylline forming the $R_2^2(10)$ self-assembled dimer. However, we have found 24 cocrystals (see Table S4 for the full list) where a C=C bond of an aromatic ring or another theophylline moiety is located approximately over the center of the ring. Three of them are represented in Figure 8 with indication of the CSD reference codes and the interacting distances measured from the middle of the aromatic C-C bond to the $R_2^2(10)$ supramolecular ring centroid. The OPUPOG²⁴ structure corresponds to the cocrystal of 3,4-difluorobenzoic acid with theophylline where the $R_2^2(10)$ supramolecular ring forms two symmetrically equivalent π -H-bond array interactions similar to those observed in the pterostilbene/theophylline cocrystal (see Figure 8a). Interestingly, the most electron-rich aromatic C-C bond (not fluorine-substituted) participates in the interaction. In the other two selected examples, the cocrystals are benzoic acid derivatives, WOCHIH²⁵ and ZIQDUA.²⁶ Both structures show similar supramolecular assemblies where basically the C-C bonds of two benzoic acid moieties are located above and below the $R_2^2(10)$ supramolecular ring. The π -H-bond array distances in these three X-ray structures are similar, ranging from 2.27 to 3.39 Å, and comparable to the one observed in the pterostilbene/theophylline cocrystal (3.36 Å). Figure 8d includes an additional example (reference code RACFIN)²⁷ where, instead of an aromatic C-C bond, a C-N bond of an amido group (partial double bond character) interacts with the $R_2^2(10)$ supramolecular ring. In this compound, the π -H-bond array distance is shorter (3.17 Å) than that in the other cocrystals. In this assembly, the aromatic ring of the pyrazine-2-carboxamide cofomer is located over the π -system of theophylline establishing a concurrent π -stacking interaction, as further commented below. The interaction energies of the different cofomers with the $R_2^2(10)$ theophylline dimer (considered as a whole unit for the calculation of the interactions energy) are also indicated in Figure 8, which are similar and comparable to the π - π stacking

interactions computed for the models of the pterostilbene/theophylline cocrystal (see Figure 3c,d)

For the RACFIN structure, where the amido group is located over the $R_2^2(10)$ supramolecular ring, we also performed the combined QTAIM/NCIPLOT analysis, which is represented in Figure 9. The QTAIM analysis shows that the pyrazine ring is connected to the theophylline π -system by two bond CPs interconnecting two carbon and two nitrogen atoms, thus evidencing the existence of a conventional π -stacking interaction that is also characterized by a large and green isosurface that embraces the entire pyrazine ring. Interestingly, the QTAIM analysis also reveals that the N-atom of the amido group is connected to three atoms of the $R_2^2(10)$ supramolecular ring by means of three bond CPs and bond paths and that the C-atom is also connected to one N-atom of the $R_2^2(10)$ ring, thus supporting the existence of the π -H-bond array interaction. Moreover, the NCIPLOT analysis also shows several green isosurfaces located between the exocyclic amido group and the $R_2^2(10)$ ring. In an effort to estimate the contribution of the π -H-bond array interaction to the total interaction energy (-9.5 kcal/mol, Figure 9a), a mutated theoretical model was used where the pyrazine ring was replaced by a H-atom (formamide is used instead of pyrazinamide). As a result, the interaction energy is reduced to -4.6 kcal/mol, which can be attributed to the π -H-bond array interaction. This contribution is slightly stronger than the π -H-bond array interaction estimated for the pterostilbene/theophylline cocrystal (-3.4 kcal/mol; see Figure 5).

CONCLUDING REMARKS

The synthesis and X-ray characterization of a new pterostilbene/theophylline cocrystal is reported herein. The noncovalent interactions that govern the crystal packing are analyzed in detail using several computational tools. The energetic features of the interactions estimated using DFT calculations reveal that the electrostatically enhanced π - π stacking interactions are even stronger than the O-H \cdots N and O-H \cdots O H-bonds, thus confirming their prominent role in the solid state. The solvent molecules establish Cl \cdots Cl interactions between them that are very weak in nature and stronger interactions with the π -system of pterostilbene. Interestingly, the solid-state architecture of the cocrystal shows the formation of an unusual $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ -bond array interaction that was confirmed by a combination of QTAIM and NCIPLOT analysis and evaluated energetically. To the best of our knowledge, this is the first description of this type of interaction where the donor π -system is a double bond. The inspection of the CSD and theophylline cocrystals reveals the existence of other structures showing π -H-bond array

interactions where the π -system belongs to aromatic rings or amido groups. The interaction energies are comparable and moderately strong.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.cgd.0c00845>.

Experimental methods, characterization of new cocrystal of pterostilbene/theophylline, crystal data and structure refinement, CSD survey of theophylline crystal structures, CSD survey of theophylline crystal structures exhibiting π ...H-bonded array interactions and computational methods (PDF)

Accession Codes

CCDC 2010505 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, or by emailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Rafel Prohens – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0003-0294-1720; Email: rafel@ccitub.edu

Antonio Frontera – Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, 07122 Palma de Mallorca, Spain; orcid.org/0000-0001-7840-2139; Email: toni.frontera@uib.es

Authors

Lidia Bofill – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Rafael Barbas – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0002-1603-3689

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.cgd.0c00845>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Mercè Font-Bardia (Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona) for her help in the crystal structure determination. We thank the MICIU/AEI from Spain (Project No. CTQ2017-85821-R, FEDER funds) and the Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI) (Neotec SNEO-20161021/CRYSTACURE project) for financial support. We also thank the CTI (UIB) for computational facilities.

■ REFERENCES

(1) Thakuria, R.; Sarma, B. Drug-Drug and Drug-Nutraceutical Cocrystal/Salt as Alternative Medicine for Combination Therapy: A Crystal Engineering Approach. *Crystals* **2018**, *8* (2), 101.

(2) Bucklin, M. H.; Groth, C. M.; Henriksen, B. *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed.; Academic Press, 2014.

(3) Roupe, K. A.; Remsberg, C. M.; Yanez, J. A.; Davies, N. M. Pharmacometrics of stilbenes: seguing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2006**, *1*, 81–101.

(4) Ruiz, M. J.; Fernandez, M.; Pico, Y.; Manes, J.; Asensi, M.; Carda, C.; Asensio, G.; Estrela, J. M. Dietary Administration of High Doses of Pterostilbene and Quercetin to Mice Is Not Toxic. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3180–3186.

(5) Dudek, M. K.; Wielgus, E.; Paluch, P.; Sniechowska, J.; Kostrzewa, M.; Day, G. M.; Bujacz, G. D.; Potrzebowski, M. J. Understanding the formation of apremilast cocrystals. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci., Cryst. Eng. Mater.* **2019**, *75*, 803–814.

(6) Castellano, R. K.; Gramlich, V.; Diederich, F. Rebeck imides and their adenine complexes: Preferences for Hoogsten binding in the solid state and in solution. *Chem. - Eur. J.* **2002**, *8*, 118–129.

(7) Guo, D.; Sijbesma, R. P.; Zuilhof, H. π -Stacked Quadruply Hydrogen-Bonded Dimers: π -Stacking Influences H-Bonding. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3667–3670.

(8) Mitra, M.; Manna, P.; Seth, S. K.; Das, A.; Meredith, J.; Helliwell, M.; Bauzá, A.; Choudhury, S. R.; Frontera, A.; Mukhopadhyay, S. Salt-bridge- π (sb- π) interactions at work: associative interactions of sb- π , π - π and anion- π in Cu(II)-malonate-2-aminopyridine-hexafluoridophosphate ternary system. *CrystEngComm* **2013**, *15*, 686–696.

(9) Prates, J. A. M.; Tarbouriech, N.; Charnock, S. J.; Fontes, C. M. G. A.; Ferreira, L. M. A.; Davies, G. J. The Structure of the Feruloyl Esterase Module of Xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* Provides Insights into Substrate Recognition. *Structure* **2001**, *9*, 1183–1190.

(10) Dvornikov, V.; Smithrud, D. B. Investigation of Synthetic Hosts That Model Cation- π Sites Found at Protein Binding Domains. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2160.

(11) Thompson, S. E.; Smithrud, D. B. Carboxylates Stacked over Aromatic Rings Promote Salt Bridge Formation in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 442–449.

(12) Bader, R. F. W. A quantum theory of molecular structure and its applications. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 893–928.

(13) Johnson, E. R.; Keinan, S.; Mori-Sanchez, P.; Contreras-Garcia, J.; Cohen, A. J.; Yang, W. Revealing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6498–6506.

(14) Bofill, L.; de Sande, D.; Barbas, R.; Prohens, R. Hydrogen Bond Polarization Overcomes Unfavorable Packing in the Most Stable High Z' Polymorph of Pterostilbene. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 2552–2556.

(15) Martínez, C. R.; Iverson, B. L. Rethinking the term " π -stacking". *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2191–2201.

(16) Thakuria, R.; Nath, N. K.; Saha, B. K. The Nature and Applications of π - π Interactions: A Perspective. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 523–528.

(17) Molčanov, K.; Milasinovic, V.; Kojic-Prodic, B. Contribution of Different Crystal Packing Forces in π -Stacking: From Noncovalent to Covalent Multicentric Bonding. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 5967–5980.

(18) Mukherjee, A.; Desiraju, G. R. Halogen bonds in some dihalogenated phenols: applications to crystal engineering. *IUCr* **2014**, *1*, 49–60.

(19) Varadwaj, P. R.; Varadwaj, A.; Marques, H. M. Does Chlorine in CH₂Cl Behave as a Genuine Halogen Bond Donor? *Crystals* **2020**, *10*, 146–163.

(20) Hirshfeld, H. L. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. *Theor. Chim. Acta.* **1977**, *44*, 129–138.

(21) Spackman, M. A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld surface analysis. *CrystEngComm* **2009**, *11*, 19–32.

(22) Turner, M. J.; McKinnon, J. J.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A. Visualisation and characterisation of voids in crystalline materials. *CrystEngComm* **2011**, *13*, 1804–1813.

(23) Turner, M. J.; McKinnon, J. J.; Wolff, S. K.; Grimwood, D. J.; Spackman, P. R.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A. *CrystalExplorer17*; University of Western Australia, 2017 (<https://hirshfeldsurface.net>).

(24) Corpinot, M. K.; Stratford, S. A.; Arhangelskis, M.; Anka-Lufford, J.; Halasz, I.; Judaš, N.; Jones, W.; Bučar, D. On the predictability of supramolecular interactions in molecular cocrystals – the view from the bench. *CrystEngComm* **2016**, *18*, 5434–5439.

(25) Sarma, B.; Saikia, B. Hydrogen bond synthon competition in the stabilization of theophylline cocrystals. *CrystEngComm* **2014**, *16*, 4753–4765.

(26) Aitipamula, S.; Wong, A. B. H.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H. Cocrystallization with flufenamic acid: comparison of physicochemical properties of two pharmaceutical cocrystals. *CrystEngComm* **2014**, *16*, 5793–5801.

(27) Eddleston, M. D.; Arhangelskis, M.; Fábán, L.; Tizzard, G. J.; Coles, S. J.; Jones, W. Investigation of an amide-pseudo amide hydrogen bonding motif within a series of theophylline:amide cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 51–58.

3.4. ARTICLE 4: *A Late Appearing Polymorph of Nutraceutical Pterostilbene.*

CrystEngComm, **2020**, 22, 4680-4684.

L. Bofill¹, D. de Sande², R. Barbas², R. Prohens^{1,2}, A. Frontera³

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

³Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Crta de Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Espanya.



A late appearing polymorph of nutraceutical pterostilbene†

Cite this: *CrystEngComm*, 2020, 22, 4680

Received 9th June 2020,
Accepted 24th June 2020

DOI: 10.1039/d0ce00837k

rsc.li/crystengcomm

Lidia Bofill,^a Dafne de Sande,^b Rafael Barbas,^b
Antonio Frontera^b*^c and Rafel Prohens^b*^b

We present the discovery of a late appearing polymorph of the nutraceutical pterostilbene and analyzed computationally the intermolecular interactions observed in its crystal structure to explain its higher stability with respect to previously known forms.

Pterostilbene (*trans*-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) is a phytoalexin present in fruits, such as grapes, deerberries, and blueberries, peanuts, and wine.^{1,2} It is consumed as a nutraceutical since evidence suggests that pterostilbene may have preventive and therapeutic properties in a long list of human diseases which include neurological, cardiovascular, metabolic, and hematologic disorders. In addition, it has been reported that it can be a potent anticancer agent.³ In a recent work,⁴ we analyzed the polymorph landscape of pterostilbene and discussed the structural features of the most stable high *Z'* polymorph based on polarization effects. Herein, unexpectedly in the course of a formulation study we have discovered a new polymorph of pterostilbene. The new anhydrous form was initially obtained in toluene and its crystal structure solved by means of SCXRD. Fig. 1 depicts the PXRD diffractogram of new form IV compared to previously reported polymorphs and Table 1 shows the crystallographic data of the four polymorphs.

Analysis of the crystal structure reveals that ribbons of self-assembled molecules of pterostilbene are formed through strong O–H...O hydrogen bond interactions between phenol and methoxy groups in a similar manner to that in

forms II and III. This interaction motif induced us initially to think that this new polymorph would be metastable with respect to form I. Thus, we conducted solvent mediated transformation experiments between forms I and IV in heptane, a solvent in which pterostilbene is very insoluble, and in cyclohexane, in which pterostilbene is only partially soluble at 25 °C. Interestingly, both mixtures transformed completely into new form IV in just 4 days, indicating that the new polymorph is more stable than form I at room temperature.

Moreover, we conducted lattice energy calculations with dispersion-correction DFT methods as provided by the module DMOL³ in Materials Studio⁵ software using GGA functionals and the double numerical with polarization (DNP) basis set for the structural optimization and energy calculation. The lattice energy was computed by using a supercell of 48 molecules and periodic boundary conditions⁶ and adding the conformation energy computed with the same functional.⁷ Results showed that form IV is 0.74 kcal mol⁻¹ more stable than form I.

Interestingly, new form IV shows lower density and higher *Z'* values than metastable forms II and III, as it occurs with form I. This suggests that stronger interactions in form IV

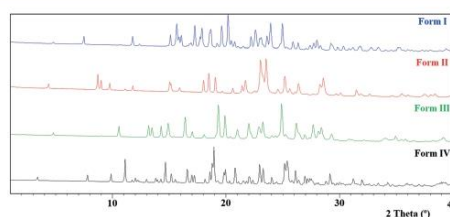


Fig. 1 PXRD pattern of new form IV compared to those of previous polymorphs of pterostilbene.

^a Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., 07121, Palma de Mallorca, Spain

^b Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: rafel@ccit.uh.edu

^c Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Crta de Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain. E-mail: toni.frontera@uib.es

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1986003. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d0ce00837k

Table 1 Crystallographic data of pterostilbene polymorphs

Form	I	II	III	IV
System	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	$P2_1/c$	$P2_1/n$	$P2_1/c$	$C2/c$
a (Å)	15.4310(9)	9.5466(3)	15.7225(8)	17.282(10)
b (Å)	5.7893(3)	4.11726(9)	11.0550(5)	7.629(4)
c (Å)	30.8114(19)	33.6694(13)	7.6201(3)	41.71(2)
α (°)	90	90	90	90
β (°)	93.277(2)	93.162(2)	94.025(2)	98.812(17)
γ (°)	90	90	90	90
Vol. (Å ³)	2748.0(3)	1321.39(7)	1321.20(10)	5435(5)
Z density	8	4	4	16
Z	1.250	1.288	1.288	1.253
Z	2	1	1	2

require a less efficient crystal packing, in a similar manner to that reported for form I.⁴

Thus, in order to get deeper insight into the polymorph landscape of pterostilbene and to find a structural explanation for the relative order of stability, the crystal morphologies of all four polymorphs were predicted using the Bravais-Friedel-Donnay-Harker (BFDH) method included in the latest release of the visualization software package Mercury. Interestingly, the facets with the biggest surface of the predicted morphology of form IV (56%), {002} and {00-2}, are formed by pterostilbene molecules with the phenol groups pointing out of the surface, while the other three polymorphs did not show this surface molecular arrangement. We also used another morphology prediction method, which assumes that the growth rate of crystal faces is proportional to their attachment energy, by using Materials Studio with the COMPASS force field⁸ and it produced a very similar result with the same facets occupying 45% of the surface of the crystal (see the ESI† for details) (Fig. 2).

It is recognized that particles can be solvated by water molecules in different layers of complexity for up to one nanometer of the surface. In fact, water adsorption on solid surfaces cannot be avoided except in those cases where the surface energy is very small. Thus, water molecules can establish strong interactions with hydrophilic surfaces, giving place to ordered layers with an ice-like situation.⁹ Since the

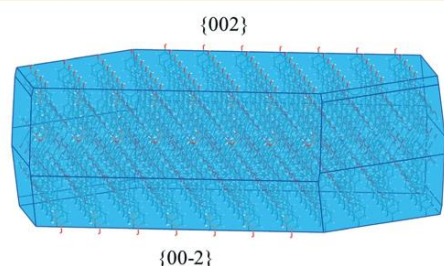


Fig. 2 BFDH predicted morphology of form IV showing {002} and {00-2} facets.

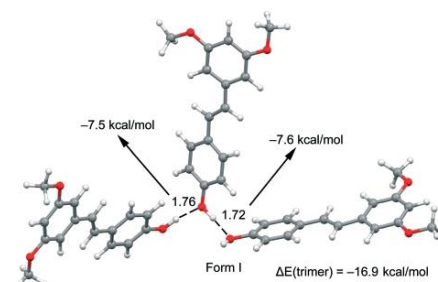


Fig. 3 Partial view of the X-ray structure of form I. Distances in Å.

difference in lattice energy between forms I and IV is very small ($0.74 \text{ kcal mol}^{-1}$), but form IV shows the less stable methoxy/phenol hydrogen bond interaction with respect to the strong phenol/phenol interaction in form I, we explored whether water adsorption, involving strong water/phenol H-bond interactions, was a stabilization driven force able to compensate for the apparently less stable internal hydrogen bonds in the structure. Thus, solvent mediated transformation experiments under anhydrous conditions were conducted with mixtures of forms I and IV in heptane or cyclohexane with different desiccant agents, such as molecular sieves, anhydrous sodium sulphate and calcium sulphate hemihydrate. The experiments were performed for 90 minutes, the final mixtures were analysed by PXRD and in all cases the total conversion of mixtures of pure form IV was observed, discarding any superficial stabilizing effect of water adsorption.

These findings demonstrated that internal stabilization was responsible for the lower energy of form IV since the best hydrogen bond donor present in the molecule of pterostilbene is not completely satisfied in this polymorph. Thus, we analysed in depth the secondary intermolecular interactions in both forms by conducting a theoretical study in order to find those subtle energy differences which can explain the higher stability of form IV. The most important interactions in both forms are the H-bonds involving the phenol group as a H-bond donor. The main difference is that in form I, the acceptor is the phenol group of the adjacent molecule and in form IV, the H-bond acceptor is the methoxy group of the adjacent molecule, as shown in Fig. 3 and 4. We have computed at the PBE1PBE-D3/def2-TZVP level of theory

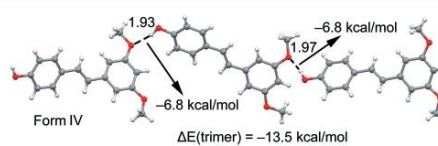


Fig. 4 Partial view of the X-ray structure of form IV. Distances in Å.

Communication

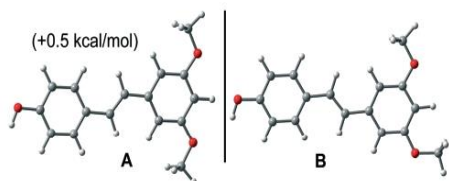


Fig. 5 PBE1PBE-D3/def2-TZVP geometries of both isomers and their energetic difference.

(see the ESI† for details) the interaction energy associated with each H-bond (for each polymorph, two slightly different H-bonds are formed). For form I, the interaction energies of the H-bonds are -7.5 and -7.6 kcal mol $^{-1}$ (see Fig. 3) and for form IV, they are weaker (both -6.8 kcal mol $^{-1}$) in agreement with the longer distances. This initial analysis shows that form I should be more stable if only H-bonds are taken into consideration. Furthermore, the formation energy of the trimer of form I (-16.9 kcal mol $^{-1}$) is larger (in absolute value) than the sum of the interaction energies of both H-bonds, which reveals favorable cooperativity effects (~ 1.8 kcal mol $^{-1}$) in these H-bonds as we previously reported.⁴ In contrast, the formation energy of the trimer in form IV is -13.5 kcal mol $^{-1}$, which corresponds approximately to the sum of the energies of the individual H-bonds, thus confirming the lack of cooperativity effects between these H-bonds. The existence of synergetic effects in form I and the lack of them in form IV further support the fact that

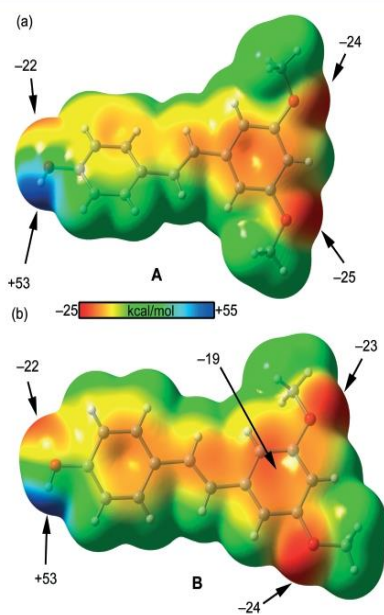


Fig. 6 MEP plots (isosurface = 0.001 a.u.) of both isomers of pterostilbene at the PBE1PBE-D3/def2-TZVP level of theory.

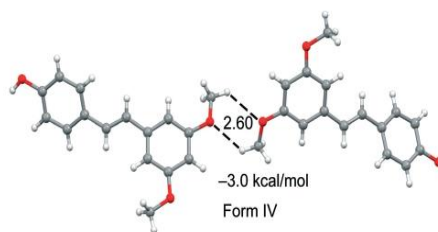


Fig. 7 Self-assembled dimer observed in form IV. Distance in Å. Energy computed at the PBE1PBE-D3/def2-TZVP level of theory.

polymorph I should be more stable than form IV, in disagreement with the experimental findings.

A close examination of the X-ray structures reveals that in form IV, there are two isomers of pterostilbene that exhibit different orientations for the methoxy group. That is, in the trimer shown in Fig. 4, the central molecule has both methoxy groups in a counterclockwise direction and, conversely, both adjacent molecules have the methoxy groups pointing to opposite directions. In contrast, polymorph I presents all molecules with the same orientation as the methoxy groups. We have optimized both isomers (denoted as A and B in Fig. 5) and it can be observed that form "B" is slightly more stable (0.5 kcal mol $^{-1}$), also supporting that form I should be more stable because all molecules are B-isomers whilst in form IV half of the molecules are A-isomers.

We have also examined the MEP surface of both forms in order to investigate if the H-bond acceptor ability of the methoxy groups changes depending on the orientation. The MEP plots are shown in Fig. 6. In both isomers, the most positive MEP is located at the H-atom of the phenol group, as expected. The MEP values at the O-atoms are very similar, ranging from -23 to -25 kcal mol $^{-1}$. The MEP surfaces indicate that the O-atoms of the methoxy groups are better H-bond acceptors than the O-atoms of the phenol groups. It is also worth mentioning that the 1,3-dimethoxybenzene ring presents a quite large negative MEP value, thus explaining its ability to establish C-H $\cdots\pi$ interactions in the solid state.

Finally, it is worth emphasizing that isomer A (only found in polymorph IV) establishes an interesting OCH $_3\cdots$ OCH $_3$ interaction that is not observed in form I because of the

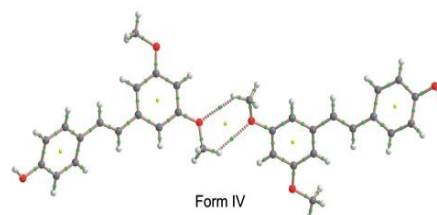


Fig. 8 QTAIM distribution (PBE1PBE-D3/def2-TZVP) of bond and ring critical points (green and yellow spheres, respectively) and bond paths in the self-assembled dimer of polymorph IV.

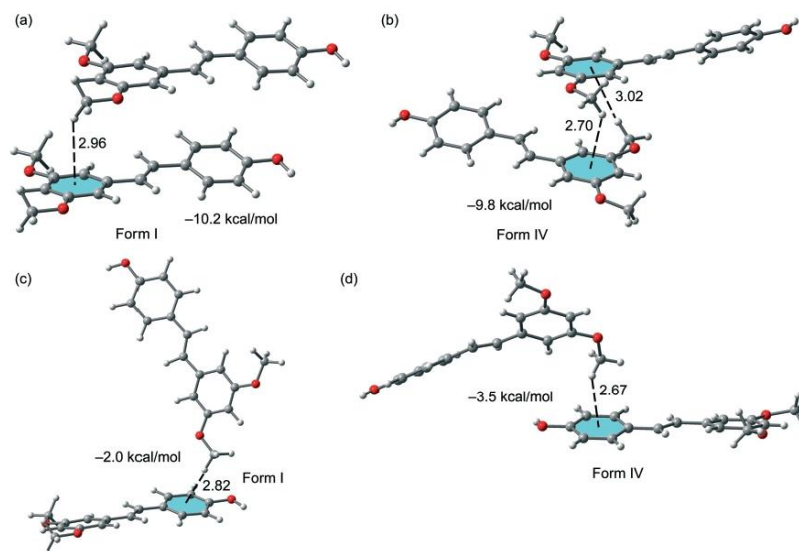


Fig. 9 Self-assembled dimers observed in forms I (a and c) and IV (b and d). Distances in Å. Dimerization energies computed at the PBE1PBE-D3/def2-TZVP level of theory.

different orientation of the methoxy groups. This interaction governs the formation of self-assembled dimers (see Fig. 7). We have computed the interaction energy of this dimer ($-3.0 \text{ kcal mol}^{-1}$) that is able to compensate for the stronger O–H \cdots O H-bonds of form I and the lower stability of this isomer. However, taking into consideration the cooperativity observed in the H-bonds of form I, this additional interaction is likely not enough to explain the higher stability of form IV.

Additionally, we have carried out the computation of the QTAIM distribution of bond critical points and bond paths of the self-assembled dimer of form IV.

The representation is shown in Fig. 8 and it can be observed that the OCH₃ \cdots OCH₃ interaction is characterized by two symmetrically equivalent bond critical points (green spheres) and bond paths connecting the O-atoms to the H-atoms. The dimer is further characterized by an extra critical point (yellow sphere), as a consequence of the formation of a supramolecular ring.

Finally, we have compared the CH₃ \cdots π interactions that are observed in the solid state of both polymorphs. In fact, both the 1,5-dimethoxyphenyl and phenol rings participate in this type of noncovalent interaction. The studied dimers are included in Fig. 9, along with the dimerization energies. It can be observed that the CH₃ \cdots π interactions involving the 1,5-dimethoxyphenyl rings are almost identical in both polymorphs ($0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ more favorable in form I). However, the CH₃ \cdots π interaction with the phenol ring is more favorable in form IV by $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Taken together, the results from this DFT study suggest that although the strength of the H-bonds and cooperativity effects favor form I, this is compensated for by the OCH₃ \cdots OCH₃ interaction that is absent in form I and the CH₃ \cdots π interaction involving the phenol ring that is stronger in form IV.

Conclusions

Although late-appearing stable polymorphs and their impact in the formulation of drugs are well-known and rather common in industry,^{10–12} the case presented herein is a new example of this phenomenon where subtle differences in the energy of secondary intermolecular interactions can have a strong impact on the occurrence of a particularly strong supramolecular synthon and the overall thermodynamic stability of polymorphs. In fact, the DFT study shows that weak CH₃ \cdots π and OCH₃ \cdots OCH₃ interactions are able to fine-tune the relative stability of the polymorphic forms in the presence of strong O–H \cdots O H-bonding interactions.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank Dr. Mercè Font-Bardia for her help in the crystal structure determination. We thank the MICIU/AEI of Spain

for financial support (project number CTQ2017-85821-R, FEDER funds). We thank the CTI (UIB) for free allocation of computer time.

Notes and references

- 1 K. A. Roupe, C. M. Remsberg, J. A. Yanez and N. M. Davies, *Curr. Clin. Pharmacol.*, 2006, **1**, 81-101.
- 2 M. J. Ruiz, M. Fernandez, Y. Pico and J. Manes, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 3180-3186.
- 3 D. McCormack and D. McFadden, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2013, 15-16.
- 4 L. Bofill, D. de Sande, R. Barbas and R. Prohens, *Cryst. Growth Des.*, 2019, **19**, 2552-2556.
- 5 *Materials Studio, Version 7.0*, Accelrys Software, Inc., 2013.
- 6 M. T. Curran and J. R. Kitchin, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 21060-21071.
- 7 J. B. Nanubolu, B. Sridhar, V. S. Phani Babu, B. Jagadeeshb and K. Ravikumar, *CrystEngComm*, 2012, **14**, 4677-4685.
- 8 P. F. Luner, Y. Zhang, Y. A. Abramov and M. T. Carvajal, *Cryst. Growth Des.*, 2012, **12**, 5271-5282.
- 9 P. Mante, C. Chen and Y. Wen, *Sci. Rep.*, 2015, **4**, 6249.
- 10 S. Desikan, R. L. Parsons, W. P. Davis, J. E. Ward, W. J. Marshall and P. H. Toma, *Org. Process Res. Dev.*, 2005, **9**, 933-942.
- 11 I. B. Rietveld and R. Céolin, *J. Pharm. Sci.*, 2015, **104**, 4117-4122.
- 12 D.-K. Bučar, R. W. Lancaster and J. Bernstein, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 6972-6993.

3.5. ARTICLE 5: *New Cocrystal of Ubiquinol with High Stability to Oxidation.*

Crystal Growth & Design, **2020**, 20, 8, 5583-5588.

L. Bofill¹, D. de Sande², R. Barbas², R. Prohens^{1,2}, A. Frontera³

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

³Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Crta de Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Espanya

New Cocrystal of Ubiquinol with High Stability to Oxidation

Lidia Bofill, Dafne de Sande, Rafael Barbas, and Rafel Prohens*

Cite This: *Cryst. Growth Des.* 2020, 20, 5583–5588

Read Online

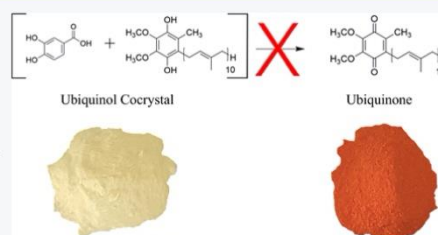
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: A new cocrystal of the essential nutrient ubiquinol that is highly resistant to air oxidation has been designed and discovered in a cocrystal screening. Hydroxybenzoic acids and phenols have been selected as the cofomers with the aim to transfer their molecular antioxidant properties to the cocrystal and protect ubiquinol from oxidation. The new cocrystal ubiquinol/3,4-dihydroxybenzoic acid shows a remarkably high stability under standard stress conditions, which offers alternative strategies of formulation for an important industrial problem.



Coenzyme Q10 is a vitamin-like nutrient, ubiquitously present in almost all cells, which plays an essential role in the energy production of all cells through the respiratory chain in mitochondria.^{1–4,8}

It exists in two forms, the oxidized ubiquinone and the reduced ubiquinol. Both compounds are in a permanent equilibrium in the cells through a redox cycle which occurs by a two-step transfer of one electron each, producing a semiquinone intermediate.¹ These important biological roles have motivated their use as dietary supplements for improving body protection against aging by oxidative stress with a particular focus on heart and neurodegenerative diseases.² Supplements are necessary for adults because the natural production of coenzyme Q10 reduces with age and because the usual diet in humans provides only small amounts of this important nutrient.³ However, the oral bioavailability of the highly lipophilic coenzyme Q10 is very low with an extremely poor aqueous solubility (0.7 ng/mL). Moreover, it shows a chemical instability upon exposure to air, light, and high temperature, which makes it difficult to prepare efficient pharmaceutical formulations.⁹ In spite of a certain controversy about the use of ubiquinol instead of ubiquinone in order to get better health benefits, it is generally accepted that the reduced form of coenzyme Q10 shows, to some extent, superiority to ubiquinone in terms of bioavailability.³ However, ubiquinol suffers an important stability issue which hampers its storage and formulation, which is the easy transformation into ubiquinone even at room temperature. This makes necessary complicated preparations and expensive packaging procedures. For instance, gelatin capsules or powders packed in tightly sealed envelopes, both prepared under a nitrogen atmosphere, can be currently found in the market.³ Thus, it is an industrial need to find new ways to stabilize ubiquinol in affordable and efficient ways. In this work, we have designed and prepared for the first time

cocrystals of ubiquinol with antioxidant cofomers showing a high stability to oxidation under standard temperature/relative humidity storage conditions in comparison to pure ubiquinol.

In addition to a long isoprenoid chain, ubiquinol has two phenol groups in positions para to each other, a functional group able to act as both a hydrogen bond donor and acceptor. Thus, our crystal engineering strategy to increase the stability of ubiquinol was the formation of multicomponent crystals of ubiquinol with antioxidant compounds that have the ability to establish strong hydrogen bonds. An antioxidant is defined as a substance that at low concentrations delays or prevents oxidation of a substrate.⁵ The antioxidant property is achieved in most cases through chemical mechanisms such as hydrogen atom transfer or single-electron transfer.⁶ Ubiquinol is oxidized by air when one hydrogen atom is transferred to molecular oxygen with the generation of a superoxide radical, which is known as autoxidation.^{7,8} This hydrogen atom transfer can be considered as the initial radical reaction of the total conversion into ubiquinone (Figure 1).^{9,10} Phenolic compounds are well-known as antioxidants against superoxide radicals, preventing autoxidation; in particular, hydroxybenzoic acids (constituents of natural antioxidants as chalcones and flavones) have demonstrated good antioxidant properties.^{7,11} Moreover, several studies have reported successful cases of cocrystallization with phenolic acids as potential pharmaceutical cofomers.^{12–14}

Received: June 1, 2020

Revised: July 15, 2020

Published: July 15, 2020



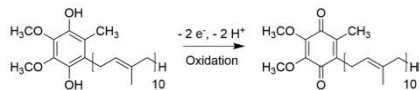


Figure 1. Molecular structure of ubiquinol and its oxidation to ubiquinone.

Improved physical and chemical stability via cocrystallization has been achieved in many cases;¹⁵ thus, in this paper we have designed, synthesized, and characterized a new cocrystal of ubiquinol with enhanced stability against oxidation by the introduction of an antioxidant (chosen from a set of hydroxybenzoic acids) in the crystal lattice as the cofomer. The hypothesis was to translate the antioxidant ability of this family of compounds to a multicomponent crystal containing ubiquinol and protect it against air oxidation. The aim has been achieved by means of a cocrystal screening between ubiquinol and a set of hydroxybenzoic acids following a combination of kinetic and thermodynamic control experimental conditions.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials. Ubiquinol ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) used in this study was used as received from BOC Sciences with a purity of 99.4% (batch FB02-0300). The cofomers 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, gallic acid, resorcinol, caffeic acid, quercetin, and 4'-hydroxy-4-biphenylcarboxylic acid were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Methods. **2.2.1. Cofomer Selection.** The main prerequisite for the cofomer selection was for it to have recognized antioxidant properties as well as acceptable toxicity profiles. In this sense, hydroxybenzoic acids and phenols have good antioxidant properties.¹¹ Our approach assumes that the cofomers can inhibit the mechanism of ubiquinol oxidation to ubiquinone by transferring their molecular antioxidant properties to the cocrystal. On the other hand, on the basis of its dual nature as a strong hydrogen bond donor and acceptor, their carboxylic acid and alcohol functional groups have the potential to interact satisfactorily with the methoxy and alcohol ubiquinol functional groups. In the absence of published ubiquinol crystal structures, our crystal engineering approach also takes into account the important role of the long hydrophobic phenyl chains in the packing of ubiquinol molecules by means of van der Waals interactions, which can form layers with separate polar and nonpolar domains in the lattice. Finally, 11 cofomers (9 hydroxybenzoic acids and 2 polyphenols) were chosen.

2.2.2. Solubility Determination. In order to choose the most suitable solvents in which the screening would be performed, a qualitative determination of solubility in 30 solvents was conducted for both ubiquinol and each cofomer. $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (20 mg, 0.023 mmol) was suspended in each solvent, using a maximum volume of 2.0 mL at room temperature. When the sample was not soluble, the temperature was increased to a maximum of 50 °C. In this qualitative solubility determination, the solvents are classified as soluble, insoluble, or partially soluble at each temperature (see section 1.1 in the Supporting Information). The same procedure has been followed with all the cofomers, and for this study, as much as possible, only solvents in which both components (ubiquinol and cofomer) were partially soluble at 25 °C were selected to be tested in the grinding experiments.

2.2.3. Cocrystal Screening. Screening through liquid-assisted grinding experiments (LAG) was conducted by grinding 20–50 mg of a 1:1 mixture of $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ and each cofomer together with one drop of different solvents using a Retsch MM 2000 grinding mill. The samples were placed in 2 mL volume stainless steel jars, along with two stainless tungsten grinding balls of 3 mm diameter. Grinding was performed for 15 min, with a 30 Hz frequency of the mill. Finally, the samples were collected immediately without prior drying for PXRD

analysis. The formation of a new solid form was determined by comparing PXRD patterns of the starting materials ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ and the respective known cofomer solid forms) and products from cocrystal screening LAG experiments. Screening through reaction crystallization (RC) was conducted by preparing a saturated solution of the most soluble component ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ or cofomer) in different solvents in a sealed vial with stirring. A small quantity of the less soluble component was added until it did no longer dissolved. The suspension was stirred at different times, and the resulting solids were filtered and analyzed by PXRD. Screening through solvent-mediated transformations (SMT) were conducted by preparing suspensions of $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ and cofomer in different molar ratios (40–5000 mg of the final mixture) in selected solvents. The sealed vials were stirred for different times, and the resulting solids were filtered and analyzed by PXRD. A summary of the experimental procedures can be found in section 1.2, Table S1, of the Supporting Information.

2.2.4. Synthesis of the New Ubiquinol Cocrystal. Details of the synthesis and characterization of the ubiquinol crystal can be found in sections 2 and 3 in the Supporting Information. The stoichiometry has been assessed on the basis of NMR, TGA, and elemental analysis.

Five multicomponent forms of $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ have been discovered through a cocrystal screening with 5 out of the 11 cofomers tested. One cocrystal form with 3,4-dihydroxybenzoic acid in a 1:1 stoichiometry (as a monohydrate form, $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\cdot 3,4\text{-DHBA}\cdot \text{H}_2\text{O}$) has been obtained in pure form. Experimental evidence of cocrystallization with the other four cofomers (3-hydroxybenzoic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, and resorcinol) have been observed, but unfortunately, they could not be isolated in pure form.

2.2.5. X-ray Crystallographic Analysis. Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns were obtained on a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer in transmission configuration using $\text{Cu K}\alpha_{1,2}$ radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) with a focusing elliptic mirror and a PIXcel detector working at a maximum detector active length of 3.347°. A configuration of a convergent beam with a focalizing mirror and a transmission geometry was used with a flat sample sandwiched between low-absorbing films measured from 2 to 40° in 2θ , with a step size of 0.026° and a total measurement time of 8–30 min at room temperature (298 K). The powder diffractogram was indexed, the lattice parameters were refined by means of LeBail fits by means of Dicvol04,¹⁶ and the space groups were determined from the systematic absences.

2.2.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC). Differential scanning calorimetry analysis was carried out by means of a Mettler-Toledo DSC-822e calorimeter. Experimental conditions: aluminum crucibles of 40 μL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 °C/min. The calorimeter was calibrated with indium of 99.99% purity (mp, 156.5 °C; $\Delta H = 28.35 \text{ J/g}$).

2.2.7. Thermogravimetric Analysis (TGA). Thermogravimetric analysis was performed on a Mettler-Toledo TGA-851e thermobalance. Experimental conditions: alumina crucibles of 70 μL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 °C/min.

2.2.8. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra have been recorded on a Varian Mercury 400 spectrometer (400 MHz). Chemical shifts for protons are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane and are referenced to residual protons in the NMR solvent (chloroform-*d*: δ 7.26). Experimental conditions: delay, 1; pulse, 45°; scans, 32.

2.2.9. Elemental Analysis (EA). Elemental analysis determination has been performed on a Thermo EA Flash 2000 elemental organic analyzer (Thermo Scientific, Milan, Italy) working under standard conditions recommended by the supplier of the instrument: helium flow 140 mL/min, combustion furnace at 950 °C, chromatographic column oven at 65 °C.

2.2.10. Dynamic Vapor Sorption (DVS). The water sorption and desorption processes were measured on a DVS-1000 instrument from Surface Measurement Systems. The sample was mounted on a balance and studied over a humidity range from 0% to 90% RH and then decreased to 0% RH at 25 °C using a two-cycle method. The equilibrium condition for each step was set to a mass constancy of

$\pm 0.001\%$ over 60 min and a maximum time limit of 1440 min for each step.

2.2.11. Stability under Standard Conditions. The stabilities of the new cocrystal and the starting ubiquinol material have been studied under two experimental conditions: 25 °C and 57% relative humidity and 40 °C and 75% relative humidity. The samples were stored under both conditions inside a Series FD Binder chamber and were analyzed periodically. A saturated solution of sodium bromide salt (57%) and a saturated solution of sodium chloride (75%) were used to control the relative humidity.

2.2.12. Hot-Stage Microscopy (HSM). A Nikon polarization microscope (Nikon Eclipse 50i) equipped with a Linkam LTS350 hot stage and digital video recorder was used. Experimental conditions: atmosphere of dry nitrogen and heating rate of 10 °C/min.

3. RESULTS AND DISCUSSION

We have conducted a comprehensive cocrystal screening with a set of antioxidant cofomers, which includes hydroxybenzoic acids and polyphenols from a variety of 18 organic solvents, which produced 225 individual crystalline solids (see sections 1–3 in the Supporting Information for experimental and characterization details). Evidences of new solid phases with 6 out of the 11 cofomers tested (3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, 3-hydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, resorcinol, and quercetin) by means of LAG were observed, but unfortunately and despite the fact that great efforts were devoted to isolate new cocrystals, only one (with 3,4-dihydroxybenzoic acid as the cofomer) could be prepared in pure form through reaction crystallization and solvent-mediated transformation experiments. A robust experimental procedure for the preparation of the new solid form has been optimized, and several scale-up batches were prepared to conduct stability tests under two experimental conditions. Figure 2 shows PXRD diagrams of the new cocrystal in comparison to the starting materials. NMR analysis shows that ubiquinol and 3,4-dihydroxybenzoic acid are in a 1:1 molar ratio.

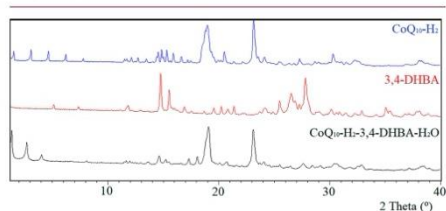


Figure 2. Comparative PXRD diffractograms of ubiquinol ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) (blue), 3,4-dihydroxybenzoic acid (red), and the cocrystal hydrate $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (black). The cofomer 3,4-dihydroxybenzoic acid is a mixture of an anhydrous form (CSD refcode: WUYNUA) and a monohydrate (CSD refcode: BIJDON03).

The presence of water and its stoichiometry in the new solid form were assessed by combining information from TGA and DVS experiments. Thermogravimetric analysis (see the Supporting Information) shows a weight loss of 1.6%, which corresponds to one molecule of water per molecule of ubiquinol and cofomer (theoretical value 1.7%). Moreover, DVS analysis shows a weight loss of 1.7% during the first desorption at 25 °C and 0% relative humidity (RH). Interestingly, further sorption/desorption cycles (0–90% RH) show the subsequent possible formation of a hemihydrate (water content 0.9%). However, once the experiment was over and the resulting solid was

analyzed by PXRD, it showed the characteristic peaks of the cocrystal monohydrate with low crystallinity (Figure S13 in the Supporting Information); thus, it was not possible to properly characterize the obtained solid and elucidate if a hemihydrate was formed or simply amorphization had occurred during the DVS experiment. This behavior is clearly different than that of ubiquinol, which has a highly hygroscopic character (actually it shows deliquescence at 75% RH), as can be seen in its DVS analysis with moisture absorption of up to 30% at 90% RH (Figure 3). This is an advantage of the new cocrystal with respect

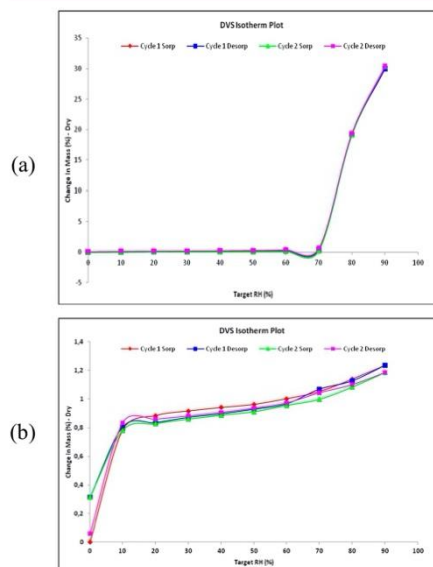


Figure 3. Dynamic vapor sorption isotherms of $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (a) and $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (b) at 25 °C.

to ubiquinol, since hygroscopicity is a major concern in formulating a drug compound since the physical and chemical stability of the solid dosage forms are influenced by moisture adsorption.¹⁷

On the other hand, DSC analysis (Figure 4) shows a broad endothermic phenomenon starting at 45 °C, which corresponds to the simultaneous dehydration and melting or collapse of the cocrystal structure with the subsequent *in situ* recrystallization of the cofomer, which finally melts at 202 °C (Figure S9 shows the DSC of the pure cofomer).¹⁸

We also conducted a hot-stage experiment with the $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ cocrystal to corroborate the interpretation of the DSC thermogram. Figure 5 shows photomicrographs at different temperature values. At 35 °C the solid is still crystalline, but at 60–67 °C the loss of water is accompanied by the melting/recrystallization of some solid. At 85 °C crystals can still be observed and the sample remains solid until 194 °C, when it finally melts.

Crystals of suitable size and quality for SCXRD analysis could not be obtained. However, polycrystalline samples of the new

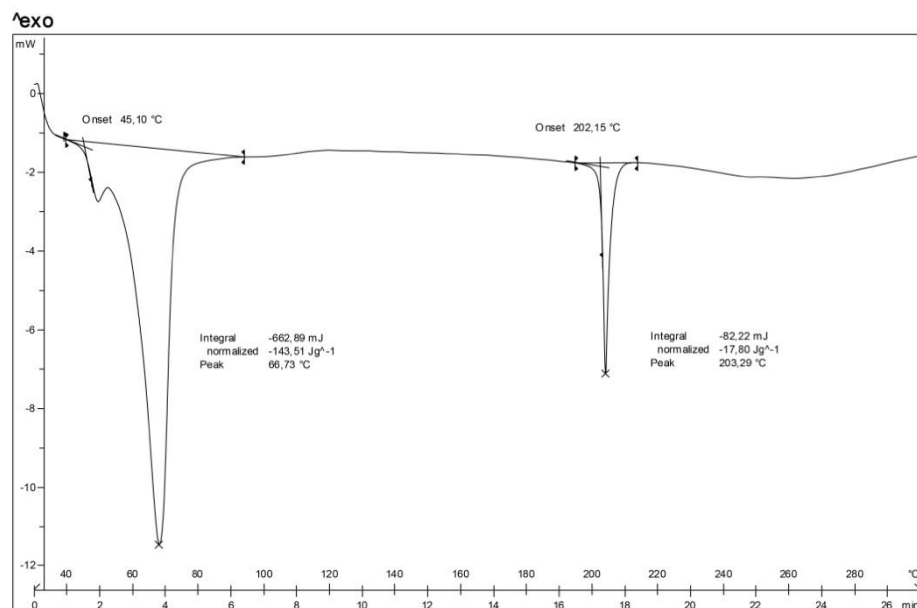


Figure 4. DSC thermogram of new $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ cocrystal.

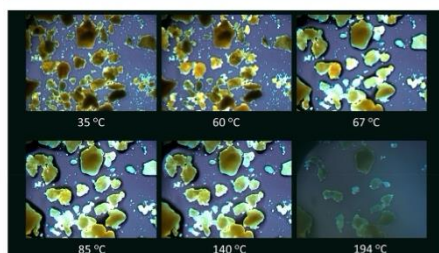


Figure 5. Photomicrographs in polarized light of new $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ cocrystals between 35 and 194 °C.

cocrystal could be indexed and the resulting unit cell volume is compatible with four molecules of ubiquinol, 3,4-dihydroxybenzoic acid, and water in the asymmetric unit. Elemental analysis results are also compatible with a 1:1:1 stoichiometry (see the Supporting Information).

The stability of the new cocrystal was studied in comparison to pure ubiquinol under two standard conditions (25 °C and 60% RH; 40 °C and 75% RH). Samples were exposed in open vials to atmospheres of controlled relative humidity by using saturated solutions of NaBr and NaCl, respectively, at constant temperature in a climate chamber. Periodically, individual samples were collected and measured by PXRD to assess the transformation of the new cocrystal to ubiquinol or other solid forms. Our results show that while ubiquinol is transformed

easily to ubiquinone in just 26 days at 25 °C and 60% RH, the new 3,4-dihydroxybenzoic acid cocrystal resists oxidation for at least 435 days. Figures 6 and 7 show PXRD diagrams of the

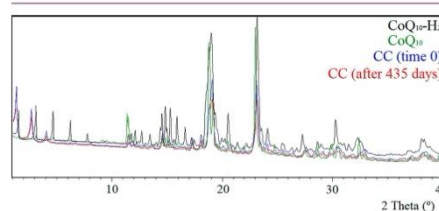


Figure 6. Comparative PXRD diffractograms of the cocrystal hydrate $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ between time 0 (blue) and after 435 days (red) under standard conditions at 25 °C and 60% of relative humidity with respect to ubiquinol ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) (black) and ubiquinone (CoQ_{10}) (green).

cocrystal at time 0 and after 435 days in comparison to ubiquinol and ubiquinone and in comparison to 3,4-dihydroxybenzoic acid crystal forms, respectively. The data indicate that neither ubiquinone nor any known crystal form of the cofomer are detected after 435 days, confirming the robustness of the new cocrystal. However, the stability under 40 °C and 75% RH conditions is much lower. Thus, the new cocrystal transforms partially into ubiquinone in only 120 days (Figure S14). Actually, visual evidence of conversion was observed as an increased intensity of the orange color (characteristic of

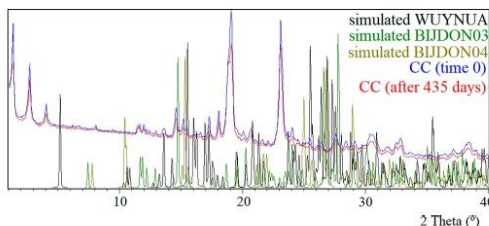


Figure 7. Comparative PXRD diffractograms of the cocrystal hydrate $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (CC) at time 0 (blue) and after 435 days (red) under 25 °C and 60% RH conditions, 3,4-DHBA anhydrous (WUYNUA) (black), and monohydrates BIJDON03 (green) and BIJDON04 (olive).

ubiquinone) under 40 °C and 75% RH conditions. However, the initial very pale yellow color remained constant over the whole study under 25 °C and 60% RH conditions.

4. CONCLUDING REMARKS

The coformer of the new cocrystal 3,4-dihydroxybenzoic acid (also known as protocatechuic acid) is a metabolite of polyphenols, such as anthocyanins, is found in more than 500 plants,¹⁹ and is widely present in the human diet in grain brown rice, olive oil, plums, gooseberries, and white grapes.²⁰ Moreover, the European Food Safety Authority concluded that 3,4-dihydroxybenzoic acid *does not give rise to safety concerns at its levels of dietary intake*.²¹ *In vitro* studies of antioxidant activity have been previously reported²² and show higher activity in comparison ascorbic acid (recognized and accepted by the FDA as a dietary antioxidant²³). Moreover, it has shown anti-inflammatory properties, inhibition of carcinogenesis, and antimicrobial activities, among other important pharmacological properties, which makes this coformer confer extra health benefits in addition to those already proven for ubiquinol and convert the new cocrystal into a potential “nutraceutical combo”.

In summary, most pharmaceutical formulations of ubiquinol experience different paths of degradation and the only efficient way of preventing oxidation to ubiquinone is formulation in gelatin capsules prepared under a nitrogen atmosphere, a procedure which increases the costs from an industrial point of view.³ However, the new multicomponent solid form of ubiquinol presented here has shown a remarkable stability to oxidation by air, which could offer a straightforward and inexpensive alternative, with no toxicity concerns, to more sophisticated and expensive formulations of this important nutraceutical.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.cgd.0c00749>.

Experimental methods, synthesis of the cocrystal hydrate form, characterization of the solids, CSD 3,4-dihydroxybenzoic acid crystal forms reported, and stability standard conditions (PXRD analysis) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Rafel Prohens – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., 07121 Palma de Mallorca, Spain; orcid.org/0000-0003-0294-1720; Email: rafel@ccit.uib.edu

Authors

Lidia Bofill – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., 07121 Palma de Mallorca, Spain
Dafne de Sande – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
Rafael Barbas – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0002-1603-3689

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.cgd.0c00749>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI), for financial support (Neotec SNEO-20161021/CRYSTACURE project).

■ REFERENCES

- Alcázar-Fabra, M.; Navas, P.; Brea-Calvo, G. Coenzyme Q10 biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2016**, *1857*, 1073–1078.
- Matsuo, K.; Kasai, K.; Hosoe, K.; Funahashi, I. Stability of ubiquinol-10 (reduced form of coenzyme Q10) in human blood. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30* (4), 500–502.
- Freye, E. C. K.; Strobel, H. P. The Whole Truth about Coenzyme Q10 You May Not Find Elsewhere. *Adv. Complement Alt Med.* **2018**, *2* (2), 107–116.
- Zaki, N. M. Strategies for oral delivery and mitochondrial targeting of CoQ10. *Drug Delivery* **2016**, *23* (6), 1868–1881.
- MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G.; Garg, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2046–2056.
- Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 997–1027.
- Korth, H.; Mulder, P. Phenolic Hydrogen Transfer by Molecular Oxygen and Hydroperoxyl Radicals. Insights into the Mechanism of the Anthraquinone Process. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 2560–2574.
- Nohl, H.; Kozlov, V. A.; Staniek, K.; Gille, L. The Multiple Functions of Coenzyme Q. *Bioorg. Chem.* **2001**, *29*, 1–13.
- Maroz, A.; Anderson, R. F.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *46*, 105–109.
- Kozlov, A. V.; Nohl, H.; Gille, L. Are Reduced Ubiquinones Oxygen Radical Generators? *Bioorg. Chem.* **1998**, *26*, 334–344.
- Velika, B.; Kron, I. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives. *Free Radicals Antioxid.* **2012**, *2*, 62–67.
- Przybyłek, M.; Ziolkowska, D.; Mroczynska, K.; Cysewski, P. Applicability of Phenolic Acids as Effective Enhancers of Cocrystal Solubility of Methylxanthines. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 2186–2193.
- Admond, D. A.; Sinha, A. S.; Khandavilli, U. B. R.; Maguire, A. R.; Lawrence, S. E. Design and Synthesis of Ternary Cocrystals Using

Carboxyphenols and Two Complementary Acceptor Compounds. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 59–69.

(14) Przybyłek, M.; Cysewski, P. Distinguishing Cocrystals from Simple Eutectic Mixtures: Phenolic Acids as Potential Pharmaceutical Cofomers. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18*, 3524–3534.

(15) Duggirala, N. K.; Perry, M. L.; Almarsson, O.; Zaworotko, M. J. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 640–655.

(16) Boulif, A.; Louer, D. Powder pattern indexing with the dichotomy method. *J. Appl. Crystallogr.* **2004**, *37*, 724–731.

(17) Arigo, A.; Jawahar, N.; Nikhitha, K.; Jubie, S. Effect of Hygroscopicity on pharmaceutical ingredients, methods to determine and overcome: An Overview. *J. Pharm. Sci. Res.* **2019**, *11*, 6–10.

(18) Sarma, B.; Sanphui, P.; Nangia, A. Polymorphism in Isomeric Dihydroxybenzoic Acids. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10* (5), 2388–2399.

(19) Kalkkar, S.; Bais, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology* **2014**, *2014*, 1–9.

(20) Zheng, J.; Haiyan Xiong, H.; Li, Q.; He, L.; Weng, H.; Ling, W.; Wang, D. Protocatechuic acid from chicory is bioavailable and undergoes partial glucuronidation and sulfation in healthy humans. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 3071–3080.

(21) Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 20, Revision 4 (FGE.20Rev4): Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 20, Revision 4 (FGE.20Rev4): Benzyl alcohols, benzaldehydes, a related acetal, benzoic acids, and related esters from chemical groups 23 and 301, *EFSA J.*, **2012**, *10* (12):2994.

(22) Syafni, N.; Prima Putra, D.; Arbain, D. 3,4-Dihydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzaldehyde from the fern *Trichomanes chinense* L.; Isolation, antimicrobial and antioxidant properties. *Indones. J. Chem.* **2012**, *12* (3), 273–278.

(23) Silencio Barrita, J. S.; Sánchez, M. S. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants. *Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases*; IntechOpen: 2013.

3.6. ARTICLE 6: *New and Highly Stable Cocrystal of Vitamin D₃ for its use in enhanced food supplements.*

Cryst. Growth Des. 2021, 21, 3, 1418–1423

L. Bofill¹, D. de Sande², R. Barbas², R. Prohens^{1,2}.

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

A New and Highly Stable Cocrystal of Vitamin D₃ for Use in Enhanced Food Supplements

Lidia Bofill, Dafne de Sande, Rafael Barbas, and Rafel Prohens*

Cite This: *Cryst. Growth Des.* 2021, 21, 1418–1423

Read Online

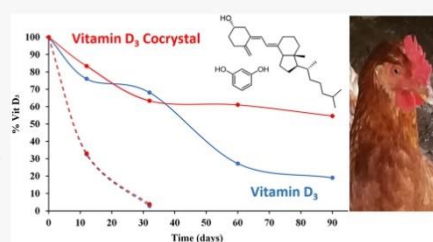
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: A new cocrystal of Vitamin D₃ (Cholecalciferol) and resorcinol has been discovered and characterized through experimental cocrystal screening. Its high stability has been studied against light, heat, and chemicals present in animal food premixes in order to develop a novel and alternative formulation to current microencapsulation approaches to protect Vitamin D₃ from oxidation. Our results show that the new cocrystal is extremely stable and it can become the basis for very efficient formulations of Vitamin D₃ which fulfills the stability requirements of industrial applications.



1. INTRODUCTION

Vitamins are essential nutrients involved in many biochemical metabolism processes, including DNA synthesis, energy production, and biosynthetic pathways. Since the body is not able to naturally provide vitamins in the required concentrations, they must be absorbed from the diet or by means of synthetic preparations.¹

The main role of Vitamin D in vertebrates is the regulation of calcium homeostasis and bone metabolism, but a lack of Vitamin D is also related to some pathologies such as preeclampsia, periodontitis, autoimmune disorders, infectious diseases, cardiovascular diseases, various types of cancer, type 2 diabetes, and neurological disorders.^{2,3} Recently, it has been suggested that the implementation of reference nutrient intakes of Vitamin D “might reduce the impact of COVID-19 in populations where Vitamin D deficiency is prevalent”.⁴

Vitamin D is not a single compound but a group of vitamins, being the prohormones ergocalciferol (Vitamin D₂) and cholecalciferol (Vitamin D₃), the main sources for the hydroxylated metabolites which are active in animals.⁵ Ergocalciferol is widely available from plants and fungi, while cholecalciferol is formed from UV irradiation in the animal skin. Most humans and animals receive only a small amount of Vitamin D (~10%) from food.⁶ Thus, in humans naturally produced Vitamin D₃ is the main source of Vitamin D, however, dietary supplementation becomes necessary in elderly people because aging negatively affects the formation of the active hydroxylated form of Vitamin D, particularly when exposure to sunlight is limited.⁷ In this sense, albeit this particular field is controversial, cholecalciferol has been recommended as the preferred form of Vitamin D in the context of nutritional supplementation⁸ for stability reasons,

while some studies show that Vitamin D₃ is more efficient in the production of the hydroxylated metabolite than Vitamin D₂.^{9,10}

However, preparation of efficient Vitamin D₃ supplement formulations face important problems in terms of chemical stability, since cholecalciferol is unstable to heat and light and easily oxidized.^{11,12} In particular, when processing Vitamin D₃ in animal food through thermal processing methods like extrusion,¹³ an important amount of the vitamin is eventually lost.

It is known that oxidation of sterols is a free radical chain reaction. This is started with the transfer of a hydrogen atom from the sterol oxidation attack sites promoted by oxygen, mainly located at the triene moiety but also including the alcohol group. Thus, protecting Vitamin D₃ from oxidation requires slowing down such reactions.¹⁴

This is why stabilizing methodologies have been developed to protect vitamins from degradation when pelleting. They include chemical modification, spray-dried formulations, and encapsulation techniques, among others. Particularly, beadlets are frequently formed with cross-linked gelatin, which isolates Vitamin D from contact with moisture and destabilizing minerals. However, although this technique has been able to improve the resistance against moisture and chemicals, there

Received: December 18, 2020

Revised: February 3, 2021

Published: February 8, 2021



still remains a need for robust and inexpensive methods for processing, transport, and storage of Vitamin D for any vitamin fortification program.

The use of supramolecular chemistry approaches has been applied to encapsulate sensitive compounds in microenvironments in order to reduce the number of interactions of the guest compound with the bulk solution, providing the encapsulated reactive species with an extra stabilization.¹⁵ On the other hand, strategies consisting of the formation of cavities that isolate unstable compounds from destabilizing environments have also been recently explored in the solid state.¹⁶ A remarkable example of such an application is the coordination cage designed by Nitschke et al. to trap phosphorus (P_4) and protect it from oxidation by air.¹⁷

In this sense, crystal engineering¹⁸ has been used to improve physical and chemical stability of active ingredients with a number of successful examples in both stability and solubility enhancement.^{19–23} In recent work, we have engineered the improvement of ubiquinol stability by introducing an antioxidant coformer in the crystal lattice to prevent oxidation to ubiquinone.²⁴ Moreover, Wang et al. described cocrystals of Vitamin D₃ with cholesterol and cholestanol with increased stability against light and heat, which authors attributed to an increase of density and packing efficiency,²⁵ and with Vitamin D₂ in two polymorphic forms showing very different physicochemical stabilities due to packing reasons.²⁶ Other examples have been reported of drug–drug cocrystallization with improvement of properties.^{27–30}

In this work, we have designed a new cocrystal of Vitamin D₃ which incorporates resorcinol as the stabilizing counterpart in order to transfer its antioxidant properties to the cocrystal and to protect the Vitamin D₃ against degradation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials. Cholecalciferol (Vitamin D₃) used in this study was used as received from Sigma-Aldrich with purity of $\geq 98\%$ according to HPLC (batch SLBQ4022 V). The coformers resorcinol, orcinol, gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, and phloroglucinol were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Methods. **2.2.1. Differential Scanning Calorimetry (DSC).** Differential scanning calorimetry analysis was carried out by means of a Mettler-Toledo DSC-822e calorimeter. Experimental conditions: aluminum crucibles of 40 μ L volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 $^{\circ}$ C/min. The calorimeter was calibrated with indium of 99.99% purity (mp 156.5 $^{\circ}$ C; ΔH 29.03 J/g).

2.2.2. Thermogravimetric Analysis (TGA). Thermogravimetric analyses were performed on a Mettler-Toledo TGA-851e thermobalance. Experimental conditions: alumina crucibles of 70 μ L volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 $^{\circ}$ C/min.

2.2.3. Powder X-ray Diffraction Analysis. Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns were obtained on a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer in transmission configuration using Cu K α 1 + 2 radiation (λ = 1.5406 Å) with a focusing elliptic mirror and a PIXcel detector working at a maximum detector's active length of 3.347 $^{\circ}$. Configuration of convergent beam with a focalizing mirror and a transmission geometry with flat sample sandwiched between low absorbing films measuring from 1 $^{\circ}$ to 40 $^{\circ}$ in 2θ , with a step size of 0.026 $^{\circ}$ and a total measuring time of 8 to 30 min at room temperature (298 K). The powder diffractograms were indexed and the lattice parameters were refined by means of LeBail fits by

means of Dicolvol04,³¹ and the space groups were determined from the systematic absences.

Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns from stability study under 25 $^{\circ}$ C/57% RH and 40 $^{\circ}$ C/75% RH conditions were obtained on a Bruker D2 Phaser θ/θ diffractometer in a Bragg–Brentano reflection geometry with a Si-Einkr. Probenhalter sample holder at 15 rpm rotation speed using Cu K α 1 + 2 radiation (λ = 1.5406 Å) and a 1D-detector (SSD160_2) working at a maximum detector's active length of 3.007 $^{\circ}$, measuring from 2 $^{\circ}$ to 30 $^{\circ}$ in 2θ , with a step size of 0.01 $^{\circ}$ and a total measuring time of 32 min at room temperature (298 K).

2.2.4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Proton nuclear magnetic resonance (1 H NMR) spectra have been recorded on a Varian Mercury 400 (400 MHz). Chemical shifts for proton are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane and are referenced to residual proton in the NMR solvent (acetone- d_6 ; δ 2.05). Experimental conditions: delay, 1; pulse, 45 $^{\circ}$; scans, 32.

2.2.5. Single X-ray Crystallographic Analysis. Single crystal X-ray diffraction (SCXRD) intensity data of Vitamin D₃–Resorcinol cocrystal was collected using a D8 Venture system equipped with a multilayer monochromator and a Mo microfocus (λ = 0.71073 Å). Frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a SAINT algorithm. Data were corrected for absorption effects using the multiscan method (SADABS).³² The structure was solved and refined using the Bruker SHELXTL Software Package, a computer program for automatic solution of crystal structures and refinement by full-matrix least-squares method with ShelXle ver. 4.8.0, a Qt graphical user interface for SHELXL computer program.³³

2.2.6. Stability under Standard Conditions. The stability of the new cocrystal and the starting cholecalciferol material has been studied under two experimental conditions: 25 $^{\circ}$ C and 57% of relative humidity; 40 $^{\circ}$ C and 75% of relative humidity. The samples were stored under both conditions inside a Series FD Binder chamber, and they were analyzed periodically. A saturated solution of sodium bromide salt (57%) and a saturated solution of sodium chloride (75%) were used to control relative humidity.

2.2.7. Dissolution Rate Determination. The small-scale GI dissolution method³⁴ was followed for dissolution rate measurements. First, tablets of 3 mm diameter were prepared using a manual hydraulic tablet press (Applied Measurements Ltd., UK). Applied pressure was 100 kg for 2 min. 6–10 mg of compound, Vitamin D₃ or cocrystal, was weighed. The total exposed surface area was 0.5 cm². Dissolution tests were performed in FaSSiF v2 medium (pH 6.5 using phosphoric acid 28.4 mM) with a GlpKaTM titrator (Sirius Analytical Instruments, UK). Dissolution data were recorded for 25 min at 25 $^{\circ}$ C. The procedure was as follows: 15 mL of FaSSiF v2 medium was added into the sample vial containing the tablet. Spectra collection started immediately after. Spectra were collected every 30 s between 250 and 450 nm through a Sirius D-PAS spectrometer with a bifurcated optic fiber dip probe (Hellma Analytics). The medium was stirred at a constant rate. The spectroscopic data were converted to concentration of Vitamin D₃ by applying the Beer–Lambert law using the molar extinction coefficient of Vitamin D₃ determined in FaSSiF v2 by UV-metric titration. Spectrum regions where signal is saturated ($A > 1.5$) or presenting medium interferences were discarded. Then, the concentration data were converted into absolute sample quantities, and used to generate the graphs

showing the sample quantity vs time. Dissolution rate was obtained through the fit of the first order Noyes–Whitney exponential equation to the data: $[X]_t = S(1 - e^{-k_d(t-t_0)})$. In this equation, $[X]_t$ is the weight in grams of compound in solution at the experiment time (min); S its extrapolated solubility (g); k_d the rate constant for dissolution (min^{-1}); and t_0 (min) is a term allowing for a temporal offset. S , k_d , and t_0 are refined in order to minimize the root-mean-square deviation between the modeled concentrations and the measured concentrations. The dissolution rate (g min^{-1}) is given by the product $k_d S$.

2.2.8. Evaluation of Vitamin D₃ Photostability by HPLC-UV Method. A 1000 mg L^{-1} stock solution of Vitamin D₃ and resorcinol was prepared in acetone and acetonitrile, respectively. Sample analysis was performed by the external calibration method. For that purpose, 9 calibration standards containing Vitamin D₃ were prepared within the calibration range from 0.05 to 20 mg L^{-1} by dilution of the stock solution with acetonitrile. Standards for the external calibration were prepared every day that the analyses were performed. Chemstation software (Agilent) was used for acquisition, integration, and subtraction of peak areas. Sample treatment consisted of 1 mg of sample being weighed and diluted with 1.4 g of acetone in a 2 mL injection vial. For each sample, two replicates were performed. The obtained solution was stirred in a Vortex for 30 s. A dilution of 1:100 (v/v) in acetonitrile was then carried out, and the solution was kept in the darkness until the analysis. The samples under study were periodically analyzed by HPLC¹² as follows:

Determination of Vitamin D₃ content in each sample was performed by HPLC (Agilent 1100 Series HPLC) equipped with a quaternary bomb (G1311A), a degasifier (G1322A), an injector (G1329A), and a diode-array detector (G1315B). HPLC-UV runs were obtained in reversed-phase mode using a Kinetex C18 column (100 mm \times 4.6 mm, 2.6 μm) at 25 °C and a mobile phase (A: Water 0.1% formic acid, and B: Acetonitrile) with a flow rate of 0.8 mL min^{-1} and an isocratic at 95% B (8 min analysis time) gradient, and it was acquired at a wavelength of 270 nm.

2.2.9. Evaluation of the Stability in a Standard Mineral–Vitamin Mix Containing Choline. The study was conducted in the Animal Nutrition and Welfare Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain, www.sniba.es). Two vitamins were tested, a commercial Vitamin D₃ (Vitamin D₃ 500, Orffa Additives B.V., Werkendam, The Netherlands) and the cholecalciferol/resorcinol cocrystal reported in this work.

Two environmental conditions were tested, 25 °C and 57% humidity (temperature controlled chambers with a saturated solution of NaBr to maintain humidity at 57%) and 40 °C and 75% humidity (temperature controlled chambers with a saturated solution of NaCl to maintain humidity at 75%). The tested Vitamin D₃ products were mixed in a standard vitamin and mineral premix (Table 1). The mineral mix was prepared by Super's Diana (Mollet, Barcelona, Spain). The mineral mix was supplemented to contain 750,000 UI/kg Vitamin A (Coxavit A, 1000, Kaesler Animal Nutrition, Cuxhaven, Germany), 5000 mg/kg Vitamin E (Cuxavit E 50, Kaesler Animal Nutrition, Cuxhaven, Germany), and 12.5% choline chloride (choline chloride, vegetal coating, 60%). Vitamin D₃ common concentration in mineral–vitamin premixes is around 160,000 UI/kg (equivalent to 4 mg/kg). Because the dose was much lower than that of Vitamins A and E, and to avoid problems of sample weighing, homogeneity,

Table 1. Additives Contained in the Mineral Mix

nutritional additive	mg/kg
Copper (Copper sulfate pentahydrate)	4.35
Zinc (Zinc Sulfate monohydrate)	17.92
Manganese (Manganese sulfate monohydrate)	5.39
Iodine (Potassium iodine)	137
Selenium (Sodium Selenite)	91
Cobalt (Cobalt Acetate tetrahydrate)	47
Zinc (Zinc-AA quelate, hydrate)	5

and sampling, the final dose of Vitamin D₃ was multiplied by 10 (1,600,000 UI/kg).

The procedures were as follows: Samples (2 g) were weighed in 50 mL plastic tubes and incubated in the experimental conditions (see above). Samples for each individual time were incubated in quadruplicates to account for potential variation. Samples were prepared to be retrieved from incubators at 2, 4, 8, 12, and 18 weeks. After each time, samples were processed and analyzed immediately (no storage). Samples were subjected to an extraction process done in the incubation tube with the full sample to avoid subsampling problems. Extracted supernatant was analyzed for Vitamin D₃ using HPLC (Model 1260 Series, Agilent, Darmstadt, Germany) coupled with a MS-QQQ (Model G6420, Agilent) against a calibrated curve using a standard 25-OH-Vitamin D₃. Results are reported as a percent degradation compared with the original Vitamin D₃ concentration.

3. RESULTS AND DISCUSSION

With the aim to prepare new and stable cocrystals of cholecalciferol (Figure 1), we chose resorcinol as the cofomer

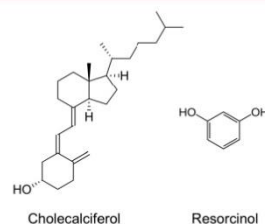


Figure 1. Chemical structures of cholecalciferol and resorcinol.

because it has two good hydrogen bond donors able to interact with the alcohol group of cholecalciferol, it has strong antioxidant properties and because it has a FEMA GRAS status,³⁵ having been authorized as a flavoring substance by the European Food Safety Authority³⁶ with “No safety concern at estimated levels of intake as flavouring substances”. Other polyphenolic cofomers with antioxidant properties such as orcinol, gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, and phloroglucinol were also tested in the cocrystal screen in order to extend our knowledge about the cocrystal, but we focused on resorcinol for regulatory reasons.

Two anhydrous cholecalciferol multicomponent forms were obtained through the cocrystal screening with resorcinol: form A and form B, both in a 1:1 molar ratio (see Supporting Information for further details). However, only form A could be isolated in pure form and fully characterized.

The new cholecalciferol/resorcinol cocrystal (form A) could only be obtained by slow recrystallization at low temperature from a mixture of both components in the liquid phase (see Supporting Information for details), and single crystals suitable for SCXRD analysis could also be isolated in the same process. The crystal structure solved at 100 K reveals a 1:1 stoichiometry with two molecules of each component in the asymmetric unit with very similar crystallographic environment. The two asymmetrically independent molecules of cholecalciferol show different conformations as a consequence of several bond rotations in the C22–C27 terminal aliphatic chain. Interestingly, the alcohol group of the cholecalciferol molecules is completely surrounded by four molecules of resorcinol in a combined array of O–H... π and hydrogen bond interactions (Figure 2). On one hand, a strong and polarized

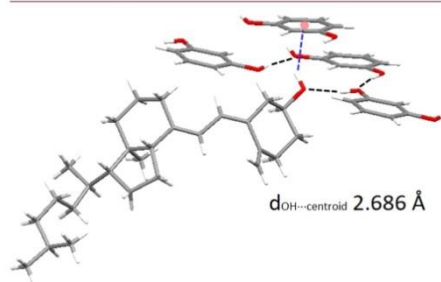


Figure 2. Crystal structure of the cocrystal cholecalciferol/resorcinol. H-bond and O–H... π interactions around the alcohol group of cholecalciferol are highlighted.

hydrogen bond is formed between the proton of the phenol group and the oxygen of the alkyl alcohol. On the other hand, the proton of the alcohol group establishes a O–H... π interaction with the aromatic ring of a resorcinol molecules (OH...centroid distance shown in Figure 2), which acts as the stopper of the cage in which the sensitive alcohol group of cholecalciferol is totally encapsulated. Thus, the presence of resorcinol as an internal antioxidant combined with the encapsulation of the alcohol group can explain the enhancement of stability provided by the cocrystallization of Vitamin D₃.

In order to assess the potential stability of the new cocrystal with regard to cholecalciferol, we initially conducted a photostability study for 2 months, subjecting pure cholecalciferol and the cocrystal to illumination of 5000 lx at 25 °C (relative humidity was not controlled, but it remained between 45% and 60% along the study; see Supporting Information for full evaluation) and periodic analysis of the content of cholecalciferol by HPLC. As Figure 3 shows, the percentage of cholecalciferol in the cocrystal sample is significantly higher than that in the non-cocrystallized Vitamin D₃ just after 20 days of irradiation and more than 3 times higher after 60 days of irradiation. In parallel, we followed by PXRD the crystallographic integrity of both samples protected from light under two standard conditions: 25 °C/60% RH and 40 °C/75% RH. At 25 °C/60% RH, the cocrystal remained stable for more than 5 months, while cholecalciferol showed a loss of crystallinity forming a resinous solid in 4 months. Moreover, at

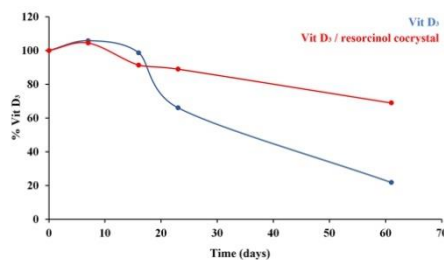


Figure 3. Evolution of content of cholecalciferol (Vit D₃) in the cocrystal vs the commercial cholecalciferol against irradiation of 5000 lx at 25 °C.

40 °C/75% RH cholecalciferol became resinous in only 15 days, while the cocrystal remained unchanged for 5 months.

In addition, dissolution rate measurements were carried out in FaSSiF v2 medium for characterization purposes. Although some degradation products of Vitamin D₃ appeared during the test as a consequence of being in suspension with a water solution, we could determine that the new cocrystal shows a moderate increase of dissolution rate compared to pure Vitamin D₃ (1.8 times higher), according to UV measurements (see Supporting Information for experimental details), which is also an advantageous improvement of the cocrystal with regard to commercial cholecalciferol.

These promising preliminary results encouraged us to get a deeper insight into the performance of the new cocrystal in an aggressive environment where high stability was required, like in animal food premixes containing choline chloride, a supplement which usually accelerates oxidation of vitamins.³⁷ Thus, a mineral and vitamin premix was prepared as a control by using commercial cholecalciferol finely dispersed in a cross-linked matrix of porcine gelatin and carbohydrates, coated with silicates, and stabilized with butylhydroxytoluene as an antioxidant. The cocrystal premix was prepared by using the new cholecalciferol/resorcinol cocrystal as the source of Vitamin D₃ but without either coating or the use of antioxidants. Both premixes were prepared with choline chloride and enriched with minerals, incubated at 25 °C/57% RH and 40 °C/75% RH, and analyzed regularly by HPLC. The results show that both premixes are unstable under 40 °C/75% RH stress conditions, and they degrade almost completely in 30 days. These results show how the premix environment under strong stress conditions significantly affects the chemical stability of the vitamin, even in both coating and cocrystal protection.

However, a remarkable difference is observed under normal conditions (25 °C/57% RH), in which the new cocrystal is much more stable than the commercial cholecalciferol premix formulation. In particular, in 60 days the cocrystal shows the decrease of content in cholecalciferol down only to ~61% (decreasing only to ~55% in 90 days), while the commercial premixes show a bigger reduction down to ~27% (decreasing to ~19% in 90 days, Figure 4).

It is important to emphasize that the premix formulation of the new cocrystal was prepared without any additional stabilizing technique, while the control commercial premix included state-of-the-art protection such as the presence of antioxidants and protective coating. Despite this, the new

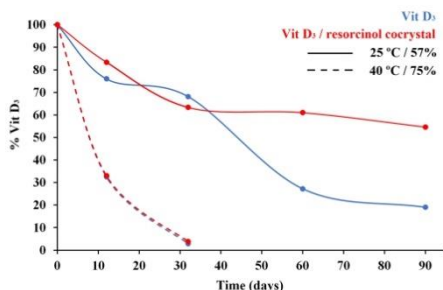


Figure 4. Evolution of content of cholecalciferol (Vit D₃) in the cocrystal vs the commercial cholecalciferol in the mineral and vitamin premix.

cocrystal showed a much higher resistance under a real destabilizing environment usually found in industrial animal food applications. Thus, it is expected that conventional coating formulations could be combined in order to further improve the stability achieved with the cocrystal.

4. CONCLUDING REMARKS

In conclusion, this study is a new example of how crystal engineering can be applied to solve real problems suffered by unstable compounds like vitamins by modifying the physicochemical properties of their solid-state forms, and, in principle, the formation of a protective shield, which hinders the access of molecular oxygen to sensitive functional groups, can be exported to many other compounds, providing a broad application strategy.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.cgd.0c01709>.

Crystal data and structure refinement, synthesis and characterization details, evaluation of stability and dissolution rate determination (PDF)

Accession Codes

CCDC 2046392 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, or by emailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Rafel Prohens – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0003-0294-1720; Email: rafel@ccit.ub.edu

Authors

Lidia Bofill – Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Dafne de Sande – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Rafael Barbas – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0002-1603-3689

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.cgd.0c01709>

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have contributed equally and have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI), for financial support (Neotec SNEO-20161021/CRYSTACURE project). We thank Prof. Sergio Calsamiglia (Universitat Autònoma de Barcelona) for his help in the analysis of the stability in premixes, Dr. Oscar Nuñez (Universitat de Barcelona) for his assistance with the photostability study, and Prof. Clara Ràfols (Universitat de Barcelona) for her support with the dissolution rate measurements.

■ REFERENCES

- (1) Laird, E.; Molloy, A. M. *Water-Soluble Vitamins and Essential Nutrients*, 3rd ed.; Elsevier: Dublin, Ireland, 2014; ISBN 9780128012383.
- (2) Jäpelt, R. B.; Jakobsen, J. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4* (136), 1–20.
- (3) Holick, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2017**, *18* (2), 153–165.
- (4) Martineau, A. R.; Forouhi, N. G. Vitamin D for COVID-19: a case to answer? *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2020**, *8* (9), 735–736.
- (5) Galliera, E.; Corsi Romanelli, M. M. Molecular Basis of Bone Diseases. *Mol. Pathol.* **2018**, 627.
- (6) Göring, H.; Koshuchowa, S. Vitamin D - the sun hormone. Life in environmental mismatch. *Biochemistry (Moscow)* **2015**, *80*, 8.
- (7) Gallagher, J. C. Vitamin D and aging. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2013**, *42* (2), 319–332.
- (8) Vieth, R. Vitamin D supplementation: cholecalciferol, calcifediol, and calcitriol. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2020**, *74*, 1493–1497.
- (9) Tripkovic, L.; Lambert, H.; Hart, K.; Smith, C. P.; Bucca, G.; Penson, S.; Chope, G.; Hyppönen, E.; Berry, J.; Vieth, R.; Lanham-New, S. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95* (6), 1357–1364.
- (10) Tripkovic, L.; Wilson, L.; Hart, K.; Lanham-New, S. Reply to HM Macdonald. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96* (5), 1153–1154.
- (11) Szalzi, N. H.; Alshishani, A.; Saad, B.; Chew, K. Y.; Chong, M. M.; Miskam, M. Salting-out assisted liquid–liquid extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of vitamin D3 in milk samples. *R. Soc. Open Sci.* **2019**, *6*, 190952.
- (12) Mahmoodani, F.; Perera, C. O.; Fedrizzi, B.; Abernethy, G.; Chen, H. Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using

- HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chem.* **2017**, *219*, 373–381.
- (13) Riaz, M. N.; Asif, M.; Ali, R. Stability of Vitamins during Extrusion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 361–368.
- (14) Lengyel, J.; Rimarcik, J.; Vaganeck, A.; Fedor, J.; Lukes, V.; Klein, E. Oxidation of sterols: Energetics of C–H and O–H bond cleavage. *Food Chem.* **2012**, *133*, 1435–1440.
- (15) Galan, A.; Ballester, P. Stabilization of reactive species by supramolecular encapsulation. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1720–1737.
- (16) Wei, W.; Li, W.; Li, Z.; Su, W.; Hong, M. Stabilization and Controlled Release of Reactive Molecules by Solid - State van der Waals Capsules. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 469–473.
- (17) Mal, P.; Breiner, B.; Rissanen, K.; Nitschke, J. R. White Phosphorus Is Air-Stable Within a Self-Assembled Tetrahedral Capsule. *Science* **2009**, *324*, 1697–1699.
- (18) Desiraju, G. R. *Crystal Engineering: The Design of Organic Solids*; Elsevier: Amsterdam, NY, 1989.
- (19) Thakuria, R.; Arhangelskis, M.; Eddleston, M. D.; Chow, E. H. H.; Sarmah, K. K.; Aldous, B. J.; Krzyzaniak, J. F.; Jones, W. Cocrystal Dissociation under Controlled Humidity: A Case Study of Caffeine–Glutaric Acid Cocrystal Polymorphs. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23* (5), 845–851.
- (20) Eddleston, M. D.; Thakuria, R.; Aldous, B. J.; Jones, W. An Investigation of the Causes of Cocrystal Dissociation at High Humidity. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 2859–2864.
- (21) Thakur, T. S.; Thakuria, R. Crystalline Multicomponent Solids: An Alternative for Addressing the Hygroscopicity Issue in Pharmaceutical Materials. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20* (9), 6245–6265.
- (22) Thakuria, R.; Delori, A.; Jones, W.; Lipert, M. P.; Roy, L.; Rodriguez-Hormedo, N. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 101–125.
- (23) Duggirala, N. K.; Perry, M. L.; Almarsson, O.; Zaworotko, M. J. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 640–655.
- (24) Bofill, L.; de Sande, D.; Barbas, R.; Prohens, R. New Cocrystal of Ubiquinol with High Stability to Oxidation. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20* (8), 5583–5588.
- (25) Wang, J.; Zhou, C.; Yu, X.; Mei, X. Stabilizing vitamin D3 by conformationally selective co-crystallization. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 855–858.
- (26) Wang, J.-R.; Yu, Q.; Dai, W.; Mei, X. Drug–drug co-crystallization presents a new opportunity for the development of stable vitamins. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3572–3575.
- (27) Žegarac, M.; Lekšić, E.; Šket, P.; Plavec, J.; Bogdanović, M. D.; Bučar, D.; Dumić, M.; Meštrović, E. A sildenafil cocrystal based on acetylsalicylic acid exhibits an enhanced intrinsic dissolution rate. *CrystEngComm* **2014**, *16*, 32–35.
- (28) Gopi, S. P.; Ganguly, S.; Desiraju, G. R. A Drug–Drug Salt Hydrate of Norfloxacin and Sulfathiazole: Enhancement of in Vitro Biological Properties via Improved Physicochemical Properties. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13*, 3590–3594.
- (29) Sarmah, K. K.; Nath, N.; Rao, D. R.; Thakuria, R. Mechanochemical synthesis of drug–drug and drug–nutraceutical multicomponent solids of olanzapine. *CrystEngComm* **2020**, *22*, 1120–1130.
- (30) Thakuria, R.; Sarma, B. Drug-Drug and Drug-Nutraceutical Cocrystal/Salt as Alternative Medicine for Combination Therapy: A Crystal Engineering Approach. *Crystals* **2018**, *8*, 101.
- (31) Boulton, A.; Louër, D. Indexing of powder diffraction patterns for low-symmetry lattices by the successive dichotomy method. *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 987–993.
- (32) SADABS; Bruker AXS: Madison, Wisconsin, USA, 2004. SAINT, Software Users Guide, Version 6.0; Bruker Analytical X-ray Systems: Madison, WI, 1999. Shelldrick, G. M. SADABS v2.03; Area-Detector Absorption Correction; University of Göttingen: Germany, 1999. Saint, Version 7.60A; Bruker AXS 2008; SADABS, ver. 2008–1, 2008.
- (33) Shelldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122.
- (34) Gravestock, T.; Box, K.; Comer, J.; Frake, E.; Judge, S.; Ruiz, R. The “GI dissolution” method: a low volume, in vitro apparatus for assessing the dissolution/precipitation behaviour of an active pharmaceutical ingredient under biorelevant conditions. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 560–567.
- (35) *Encyclopedia of Food and Color Additives*, Burdock, G. A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, New York, London, Tokyo, 1997.
- (36) The use of Resorcinol as a food additive. *EFSA J.* **2010**, *8* (1), 1411.
- (37) Yang, P.; Wang, H.; Zhu, M.; Ma, Y. Effects of Choline Chloride, Copper Sulfate and Zinc Oxide on Long-Term Stabilization of Microencapsulated Vitamins in Premixes for Weanling Piglets. *Animals.* **2019**, *9*, 1154.

3.7. PATENT: *Cocrystals of ubiquinol and compositions comprising them.*

Patent WO2019/162429A1 (2019)

R. Prohens^{1,2}, R. Barbas², L. Bofill¹, D. de Sande²

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2019/162429 A1

(43) International Publication Date
29 August 2019 (29.08.2019)

(51) International Patent Classification:
C07C 43/205 (2006.01) C07C 41/58 (2006.01)

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

(21) International Application Number:
PCT/EP2019/054420

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(22) International Filing Date:
22 February 2019 (22.02.2019)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
18382109.9 23 February 2018 (23.02.2018) EP

(71) Applicant: **CENTER FOR INTELLIGENT RESEARCH IN CRYSTAL ENGINEERING, S.L.** [ES/ES]; C. Isaac Newton s/n, Edificio Disset, local A5, ParcBIT, 07121 PALMA DE MALLORCA (ES).

(72) Inventors: **PROHENS LÓPEZ, Rafael**; Escola Pia, 32, 1º 6ª, 08201 SABADELL (ES). **BARBAS CAÑERO, Rafael**; Avenida Anselm de Riu, 76, entresuelo 1ª, 08924 SANTA COLOMA DE GRAMENET (ES). **BOFILL HERRERA, Lidia**; C. Gafarró 24, Urb. Can Regasol, 08415 BIGUES I RIELLS (ES). **DE SANDE LÓPEZ, Dafne**; Travessera de Collblanc 47-49 Atic 2ª, 08904 L'HOSPITALET DE LLOBREGAT (ES).

(74) Agent: **ZBM PATENTS - ZEA, BARLOCCI & MARKVARDSEN**; Pl. Catalunya, 1 2nd floor, 08002 BARCELONA (ES).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: COCRYSTALS OF UBIQUINOL AND COMPOSITIONS COMPRISING THEM

(57) Abstract: The present invention relates to a cocrystal of ubiquinol and a hydrogen bond donor cofomer, to a process for the preparation thereof, and to its use as a medicament or a dietary supplement. The invention also relates to compositions comprising the cocrystal.

WO 2019/162429 A1

3.8. PATENT: *Cocrystals of ubiquinone and compositions comprising them.*

Patent WO2020/025781A1 (2020)

L. Bofill¹, D. de Sande², R. Prohens^{1,2}, R. Barbas².

¹Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

²Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2020/025781 A1

(43) International Publication Date
06 February 2020 (06.02.2020)

(51) International Patent Classification:

C07C 50/28 (2006.01) A61K 31/122 (2006.01)
C07C 39/10 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
C07C 39/08 (2006.01)

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number:

PCT/EP2019/070856

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

(22) International Filing Date:

02 August 2019 (02.08.2019)

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

18382590.0 03 August 2018 (03.08.2018) EP

(71) Applicant: **CENTER FOR INTELLIGENT RESEARCH IN CRYSTAL ENGINEERING, S.L.** [ES/ES]; C. Isaac Newton s/n, Edificio Disset, local A5, ParcBIT, 07121 PALMA DE MALLORCA (ES).

(72) Inventors: **BOFILL HERRERA, Lidia**; C. Sot del Pedró nº 18, 08182 SANT FELIU DE CODINES (ES). **DE SANDE LOPEZ, Dafne**; C. Joventut 71 àtic 3a, 08904 L'HOSPITALET DE LLOBREGAT (ES). **PROHENS LÓPEZ, Rafel**; Escola Pia, 32, 1º 6º, 08201 SABADELL (ES). **BARBAS CAÑERO, Rafael**; Avenida Anselm de Riu, 76, entresuelo 1º, 08924 SANTA COLOMA DE GRAMENET (ES).

(74) Agent: **ZBM PATENTS - ZEA, BARLOCCI & MARKVARDSEN**; Rambla Catalunya 123, 08008 Barcelona (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

WO 2020/025781 A1

(54) Title: COCRYSTALS OF UBIQUINONE AND COMPOSITIONS COMPRISING THEM

(57) Abstract: The present invention relates to a cocrystal of ubiquinone and a hydrogen bond donor coformer, to a process for the preparation thereof, and to its use as a medicament or a dietary supplement. The invention also relates to compositions comprising the cocrystal.

4. DISCUSSIÓ

4.1. PTEROSTILBÉ

El pterostilbé (3,5-dimetoxi-4-hidroxistilbè) és un estilbenoide i l'anàleg dimetilat del resveratrol (3,4',5-trihidroxi-trans-stilbè) (Figura 19). Tant el pterostilbé com el resveratrol són fitoalexines, substàncies antimicrobianes i antioxidants [121,122] sintetitzades per plantes com a resistència contra agents patògens. [123,124] És per aquest motiu que, tant el pterostilbé com el resveratrol, es concentren en major quantitat en les pells d'aliments com els nabius i el raïm (per tant en el vi). En el cas del resveratrol es pot trobar també en cacauets, nous i la xocolata.

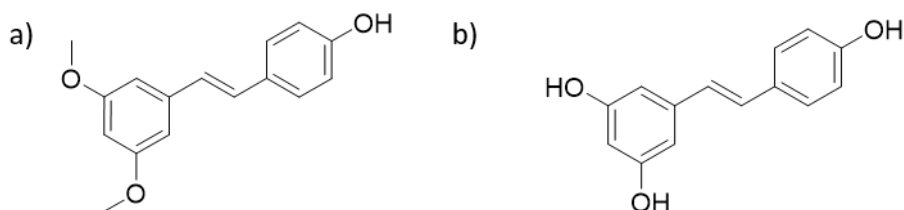


Figura 19. a) Estructura molecular del pterostilbé b) Estructura molecular del resveratrol

Tots dos són compostos de gran rellevància nutricional i, de fet, el resveratrol és conegut mediàticament com l'elixir de l'eterna joventut després de la publicació de l'estudi de David A. Sinclair [125] i els seus col·laboradors, en el qual van donar a conèixer els seus beneficis per a la salut. [126,127] L'any 2002 es va publicar un estudi sobre la ingesta de vi com a explicació a la "Paradoxa Francesa", concepte descriptiu de la incidència relativament baixa de malalties de les artèries coronàries entre la població d'aquesta nacionalitat, entre les quals cal incloure l'angina de pit, l'angina inestable, l'infart miocardiàc i la mort sobtada cardíaca, [128] tot i tenir una dieta relativament rica en greixos saturats.

En els darrers anys el pterostilbé ha suscitat un especial interès, tant per la millor biodisponibilitat respecte al resveratrol, [129] com pels beneficis en relació amb la salut. Diversos estudis demostren que redueix el colesterol, regula els nivells de sucre en sang i actua com a agent anticarcinogènic. Per altra banda, presenta baixa solubilitat i biodisponibilitat i és fàcilment oxidable per diversos enzims.

El fet que aquest compost sigui de gran interès nutracèutic així com la seva problemàtica envers la biodisponibilitat, han motivat l'estudi de nous cocristalls per tal de millorar aquesta propietat fisicoquímica.

Abans d'iniciar l'estudi, es va realitzar una recerca bibliogràfica dels antecedents. Aquesta va proporcionar les següents dades: existeixen cinc formes sòlides anhidres de

pterostilbé (forma I, II, III, IV i V) i un solvat amb butanol. [130] En relació als cocristalls de pterostilbé, n'existeixen quatre amb els següents coformadors: piperazina (CCDC: OWAVUE), àcid glutàric, [131] carbamazepina (CCDC: YABHIU) i cafeïna (CCDC: YABHAM). [132,133] Aquest últim ha estat comercialitzat durant anys al mercat nord-americà (*Chromadex*, EUA). A causa dels diferents buits referents a les característiques cristal·logràfiques, anàlisis de les interaccions moleculars, empaquetament cristal·lí, així com l'absència de les estructures cristal·lines de les formes II i III, es va decidir complementar i organitzar la informació sobre el polimorfisme de pterostilbé abans d'iniciar l'estudi de cocristalls. Durant el transcurs d'aquest procés es van resoldre les estructures cristal·lines de les formes II i III de pterostilbé mitjançant mètodes d'espai directe a partir de dades de PXRD. L'anàlisi d'aquestes formes és la base de la publicació de l'article 1, en el qual s'estudia el fenomen de la polarització de grups funcionals. Una vegada analitzat el comportament polimòrfic del pterostilbé, es va iniciar l'*screening* de cocristalls amb 58 coformadors en 30 dissolvents, el qual va permetre el descobriment de vuit cocristalls de pterostilbé amb 1,4-dimetilpiperazina (1,4-DMP) (2:1), 2,3,5-trimetilpirazina (2,3,5-TMP) (2:1), 1,4,8,11-tetrazaciclohexanecà (TCD) (2:1), etilendiamina (2:1) etilendiamina i H₂O (2:1:2), 1,4-diazabicclo [2.2.2] octà (DABCO) (2:1), àcid picolínic (1:1) i teofil·lina (2:1). El cocristall pterostilbé-teofil·lina existeix com a solvat de diclorometà. No es va poder desolvatar el cocristall de teofil·lina, fet que va originar l'estudi de les interaccions intermoleculars i el descobriment d'un enllaç d'hidrogen inusual del tipus π -(C=C)⋯H. Altrament, durant l'*screening* de cocristalls, es va aïllar i caracteritzar una nova forma anhidra de pterostilbé, a la qual vam anomenar forma IV.

4.1.1. Article 1: *Hydrogen bond polarization overcomes unfavorable packing in the most stable high Z' polymorph of pterostilbene.*

El polimorfisme és un fenomen a tenir en compte a l'hora d'estudiar un compost nutracèutic. Els diferents polimorfs d'un compost nutracèutic, tot i tractar-se d'entitats químicament idèntiques, donen lloc a formes sòlides amb propietats fisicoquímiques diferents (velocitat de dissolució, biodisponibilitat, punt de fusió, etc.). Aquestes propietats, tal i com s'ha introduït anteriorment, són decisives a l'hora de seleccionar una forma sòlida per una aplicació farmacològica específica. També és important establir l'estabilitat relativa entre polimorfs, ja que un polimorf pot transformar-se en un altre més estable termodinàmicament. La transformació del polimorf pot donar-se durant la seva producció, distribució o emmagatzematge.

En aquest article vam presentar un estudi exhaustiu del comportament polimòrfic del pterostilbé amb una caracterització completa de les formes I, II i III, des d'un punt de vista conformacional, d'empaquetament cristal·lí i d'interaccions intermoleculares. A més, vam estudiar l'estabilitat relativa entre aquestes tres formes combinant dades experimentals i mètodes computacionals. També vam discutir el concepte de polarització de l'enllaç d'hidrogen.

Durant l'*screening* de cocrystals, més concret en els estudis de solubilitat qualitius del principi actiu, vam aïllar i caracteritzar les formes I, II i III de pterostilbé. Mitjançant mètodes d'espai directe a través de dades de PXRD, vam resoldre les estructures cristal·lines de les formes II i III (secció 1.6.). Les dades cristal·logràfiques es troben a la taula 2.

Taula 2. Dades cristal·logràfiques de les formes I, II i III de pterostilbé

Forma	I	II	III
Sistema	Monoclínic	Monoclínic	Monoclínic
Grup espacial	P21/c	P21/n	P21/c
a, b, c (Å)	15,4310(9)	9,5466(3)	15,7225(8)
	5,7893(3)	4,11726(9)	11,0550(5)
	30,8114(19)	33,6694(13)	7,6201(3)
α, β, γ (°)	90	90	90
	93,277(2)	93,162(2)	94,025(2)
	90	90	90
Volum (Å ³)	2748,0(3)	1321,39(7)	1321,20(10)
CCDC	1896241	1896242	1896244

Per altra banda, establir l'estabilitat relativa entre polimorfs és una part important a estudiar quan un compost presenta polimorfisme, ja que normalment la forma polimòrfica més estable és aquella que es comercialitza. Qualsevol altre polimorf és metastable i, per tant, poden acabar transformant-se en la forma més estable. Aquest fet pot causar problemes com inestabilitat física, canvis en la biodisponibilitat, etc. [134] Per tal d'establir l'estabilitat relativa entre les formes polimòrfiques del pterostilbé vam realitzar experiments de transformació mediada pel dissolvent entre les diferents formes i la forma I. La forma I va resultar la més estable.

Taula 3. Paràmetres utilitzats per avaluar l'estabilitat relativa de les formes I-III de pterostilbé

	Forma I	Forma II	Forma III
Nombre de molècules independents (Z')	2	1	1
Densitat (mg/m ³)	1,250	1,288	1,288
Coefficient d'empaquetament	0,76	0,83	0,84
GGA-PBE Energia reticular ^a	-40,06	-40,72	-40,23
LDA-PWC Energia reticular ^a	-96,43	-107,46	-108,81

^a Energia reticular en Kcal/mol

Els tipus d'interaccions intermoleculares i l'empaquetament són diferents en les tres formes polimòrfiques. La forma I presenta un tipus d'interacció d'enllaç d'hidrogen

OH...OH entre els grups fenols i té un empaquetament de tipus helicoïdal, mentre que les formes II i III comparteixen el mateix tipus d'interacció OH...OCH₃, però presenten empaquetaments diferents: cadenes helicoïdals i capes tipus zig-zag respectivament. Segons els valors de la taula 3 caldria esperar que la forma I fos la menys estable ja que presenta un valor de densitat i coeficient d'empaquetament més baix (Regles de Burger-Ramberger). A més, té uns valors d'energia reticular més petits que els altres dos polimorfs.

En relació als valors d'energia reticular calculats, Day *et. al* esmenten que l'ús de tècniques DFT convencionals per al càlcul de l'energia reticular, ignora la contribució energètica relacionada amb la vibració de les molècules al voltant de les seves posicions d'equilibri. Això, sovint s'omet per tal de simplificar el càlcul i reduir el cost computacional, fet que pot suposar un canvi en les estabilitats relatives. Això ens suggereix que el càlcul realitzat a nivell DFT podria no ser prou precís, en el nostre cas, per discernir l'estabilitat relativa entre els polimorfs del pterostilbé.

Si bé tots aquests paràmetres poden suggerir que la forma I és la menys estable, tal i com s'ha esmentat anteriorment, els experiments de transformació mediada pel dissolvent indiquen el contrari. Per trobar una explicació a aquest fet vam analitzar la superfície de potencial electrostàtic molecular (MEPS), tant de la molècula de pterostilbé com dels diferents agregats observats en les estructures cristal·lines, per tal d'estudiar l'habilitat acceptora i donadora dels grups funcionals del pterostilbé. Els càlculs els vam realitzar mitjançant la determinació dels màxims i mínims de potencial a nivell DFT amb el programa Spartan. [135]

A continuació vam estimar els punts d'interacció de la superfície (*Surface Site Interaction Points*, SSIP), per descriure l'habilitat d'un donador (α) i acceptor (β), seguint l'estratègia desenvolupada per Hunter *et. al* (Secció 1.3).

L'àtom d'oxigen del grup fenol actua com a donador ($\alpha = 3,5$). Per altra banda, els grups acceptors poden ser l'oxigen del grup metoxi ($\beta = 3,7$) i l'oxigen del grup fenol ($\beta = 4,3$). Per tal d'establir la millor combinació acceptor-donador es va calcular l'energia d'interacció entre els grups donadors i acceptors de manera aproximada a través del producte dels valors de α i β . Tal i com s'observa a la taula 4, el producte $\alpha\beta$ més gran és el que es dona en la forma I ($\alpha\beta = 14,4$). Això indica que la interacció entre el grup donador fenol i el grup acceptor fenol és la més forta. Tanmateix, la força d'aquest

contacte intermolecular per si sola no pot explicar la major estabilitat de la forma I, ja que altres interaccions dèbils podrien equilibrar l'energia en una estructura millor empaquetada, com és el cas de les formes II i III.

L'estudi publicat per Hunter *et. al* descriu la millor solvatació en agregats d'alcohols degut a l'augment de la polaritat dels grups hidroxils terminals. Guiats per aquest fenomen cooperatiu, vam calcular els paràmetres d'enllaç d'hidrogen mitjançant el càlcul dels valors (α i β) en els extrems dels agregats, des del monòmer fins a agregats de quatre unitats per als dos tipus d'enllaç d'hidrogen observats en cadascuna de les tres formes. (Taula 4 i Figura 20).

El fenol implicat en el motiu helicoidal de la forma I augmenta la seva capacitat donadora i acceptora indicant així l'existència de polarització de l'enllaç d'hidrogen. D'altra banda, en la forma II, la capacitat acceptora de l'oxigen del grup metoxi terminal augmenta amb el nombre d'unitats de l'agregat, però la capacitat donadora disminueix en una proporció similar, amb l'energia de l'enllaç d'hidrogen. La interacció, que es pot estimar mitjançant el producte $\alpha\beta$, es manté gairebé constant. A més, a la forma III tant els valors de α com de β augmenten amb el nombre d'unitats dels agregats, però amb menor extensió a la de la forma I (taula 4).

Taula 4. Paràmetres d'enllaç d'hidrogen de la unitat terminal (donador o acceptor) en els agregats dels tres polimorfs de pterostilbé i producte dels paràmetres d'enllaç d'hidrogen ($\alpha\beta$) des del monòmer ($N = 1$) fins al tetràmer ($N = 4$). El valor α correspon a l'àtom d'hidrogen del grup fenol en les tres formes, mentre que el valor β correspon a l'àtom d'oxigen fenol en la forma I, i a l'àtom d'oxigen del grup metoxi en les formes II i III.

Forma I			Forma II			Forma III					
N	α	β	$\alpha\beta$	N	α	β	$\alpha\beta$	N	α	β	$\alpha\beta$
1	3,56	4,06	14.4	1	3,50	3,70	12.9	1	3,50	3,93	13.8
2	4,47	6,11	27.3	2	3,00	3,72	11.1	2	3,84	4,48	17.2
3	4,74	6,98	33.1	3	2,93	4,00	11.7	3	4,04	4,71	19.0
4	4,60	7,24	33.3	4	2,84	4,07	11.6	4	4,11	4,87	20.0

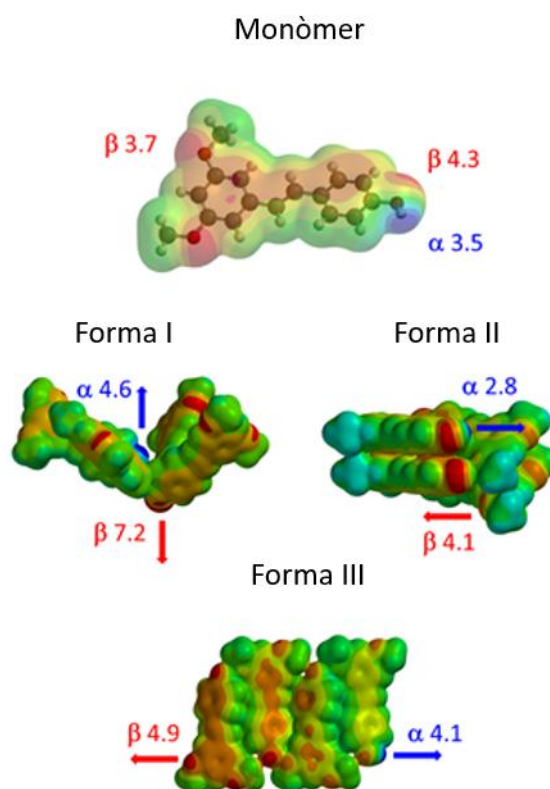


Figura 20. MEPS del monòmer de pterostilbé i del tetràmer dels tres polimorfes (I, II i III). Els paràmetres (α i β) es troben indicats en blau i vermell respectivament i les fletxes indiquen la direcció en la qual creix l'enllaç d'hidrogen

En resum, en aquest capítol hem estudiat el polimorfisme del compost nutracèutic pterostilbé, hem resolt les estructures cristal·lines de les formes II i III a partir de dades de PXRD, també hem descrit els efectes de polarització en l'estructura cristal·lina de la forma I, ja coneguda prèviament i s'han discutit les característiques estructurals de la forma més estable en relació a l'estabilitat relativa entre els polimorfes d'aquest important producte natural. Finalment, aquest estudi demostra que l'efecte de polarització entàlpica pot compensar la penalització entròpica en l'empaquetament helicoidal poc eficient de la forma I, sent així la força motriu que estabilitza l'empaquetament cristal·lí ineficient en la forma més estable del pterostilbé.

4.1.2. Article 2: *A late appearing polymorph of nutraceutical Pterostilbene*

El desenvolupament d'una formulació d'un principi actiu no és un procés trivial sobretot si aquest presenta polimorfisme. La desaparició de la forma polimòrfica estable coneguda o l'aparició sobtada d'una nova forma més estable pot tenir repercussions econòmiques i sanitàries. Aquests dos fenòmens han generat els termes, en anglés, *disappearing polymorphism* i *late appearing polymorphism* respectivament. El primer fa referència a una forma cristal·lina que s'ha preparat almenys una vegada i s'ha establert la seva existència experimentalment mitjançant alguna observació o mesura. No obstant, intents posteriors per preparar-la seguint el mateix procediment condueixen a una forma cristal·lina diferent, sola o conjuntament amb l'anterior. Si apareix una barreja de les dues formes molt sovint domina la nova forma i no es pot obtenir l'anterior [136] i, recuperar-la de nou pot requerir un temps i un esforç considerable. Un dels exemples més coneguts és el del Ritonavir, un compost antiviral comercialitzat com a *Norvir* per al tractament de la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA). [137] A diferència de l'anterior concepte el *late appearing polymorphism* [138] està relacionat amb l'obtenció d'una nova forma cristal·lina que pot ser més o menys estable termodinàmicament que l'original. N'és un exemple la rotigotina (Neupro), fàrmac utilitzat en l'estimulació del cervell en pacients amb la malaltia de Parkinson.

Aquest segon article tracta de l'aparició tardia d'un nou polimorf de pterostilbé (forma IV). Aquesta nova fase cristal·lina es va observar per primera vegada durant l'*screening* de cocristalls. Vam aconseguir aïllar-la i caracteritzar-la per primera vegada mitjançant experiments de *drop-grinding* partint de la forma II de pterostilbé en acetona. La seva caracterització ens va permetre identificar-la com una nova forma anhidra de pterostilbé (DSC, TGA, ¹H-RMN i PXRD). Partint d'aquesta forma IV i mitjançant experiments d'evaporació lenta en toluè vam obtenir els cristalls idonis per resoldre la seva estructura cristal·lina per SCXRD.

La comparació de les dades cristal·logràfiques de la forma IV enfront de les altres formes de pterostilbé (forma I, II i III) conegudes es presenta a la Taula 5.

Taula 5. Dades cristal·logràfiques de les formes I, II, III i IV de pterostilbé

Forma	I	II	III	IV
Sistema	Monoclínic	Monoclínic	Monoclínic	Monoclínic
Grup espacial	$P2_1/c$	$P2_1/n$	$P2_1/c$	$C2/c$
a (Å)	15,4310(9)	9,5466(3)	15,7225(8)	17,282(10)
b (Å)	5,7893(3)	4,11726(9)	11,0550(5)	7,629(4)
c (Å)	30,8114(19)	33,6694(13)	7,6201(3)	41,71(2)
α (°)	90	90	90	90
β (°)	93,277(2)	93,162(2)	94,025(2)	98,812(17)
γ (°)	90	90	90	90
Vol (Å ³)	2748,0(3)	1321,39(7)	1321,20(10)	5435(5)
Z	8	4	4	16
Densitat	1,250	1,288	1,288	1,253
Z'	2	1	1	2

La forma IV presenta el mateix tipus d'interacció principal que les formes II i III de pterostilbé (interacció del tipus OH \cdots OCH₃). Seguint el raonament exposat a l'article 1, es podria especular amb la possibilitat que fos una forma metaestable respecte la forma I. La forma IV presenta inferior densitat i coeficient d'empaquetament. Amb tot, les dades experimentals indiquen el contrari. En els experiments de transformació mediada pel dissolvent entre les formes (I, II i III) i la forma IV s'observa una transformació completa en la forma IV en només 4 dies. A més, la diferència d'energia reticular entre la forma I i la forma IV és de 0,74 kcal/mol, essent aquesta diferència tan petita que no permet extreure conclusions definitives. [22]

Durant el transcurs de la discussió es va plantejar el fet que una possible adsorció d'aigua pogués arribar a estabilitzar la forma IV de pterostilbé. Les interaccions que es produeixen a la superfície del cristall s'anomenen sintons extrínsecs [139] i poden tenir un impacte significatiu sobre l'estabilitat de la forma cristal·lina [140,141] i les seves propietats fisicoquímiques. [142,143] Per tal d'entendre com les superfícies dels cristalls poden interaccionar amb la solució-ambient durant el creixement dels cristalls es pot fer servir la predicció de la morfologia. [139]

La predicció de la morfologia cristal·lina que hem utilitzat segueix el mètode de Bravais-Friedel-Donnay-Harker (BFDH), [144] així com en la *Attachment Energy* (AE) per a

morfologies de creixement. [145,146,147] El mètode BFDH es basa en el teorema de Wulff. [148] Aquest exposa que la forma d'equilibri termodinàmic del cristall serà aquella necessària per minimitzar l'energia superficial en un volum determinat. D'aquesta manera el cristall queda limitat per cares situades a distàncies proporcionals a l'energia superficial. La cara més gran serà aquella que presenti l'energia superficial més baixa. D'igual forma, les cares més llargues seran aquelles que presentin major distància interplanar (distància que separa físicament dos plans reticulars hkl idèntics, d_{hkl}). [149] El programa de visualització d'estructures cristal·lines Mercury permet fer aquest tipus de càlcul, [150] el qual no té en compte l'energia del sistema, per tant, a mesura que la contribució dels enllaços sigui més forta aquesta predicció serà menys exacte.

En relació a la morfologia de creixement del cristall, l'energia del sistema és proporcional a la seva energia d'adhesió (*attachment energy*), definida com l'energia alliberada en connectar una nova capa de molècules cristal·litzades sobre una cara del cristall (hkl). Les cares més llargues que tinguin una energia d'adhesió més petita seran les que tinguin un creixement més lent. [151]

En la morfologia de la forma IV de pterostilbé (Figura 21) s'observa que un 56% de la superfície del cristall correspon a les cares $\{002\}$ i $\{00-2\}$. Aquestes cares tenen els grups fenols apuntant cap a l'exterior del cristall, una peculiaritat que les altres formes de pterostilbé no presenten.

També s'ha realitzat aquest mateix càlcul amb el software Materials Studio utilitzant el *forcefield* COMPASS, produint un resultat similar amb un 45% de la superfície del cristall amb els grups fenols apuntant a l'exterior.

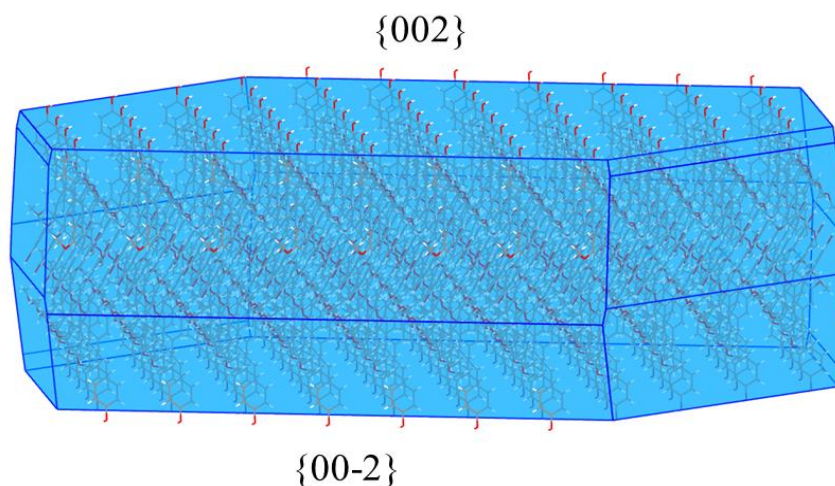


Figura 21. Morfologia del cristall segons el mètode BFDH de la forma IV, les cares (002) i (00-2) estan indicades

Per tal de veure si realment la interacció fenol/aigua en la forma IV podia compensar la menor estabilitat dels enllaços d'hidrogen metoxi/fenol en la forma IV i fenol/fenol en forma I, es van realitzar diversos experiments en condicions anhidres utilitzant diferents agents dessecants. (Taula 6) Al cap de 90 minuts, es van analitzar per PXRD les mesclades finals i en tots els casos s'observa la conversió total a la forma IV, per tant, vàrem descartar la hipòtesi de l'estabilització de la forma IV a través d'una possible interacció superficial amb aigua, demostrant que l'estabilització interna és la responsable de la menor energia de la forma IV.

Taula 6. Experiments realitzats amb diferents agents dessecants.

Agent dessecant	Dissolvent	Formes en <i>slurry</i>	Forma resultant
Tamís molecular	Heptà/ Ciclohexà	Forma I- Forma IV	Forma IV
Sulfat de sodi anhidre	Heptà/ Ciclohexà	Forma I- Forma IV	Forma IV
Sulfat de calci hemihidratat	Heptà/ Ciclohexà	Forma I- Forma IV	Forma IV

Per tant es va decidir realitzar l'estudi de les interaccions moleculars fent ús de tècniques computacionals per tal de trobar aquelles diferències energètiques subtils que poguessin explicar la major estabilitat la forma IV. (Figura 22)

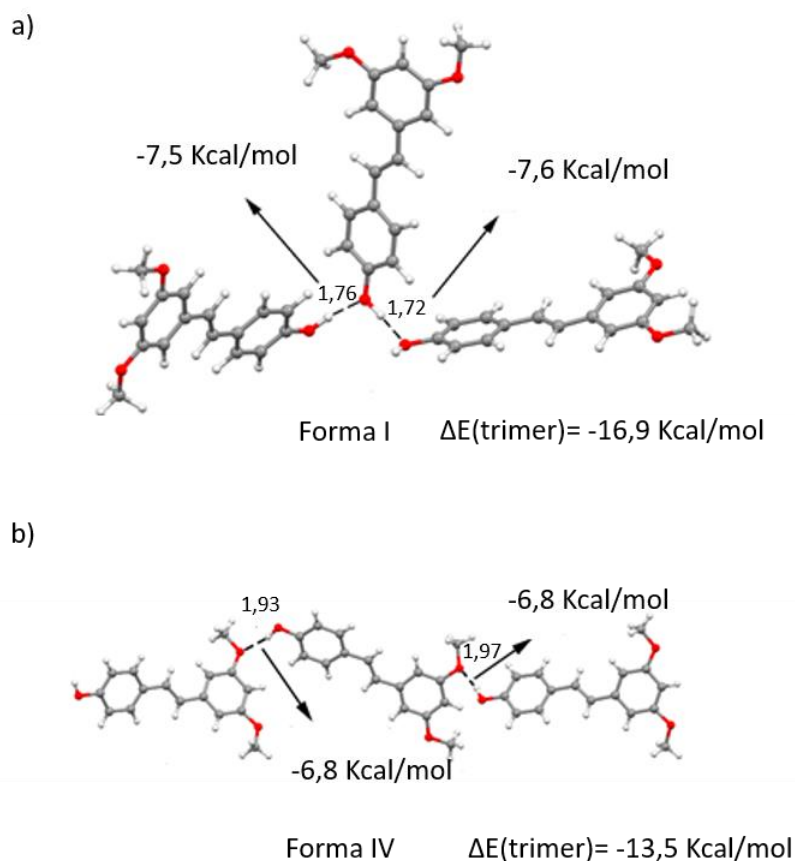


Figura 22. Representació de les estructures dels trímers emprats per al càlcul d'energia d'enllaç d'hidrogen, i distàncies d'enllaç (Å) a) Forma I de pterostilbé I b) forma IV de pterostilbé

Utilitzant el mètode PBE1PBE-D3/def2-TZV s'han calculat les energies associades a l'enllaç d'hidrogen. Per a la forma I, les energies d'interacció dels enllaços d'hidrogen són $-7,5$ i $-7,6$ Kcal/mol (Figura 22a) i per a la forma IV, són més febles, ambdós són $-6,8$ Kcal/mol (Figura 22b). Aquest anàlisi inicial demostra que la forma I hauria de ser més estable si només es prenen els enllaços d'hidrogen. Però si calculem l'energia de formació del trímer per la forma I és de $-16,9$ Kcal/mol més gran en valor absolut que la suma de les energies d'interacció dels enllaços d'hidrogen, el que revela els efectes de cooperativitat en la forma I. A diferència de la forma IV, la qual confirma la manca d'efectes de cooperativitat, l'energia de formació del trímer és $-13,5$ Kcal/mol la qual correspon aproximadament a la suma de les energies dels enllaços d'hidrogen individuals.

D'altra banda, l'estructura de la forma IV té dues molècules a la unitat asimètrica, els dos isòmers es diferencien en el fet que l'isòmer A té els grups metoxi en sentit horari, mentre que l'isòmer B té els grups metoxi en direcció contrària. (Figura 23)

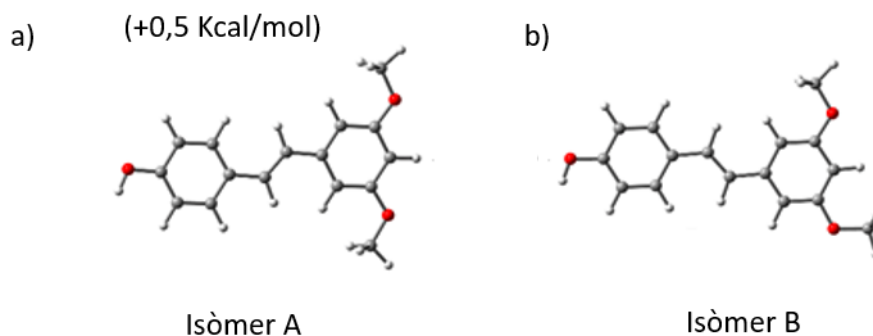


Figura 23. Geometries extretes del càlcul PBE1PBE-D3/def2-TZVP dels dos isòmers de pterostilbé de la forma IV i la seva diferència energètica

El càlcul d'energies en aquests dos isòmers revela que l'isòmer B és el més estable i està present en la forma I, a diferència de la forma IV que conté la meitat de cadascun d'ells. Mitjançant el càlcul d'energia del dímer hem conclòs que l'aportació d'aquest enllaç (-3,0 kcal/mol) en la forma IV, i no en la forma I, permet compensar l'efecte polaritzant d'aquesta última. (Figura 24a). La formació del dímer ha estat confirmada utilitzant el càlcul de la distribució QTAIM (Figura 24b) en la que s'observen els punts crítics d'enllaç (esferes verdes) i els punts crítics d'anell (esferes grogues).

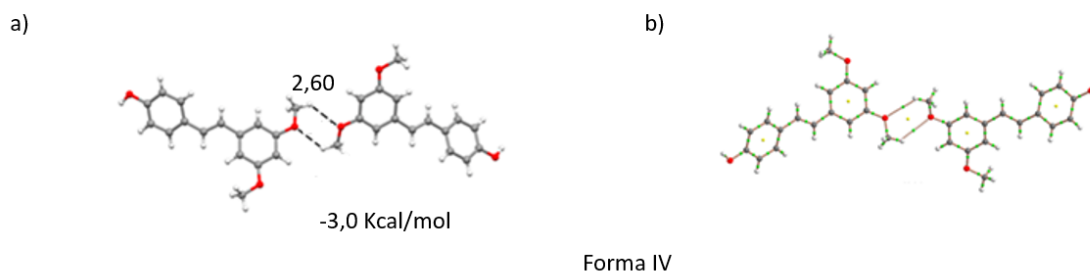


Figura 24. Representació del dímer de la forma IV (l'energia i les distàncies d'enllaç es troben en la imatge) i distribució QTAIM (PBE1PBE-D3/def2-TZVP) de punts crítics d'enllaç i anell (esferes verdes i grogues, respectivament) i trajectòria d'enllaç en el dímer autoensamblat del polimorf IV

Finalment, hem comparat les interaccions $\text{CH}_3 \cdots \pi$ que s'observen en la forma I i la forma IV. Els dímers estudiats es troben en la Figura 25 amb les respectives energies de dimerització. Les interaccions $\text{CH}_3 \cdots \pi$ que impliquen els anells 1,5-dimetoxifenil són gairebé idèntics en ambdós polimorfs (Figura 25 a i b). Tanmateix, la interacció $\text{CH}_3 \cdots \pi$ amb l'anell del fenol (Figura 25 c i d) és més favorable en forma IV (1,5 Kcal/mol).

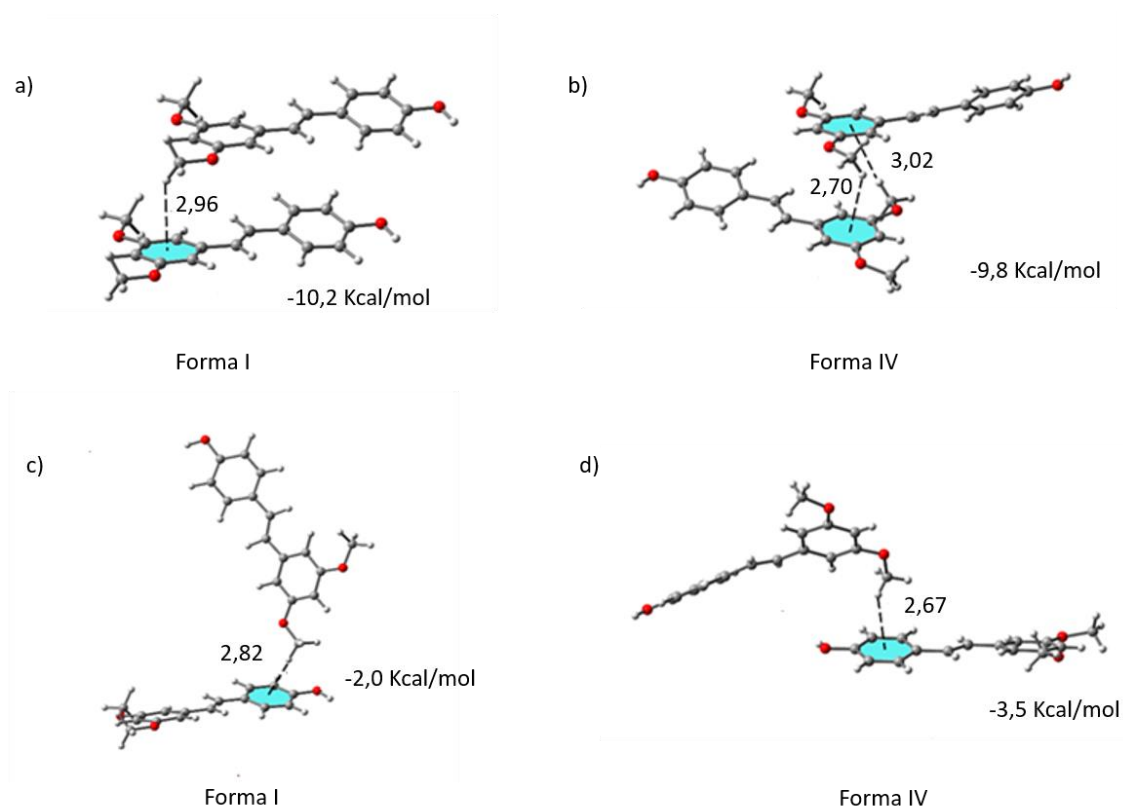


Figura 25. Càlcul de l'energia de l'enllaç tipus $\text{CH}_3 \cdots \pi$ (PBE1PBE-D3/def2-TZVP)

En conclusió, els estudis computacionals realitzats per DFT confirmen la cooperativitat de la forma I (estudiada en l'article 1) i l'absència d'aquest efecte en la forma IV. A més, les interaccions secundàries presents en la forma IV (tant en la interacció formada pel dímer de l'isòmer A, $\text{OCH}_3 \cdots \text{OCH}_3$, com en la interacció $\text{CH}_3 \cdots \pi$) són suficientment rellevants energèticament per a produir un gran impacte en l'estabilitat relativa entre polimorfs, justificant així que la forma I sigui metastable respecte a la forma IV.

4.1.3. Article 3: *Novel Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene*

Aquest article descriu l'assoliment d'un dels objectius principals d'aquesta tesi doctoral: l'ús de la cocrystal·lització com un enfocament eficaç per a la modificació de l'estructura cristal·lina i, per tant, de les propietats fisicoquímiques del compost nutracèutic pterostilbé. S'ha dissenyat, sintetitzat i caracteritzat vuit noves formes sòlides del compost nutracèutic pterostilbé, de les quals una d'elles presenta major biodisponibilitat oral en rates en relació el pterostilbé comercial.

El procés d'obtenció d'un cocristall comença per la selecció dels coformadors, podent-se emprar enfocaments d'enginyeria cristal·lina. Tal i com s'ha descrit en l'article anterior, per un costat la molècula de pterostilbé té valors molt negatius de MEP localitzats en els àtoms d'oxigen dels grups metoxi i fenol, per l'altre té valors molt positius en l'àtom d'hidrogen fenòlic. Així, tenint en compte la naturalesa electrostàtica dual del pterostilbé, es varen triar coformadors que tinguessin grups donadors i acceptors d'enllaços d'hidrogen forts com ara àcids carboxílics, àcids hidroxibenzoics, fenols i amines. En concret es van utilitzar 58 coformadors. A continuació, mitjançant les tècniques experimentals de mòlta (*drop-grinding*), suspensió (SY), cristal·lització (RC) i evaporació lenta, es van realitzar 634 experiments amb 30 dissolvents diferents. Vam aïllar i caracteritzar vuit cocristalls de pterostilbé amb els següents coformadors: 1,4-dimetilpiperazina (1,4-DMP) (2:1), 2,3,5-trimetilpirazina (2,3,5-TMP) (2:1), 1,4,8,11-tetrazaciclohexandecà (TCD) (2:1), etilendiamina (2:1) etilendiamina i H₂O (2:1:2), 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octà (DABCO) (2:1), àcid picolínic (1:1) i teofil·lina (2:1) en forma de solvat de diclorometà.

Mitjançant les tècniques experimentals d'evaporació lenta es van obtenir monocristalls de cinc cocristalls de pterostilbé, i vam resoldre les seves estructures cristal·lines mitjançant difracció de raigs X de monocristall (SCXRD). Les seves dades cristal·logràfiques es troben a la taula 7.

Taula 7. Dades cristal·logràfiques dels cocristalls de pterostilbé resolts per difracció de monocristall

Coformador	Etilendiamina	DABCO	TCTD	1,4-DMP	2,3,5-TMP
Fórmula empírica	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	C ₃₈ H ₄₄ N ₂ O ₆	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	C ₃₉ H ₄₂ N ₂ O ₆
Pes molecular	286.34	614.75	356.45	313.38	634.74
Temperatura (K)	100(2)	100(2)	100(2)	100(2)	100(2)
Sistema cristal·lí	Monoclínic	Monoclínic	Monoclínic	Monoclínic	Triclínic
Grup espacial	P21/c	P21/c	P21/n	P21/c	P21/n
a, b, c (Å)	11,3119(3)	27,1201(16)	8,4888(3)	10,4766(4)	7,9098(9)
	5,13890(10)	6,1642(4)	11,2401(5)	6,6402(3)	9,2397(10)
	26,6010(8)	21,6656(13)	19,8309(9)	25,5452(12)	23,359(3)
α, β, γ (°)	90	90	90	90	83,699(5)
	101,0990(10)	112,389(2)	95,955(2)	93,391(2)	88,189(5)
	90	90	90	90	79,3189(5)
Volum (Å ³)	1517,41(7)	3348,9(4)	1881,95(14)	1773,98(13)	1666,6(3)
Z	4	4	4	4	2
Densitat (calc.) (mg/m ³)	1,253	1,239	1,258	1,173	1,265
Índex R finals [I > 2σ(I)]	R1=,0375, wR2=0,0912	R1=0,0779, wR2=0,2067	R1=0,0437, wR2=0,1049	R1=0,0475, wR2=0,1318	R1=0,0759, wR2=0,1397
CCDC	2017899	2017892	2017897	2017896	2017895

Dels vuit cocristalls de pterostilbé obtinguts s'ha avaluat la velocitat de dissolució d'àcid picolínic i d'etilendiamina. Aquesta s'ha mesurat utilitzant el mètode de disc en l'aparell GlpKaTM titrator (Sirius Analytical Instruments, UK). Aquest mètode consisteix en dissoldre un comprimit del principi actiu/cocristall d'un pes conegut en un determinat medi, en el nostre cas s'ha fet servir FASSIF o FESSIF (medi que simula els fluids intestinals secretats en condicions de règim de dejuni o després d'alimentar-se, respectivament a un pH determinat). Durant l'experiment, l'instrument afegeix automàticament el medi de dissolució sobre el comprimit. Una vegada afegit tot el medi de dissolució, s'inicia la mesura d'una senyal analítica que és proporcional a la concentració de l'anàlit (t₀). El medi és agitat a una velocitat constant, mentre la mostra es troba estàtica. (Figura 27)

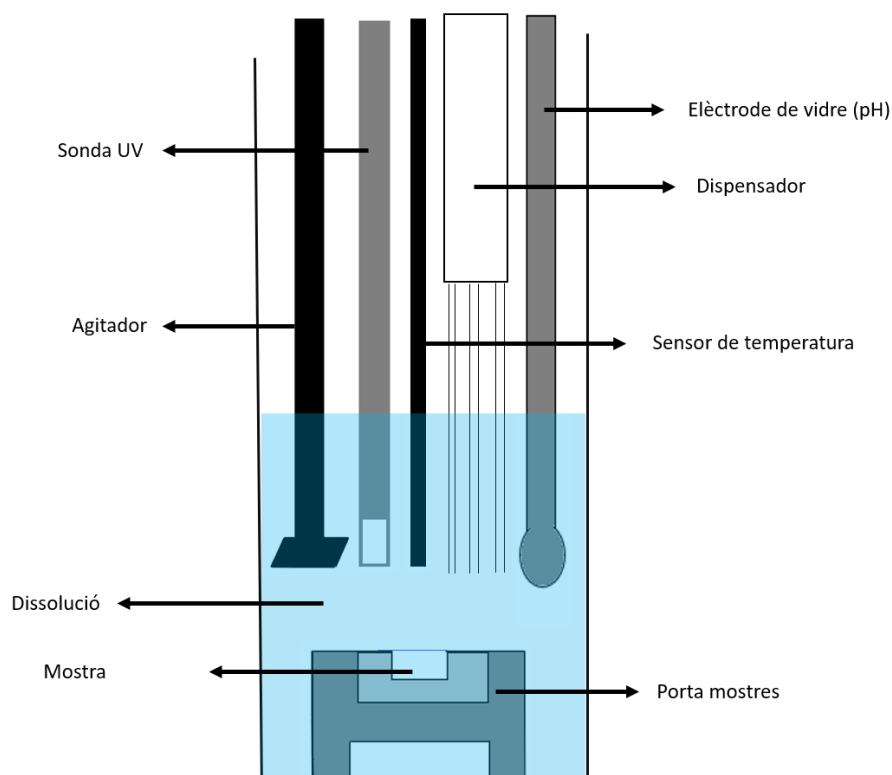


Figura 27. Representació del mètode de velocitat de dissolució utilitzant l'aparell GIpKaTM titrator (Sirius Analytical Instruments, UK) (Adaptat de la referència [152])

Els espectres d'absorció UV-visible es registren mitjançant una sonda durant un període determinat (120 min, temps aproximat que transcorre des de que el fàrmac és ingerit via oral fins a que arriba al tracte gastrointestinal). La concentració del principi actiu es determina en solució periòdicament a partir de les dades espectroscòpiques mitjançant l'aplicació de la llei de Lambert Beer, previ càlcul del coeficient d'extinció molar de cada component que forma el cocristall. La concentració de principi actiu en solució augmenta a mesura que es dissol el comprimit, de manera que es pot monitoritzar al llarg del temps. A continuació, cal ajustar les dades experimentals a l'equació de primer ordre exponencial de Noyes-Whitney per obtenir la velocitat de dissolució (Equació 10), obtenint-se els paràmetres S , K_d i t_0 . La velocitat de dissolució s'obté a través del producte $K_d \cdot S$ ($\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$).

$$[X]_t = S(1 - e^{-K_d(t-t_0)})$$

Equació 10. Equació de primer ordre exponencial de Noyes-Whitney

On $[X]_t$ és el pes del principi actiu en solució a temps (t), S (g) és la solubilitat extrapolada del principi actiu, K_d és la constant de velocitat per a la dissolució (min^{-1}) i t_0 (min) és el temps d'inici de la mesura. Generalment, la dissolució del cocristall es produeix en poc temps, menys de 30 minuts, i es manté durant un temps suficient d'entre 4-6 hores (perfil típic de velocitat de dissolució). Els perfils de velocitat mitjana de dissolució dels cocristalls d'àcid picolínic (línia vermella) i d'etilendiamina en forma hidratada (línia grisa) i en forma anhidra (línia verda) respecte a la de pterostilbé forma I (línia blava) i el cocristall de pterostilbé: cafeïna, ja conegut es troben representats en la Figura 28.

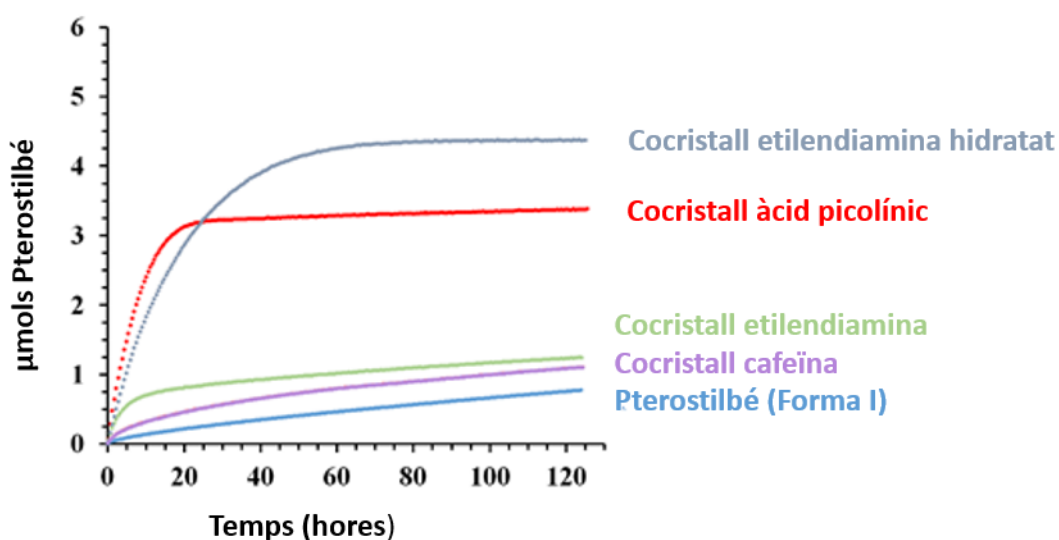


Figura 28. Perfils de velocitat de dissolució mitjana de la forma I de pterostilbé (línia blava), cocristall de cafeïna (línia lila) cocristall d'àcid picolínic (línia vermella), cocristall d'etilendiamina anhidra (línia verda) i cocristall d'etilendiamina hidratat (línia grisa)

Els dos perfils de velocitat de dissolució mitjana que destaquen són el cocristall d'etilendiamina hidratat i el cocristall d'àcid picolínic, ja que mentre que la quantitat de pterostilbé forma I en solució continua augmentant als 120 min, els cocristalls d'àcid picolínic i etilendiamina hidratat es dissolen a un ritme més elevat i aconseguen un altiplà de concentració de pterostilbé als 20 i 60 min respectivament. La quantitat de pterostilbé en solució aconseguida amb la dissolució dels cocristalls és 3-4 vegades superior a la quantitat assolida després de 2 hores de dissolució del compost pur i del cocristall de cafeïna, tot i que el cocristall d'etilendiamina triga més a assolir la concentració final de pterostilbé. Així mateix la velocitat de dissolució en el cocristall

d'etilendiamina en forma anhidra és més elevada que en els altres dos cocristalls (assoleix un altiplà de concentració de pterostilbé als 10 min), però la quantitat de pterostilbé en solució és menor i presenta major velocitat de dissolució respecte al pterostilbé forma I i el cocristall de cafeïna. (Taula 8)

Taula 8. Velocitat de dissolució de les formes multicomponent de pterostilbé estudiades en aquest treball

Forma sòlida	Velocitat de dissolució (nmol/min)
Pterostilbé (forma I)	13.2 ± 2
Cocristall pterostilbé:àcid picolínic	427.8 ± 30
Cocristall pterostilbé:etilendiamina hidrat	230.4 ± 27
Cocristall pterostilbé:etilendiamina anhidre	176.1 ± 13
Cocristall pterostilbé:Cafeïna	45.4 ± 9

Per tant, i com era d'esperar, la formació de cocristalls amb coformadors més solubles que el pterostilbé en aigua augmenten molt la solubilitat respecte del principi actiu pur. El bon perfil de velocitat de dissolució juntament amb el seu estatus GRAS (coformador farmacològicament acceptable), va fer que l'estudi se centrés principalment en el cocristall d'àcid picolínic.

Així, vam decidir realitzar un estudi de biodisponibilitat oral relativa del cocristall en rates. L'estudi es va realitzar a través de la concentració plasmàtica mitjana de pterostilbé al llarg del temps després de l'administració oral de pterostilbé comercial i del cocristall d'àcid picolínic. (Figura 29)

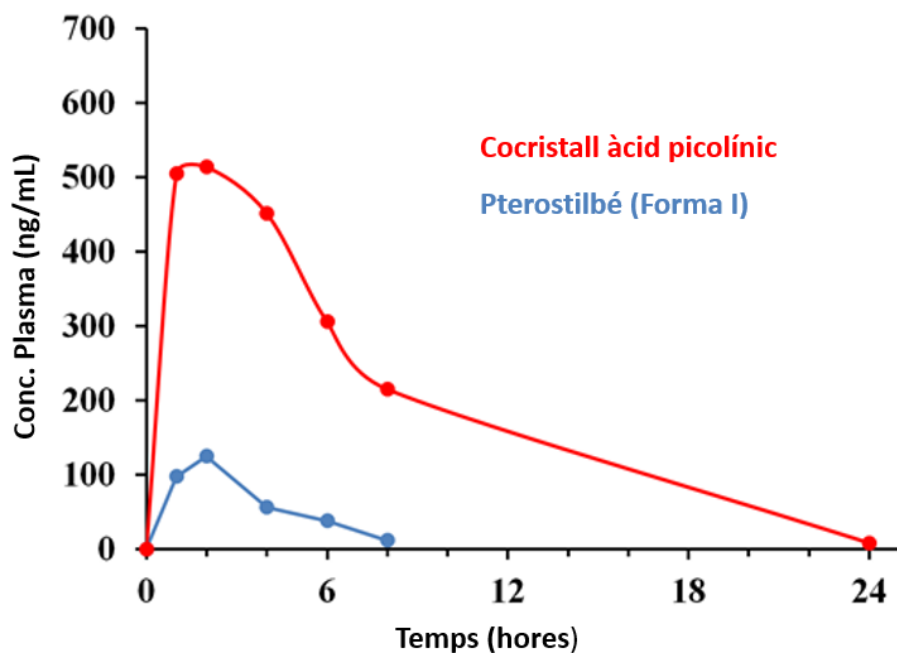


Figura 29. Perfils farmacocinètics de pterostilbé en rates després de l'administració oral única de pterostilbé 20 mg/kg i el cocristall d'àcid picolínic (20 mg/kg, dels quals 13,5 mg són pterostilbé)

L'exposició sistèmica al pterostilbé present en el cocristall va ser de 4,5 i 6,7 vegades major en quant a C_{max} i AUC_{inf} respectivament, tot i que l'administració no va ser equimolar respecte del pterostilbé comercial. (Taula 9)

La biodisponibilitat oral relativa (dosi corregida de pterostilbé) va ser 9,9 vegades superior després de l'administració del cocristall d'àcid picolínic, de manera que aquests resultats són coherents amb la velocitat de dissolució abans descrita i mostren una clara millora en la biodisponibilitat respecte del pterostilbé comercial i el cocristall de cafeïna (PUREENERGYTM, Chromadex, EUA), presentant aquest un increment d'1,5 vegades de biodisponibilitat respecte del pterostilbé comercial.

No s'ha estudiat experimentalment l'administració via intravenosa de pterostilbé, però es pot realitzar una estimació de la biodisponibilitat oral absoluta del pterostilbé. El valor d' AUC_{inf} via intravenosa, extret de la bibliografia i utilitzat en els càlculs, va ser substancialment inferior al que es va obtenir després de l'administració de dosis orals superiors a 10 mg/kg, per tant, la biodisponibilitat oral absoluta d'aquestes formulacions a aquestes dosis no es va tenir en compte.

Tot i que no es va avaluar la farmacocinètica intravenosa en rates, podem estimar la biodisponibilitat oral absoluta del cocristall d'àcid picolínic, com a referència, a partir de

l'exposició sistèmica observada (AUC_{inf}) descrita a la bibliografia. [153] Segons aquest, després de l'administració intravenosa de 10 mg/kg el valor observat d'AUC_{inf} (2812 ng·h/ml) és comparable al trobat després de l'administració oral (13,5 mg/kg com a pterostilbé) del nostre cocristall (AUC_{inf} 4699 ng·h/ml), la qual proporciona una biodisponibilitat oral absoluta estimada del 125%.

Si s'utilitzen els valors obtinguts per Kapetanovic *et. al* (en els quals s'administra via intravenosa 11,2 mg / kg de pterostilbé i s'obté un valor d'AUC_{inf} de 4,090 ng·h / ml), la biodisponibilitat oral absoluta estimada del cocristall amb àcid picolínic seria del 97%. Aquests resultats confirmen l'elevada biodisponibilitat oral del cocristall de pterostilbé en rates. (Taula 9)

Taula 9. Paràmetres farmacocinètics de pterostilbé després de l'administració oral única de pterostilbé comercial (20 mg / kg) i el cocristall de pterostilbé i àcid picolínic (20 mg / kg, 13,5 mg com a pterostilbé). Valors mitjans ± DS.

Formulació	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	AUC _{inf} (ng·h/ml)
Pterostilbé	124,8 ± 39,3	2	712 ± 294
Cocristall de pterostilbé i àcid picolínic	567,8 ± 284,2	2 (1-6)	4772 ± 3054

t_{max}: mitjana (min-max)

En resum, la selecció d'una sèrie de coformadors mitjançant l'aplicació de l'enginyeria cristal·lina i posterior *screening* experimental ha permès l'obtenció de vuit cocristalls de pterostilbé. Les velocitats de dissolució de dos dels cocristalls: pterostilbé-etilendiamina i pterostilbé-àcid picolínic són superiors en relació la forma I de pterostilbé. L'estudi de la biodisponibilitat oral relativa en rates va ser 9,9 vegades superior en el cocristall d'àcid picolínic respecte el pterostilbé comercial i la biodisponibilitat oral absoluta del pterostilbé amb el cocristall d'àcid picolínic és del 97%. Aquests resultats confirmen que el cocristall d'àcid picolínic és un excel·lent candidat per ser una de les millors formulacions sòlides orals per al pterostilbé en humans. A més, l'àcid picolínic posseeix una àmplia gamma d'activitats fisiològiques: és neuroprotector, té efectes immunològics i és quelant de ions metàl·lics (Zn²⁺ i Fe²⁺). En particular, la propietat quelant s'ha utilitzat en complexos del tipus àcid picolínic-zinc/ferro com a mitjà per introduir aquests ions en el cos humà. A més, el picolinat de crom és un suplement

dietètic comercialitzat per a la pèrdua de pes, gràcies al seu paper en el metabolisme dels carbohidrats i els lípids. [154] Així doncs, la sinèrgia entre el pterostilbé i l'àcid picolínic pot generar potencials beneficis en la salut.

4.1.4. Article 4 DFT analysis of uncommon $\pi\cdots H$ -Bond array interaction in a new Pterostilbene/Theophylline cocrystal

Coneixedors de l'existència del cocrystal de pterostilbé-cafeïna vam decidir utilitzar com a coformadors la teofil·lina i la teobromina, ja que tots dos compostos presenten estructures molt similars a la cafeïna. (Figura 30) La teofil·lina prové de la família de les metilxantines, a la qual pertanyen també la cafeïna i la teobromina. Aquests són alcaloides d'origen natural derivats de la purina (compost orgànic bicíclic) la qual es troba present en el cafè, te, guaranà, etc. [155]

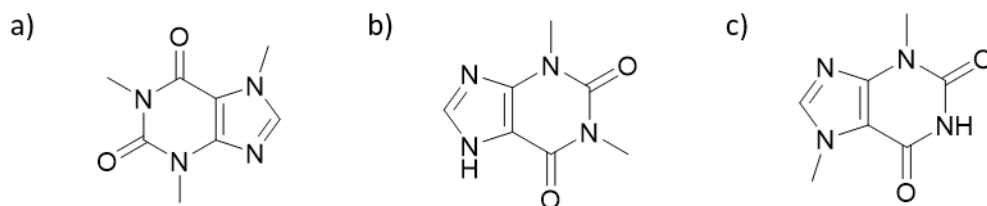


Figura 30. a) Estructura molecular de la a) cafeïna b) teofil·lina i c) teobromina.

Tal i com s'ha esmentat en l'article anterior només vam obtenir el cocrystal amb teofil·lina, el qual es troba en forma de solvat de diclorometà. La seva estructura cristal·lina va ser resolta per SCXRD i les seves dades cristal·logràfiques es mostren a la taula 10.

Taula 10. Dades cristal·logràfiques del cocrystal de pterostilbé- teofil·lina-diclorometà

Estructura	pterostilbé i teofil·lina- diclorometà
Sistema	Monoclínic
Grup espacial	$C 2/c$
a, b, c (Å)	20,0576(10)
	10,1851(5)
	25,6891(11)
α, β, γ (°)	90
	106,925(2)
	90
Volum (Å ³)	5020,7(4)
Z, Densitat (Mg/m ³)	8, 1,380
CCDC	2010505

És important tenir en compte el paper del dissolvent i la seva toxicitat si es vol arribar a comercialitzar un solvat per a consum humà. Segons la directriu ICH-Q3C, els dissolvents es classifiquen en quatre grups: [156,157]

- **Classe 1:** conté dissolvents cancerígens, coneguts sospitosos de ser carcinògens i perillosos per al medi ambient. Aquests tipus de dissolvents no es poden utilitzar en la fabricació de substàncies farmacèutiques, excipients i productes farmacèutics.
- **Classe 2:** conté dissolvents que poden ser genotòxics, cancerígens o possibles agents causants de toxicitat irreversible, com ara neurotoxicitat o teratogenicitat. Aquests haurien de limitar-se a productes farmacèutics. La directriu ICH Q3C inclou taules il·lustratives que mostren els límits per als dissolvents de classe 2.
- **Classe 3:** conté dissolvents que es poden considerar menys tòxics i de menor risc per a la salut humana. Aquests es poden utilitzar en nivells acceptables en productes farmacèutics tabulats en les ICH Q3C. Tot i això, no hi ha estudis de

toxicitat o carcinogenicitat a llarg termini per a molts dels dissolvents de la classe 3.

- **Classe 4:** conte dissolvents dels quals no hi ha dades toxicològiques adequades sobre les quals basar-se per a la seva regulació. Però els fabricants han de proporcionar una justificació dels nivells residuals d'aquests dissolvents en productes farmacèutics.

En aquesta classificació el diclormetà pertany a la classe 2. Com s'ha esmentat, la toxicitat és el motiu principal i inqüestionable per al control de quantitats de dissolvents residuals, però en alguns casos s'ha observat que la presència de dissolvent residual pot comportar transformacions que posen en perill l'estabilitat fisicoquímica i la seva qualitat com a producte. [158]

És per això, que es va decidir desolvatar el cocristall a fi d'obtenir la forma anhidra del cocristall i així eliminar la problemàtica envers el dissolvent. La desolvatació a 80 °C va produir un sòlid que presentava pics de difracció de teofil·lina juntament amb alguns pics no identificats (Figura 31).

Aquest fet suggereix que el dissolvent actua en l'estabilització de l'estructura del cocristall i, una vegada es produeix la desolvatació, el cocristall col·lapsa parcialment i es produeix la recristal·lització dels components de forma individual, motiu pel qual observem pics de difracció de la teofil·lina en el difractograma de raigs X. L'anàlisi de l'estructura cristal·lina de raigs X del solvat de cocristall revela enllaços d'hidrogen, interaccions aromàtiques i interaccions halogen-halogen. La diversitat de forces intermoleculares va ser el motiu pel qual vam decidir estudiar-les més detalladament utilitzant mètodes computacionals. Aquesta part del treball s'ha fet en col·laboració amb el Prof. A. Frontera de la universitat de les Illes Balears.

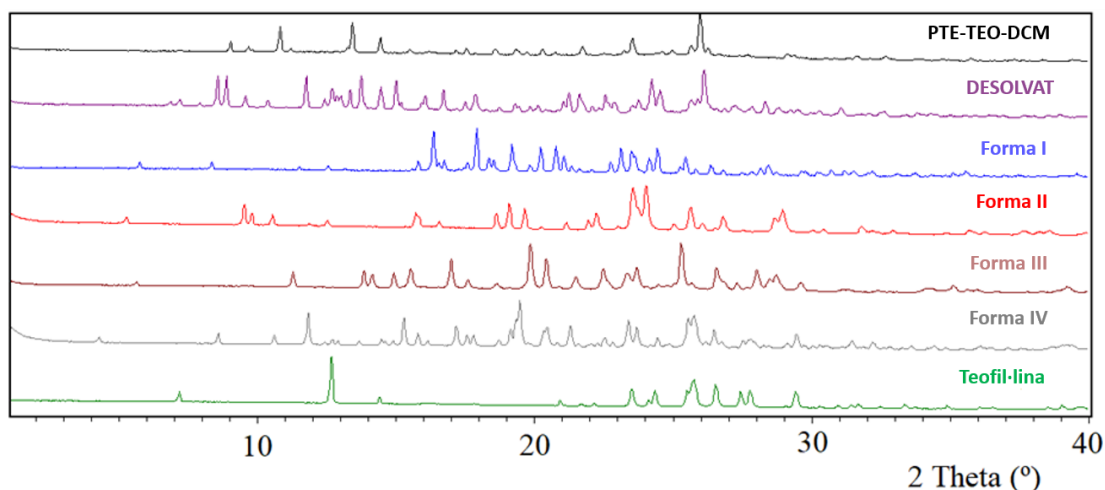


Figura 31. Comparativa dels difractogrames de raigs X del cocristall (PTE-TEO-DCM) (negre), de la forma anhidra i impura del cocristall (PTE-TEO) (lila) i de les formes polimòrfiques de pterostilbé: forma I (blau), forma II (vermell), forma III (marró) i forma IV (gris) i de la teofil·lina (verd)

Mitjançant el càlcul de la superfície de potencial electrostàtic molecular vam observar una zona deficient en densitat electrònica amb un potencial electrostàtic de +17,5 kcal/mol en el centre del dímer de teofil·lina. Així mateix, aquesta zona presenta un valor superior respecte de l'anell de sis membres de la teofil·lina (+14,4 kcal/mol), indicatiu que la teofil·lina presenta predisposició per establir enllaços de tipus π -stacking amb superfícies riques en densitat electrònica. Aquest fet explicaria la disposició del dímer de teofil·lina justament sobre el doble enllaç de la molècula de pterostilbé, zona rica en electrons, formant una interacció del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$. (Figura 32)

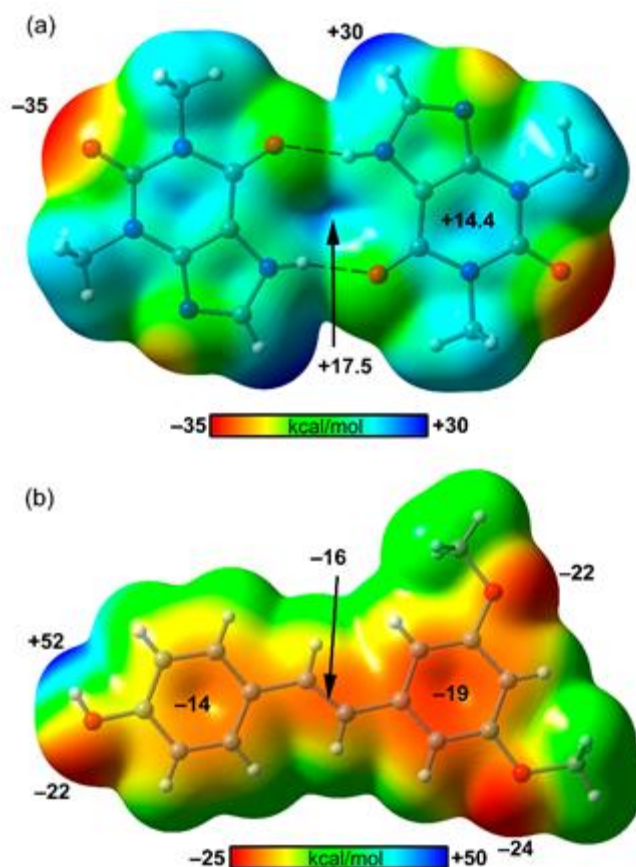


Figura 32. Superfícies de potencial electrostàtic molecular del dímer de teofil·lina (a) i pterostilbé (b) calculades mitjançant PBE1PBE-D3/def2-TZVP. Els valors d'energia es troben en kcal/mol

Les anàlisis QTAIM i NCI ens van permetre localitzar i estudiar amb més detall les interaccions intermoleculares en el cocrystal i, especialment la interacció $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$. (Figura 33) La representació QTAIM de l'heterodímer (Figura 33a) presenta dos punts crítics d'enllaç: un en la interacció del tipus $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ representat amb una isosuperfície NCI de color blau indicatiu d'enllaç fort i un altre en la interacció $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}$ representat per una isosuperfície NCI de color verd indicatiu d'interacció feble. També s'observen els punts crítics d'anell representats per esferes de color groc. En la Figura 33b estan representades la distribució QTAIM la isosuperfície NCI per al dímer de teofil·lina, aquesta presenta dos punts crítics en els respectius enllaços d'hidrogen del tipus $\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$ amb una isosuperfície de color blau, indicatiu d'enllaç fort. Cal destacar que, s'observa la presència d'un punt crític d'anell representat en color groc amb una isosuperfície de color verd, indicativa d'enllaç feble. La isosuperfície NCI de color verd es mostra amb més detall a la figura 34 la qual mostra la distribució QTAIM i la isosuperfície NCI de les

interaccions π - π *stacking* entre les molècules de pterostilbé i la teofil·lina i el càlcul d'energies d'interacció respectivament.

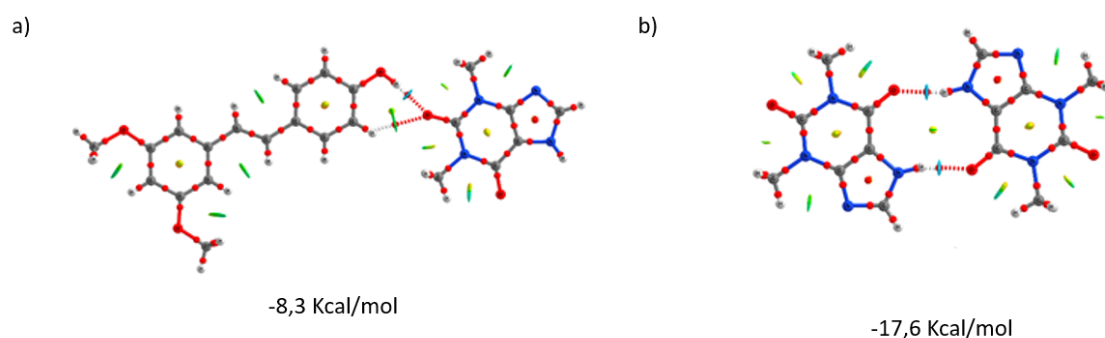


Figura 33. Distribució dels punts crítics dels enllaços i anells (vermells i grocs respectivament) i representació de la isosuperfície NCI utilitzant un cutoff 0.5 au $-0.04 < \rho < 0.04$ au per (a) Heterodímer (pterostilbé-teofil·lina) (b) Homodímer (teofil·lina). Les distàncies es troben en Å

El càlcul d'energia del conjunt és de -39,2 kcal/mol (Figura 34a), part d'aquesta fortalesa és deguda a l'enllaç del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$. Per tal de conèixer l'aportació deguda a l'enllaç del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$, es va realitzar el càlcul de l'energia utilitzant un model en el qual el fenol i l'anell aromàtic de la molècula de pterostilbé s'han substituït per hidrògens, transformant-se així en una molècula d'etè. El càlcul d'energia de dimerització és de -3,4 kcal/mol la qual cosa indica que es tracta d'un enllaç favorable. (Figura 34b)

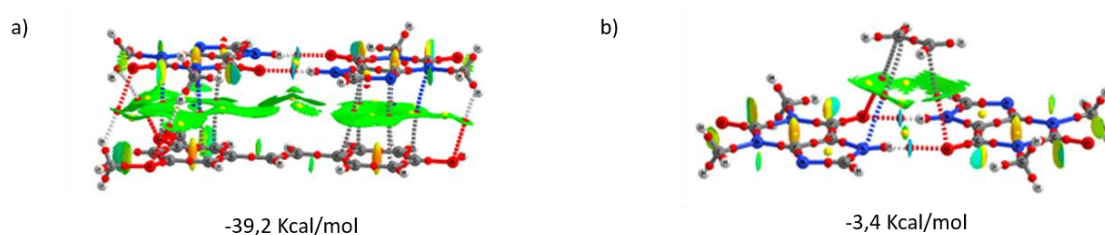


Figura 34. a) Representació de la distribució de punts crítics dels enllaços i anells (vermells i grocs respectivament) i representació de la isosuperfície NCI utilitzant un cutoff 0.5 au $-0.04 < \rho < 0.04$ au b) Model teòric per estimar l'enllaç tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$, amb representació de punts crítics d'enllaç (esferes vermelles i grogues respectivament) i isosuperfície amb un gradient cutoff of 0.5 a.u. i una escala de color $-0.04 < \rho < 0.04$ a.u.

Adicionalment, vam realitzar la recerca a la Cambridge Structural Database (CSD) per tal de saber si la interacció del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ observada en el cocristall és present en altres cocristalls d'aquest coformador. Malauradament no hi ha cap altra estructura

crystal·lina que presenti una interacció del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ comparable amb l'estudi realitzat, essent aquesta la primera descriptiva.

Finalment, vam analitzar les interaccions intermoleculares en les quals es troba implicada la molècula de diclorometà per tal d'esbrinar el grau d'implicació del dissolvent en la integritat del cocrystal. La molècula de diclorometà presenta dos entorns diferenciats. Per una banda, es troba formant un enllaç tipus $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ amb el fragment dimetoxifenílic del pterostilbé, bloquejant així una disposició $\pi-\pi$ *stacking* repetida formada per *sandwiches* entre la molècula de pterostilbé i teofil·lina (Figura 35a). Per altra banda, es troba formant dímers a través d'interaccions del tipus halogen-halogen. (Figura 35b) Així doncs l'alt grau d'implicació del dissolvent en les interaccions dins del cristall explicaria les dificultats per obtenir la forma anhidra del cocrystal. La confirmació d'aquests enllaços es va dur a terme a través de la distribució QTAIM i el càlcul de la isosuperfície NCI. (Figura 35)

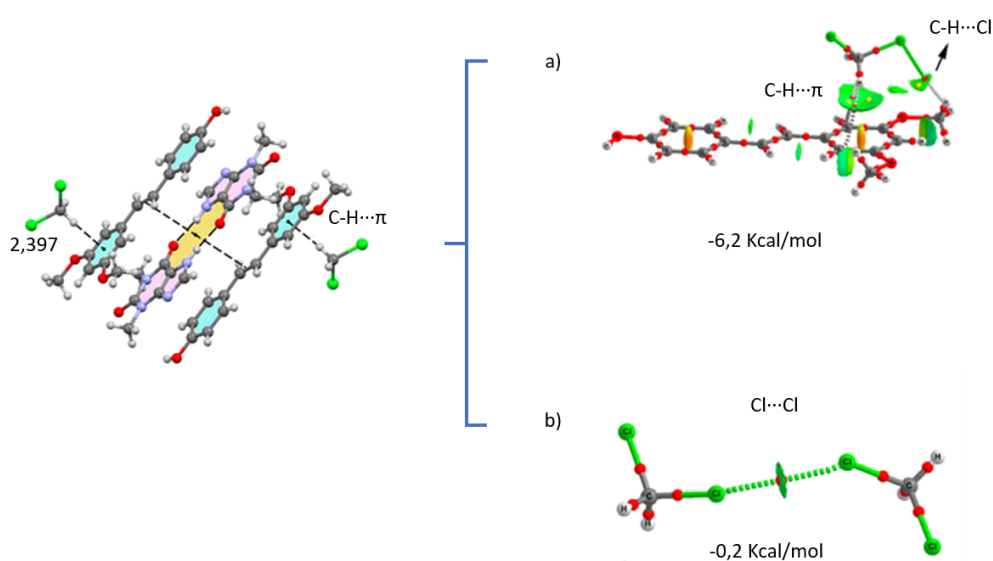


Figura 35. a) Vista parcial del cocrystal que mostra les molècules de diclorometà que interactuen amb el conjunt tetramèric $\pi-\pi$. (b) Descripció detallada dels angles $\text{C}-\text{Cl}\cdots\text{Cl}$. (c) Distribució dels punts crítics d'enllaç i anell (esferes vermelles i grogues, respectivament) i (d) la isosuperfície NCI mitjançant el tall de gradient de $0,5$ a.u. i escala de colors $-0,04 < \rho < 0,04$ a.u.

L'energia de la interacció $\text{CH}\cdots\pi$ és moderadament forta ($-6,2$ Kcal/mol) probablement a causa de la contribució de la interacció auxiliar $\text{C}-\text{H}\cdots\text{Cl}$. Per altra banda, la interacció observada de tipus $\text{Cl}\cdots\text{Cl}$ és feble ($-0,2$ Kcal/mol). Els diferents entorns observats en la

molècula de diclorometà es van estudiar mitjançant el càlcul de la seva superfície de Hirshfeld de la molècula mitjançant el programa *CrystalExplorer* a partir de l'estructura cristal·lina del cocrystal. La superfície de Hirshfeld mostra el contacte tipus C–H···O en forma d'àrea de color vermell intens corresponent a un contacte entre àtoms més curt que la suma dels radis de van der Waals, el qual s'atribueix a l'enllaç d'hidrogen amb una distància interatòmica de 2,32 Å. També s'observen dues àrees d'un color vermell menys intens que indiquen la interacció de tipus Cl···Cl amb una distància interatòmica de 3,34 Å i la interacció del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ amb una distància $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ de 2,40 Å (Figura 36a i b). En les interaccions intermoleculares que es representen als gràfics 2D *fingerprint* (Figura 36c) s'observen les interaccions més intenses, més properes, és a dir amb menor distància interatòmica (d_i i d_e menors). També ens proporciona la contribució d'àrea per a cada tipus d'enllaç en percentatge (%). La major contribució d'àrea, amb un 11.6%, correspon a la interacció del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ juntament amb els contactes del tipus H···C, seguit de la interacció del tipus O···H amb una contribució d'àrea del 5.6% i finalment la interacció del tipus Cl···Cl amb una contribució d'àrea del 4.0%. En conclusió la superfície de Hirshfeld ens indica que la interacció del tipus (C–H···O) és la més rellevant.

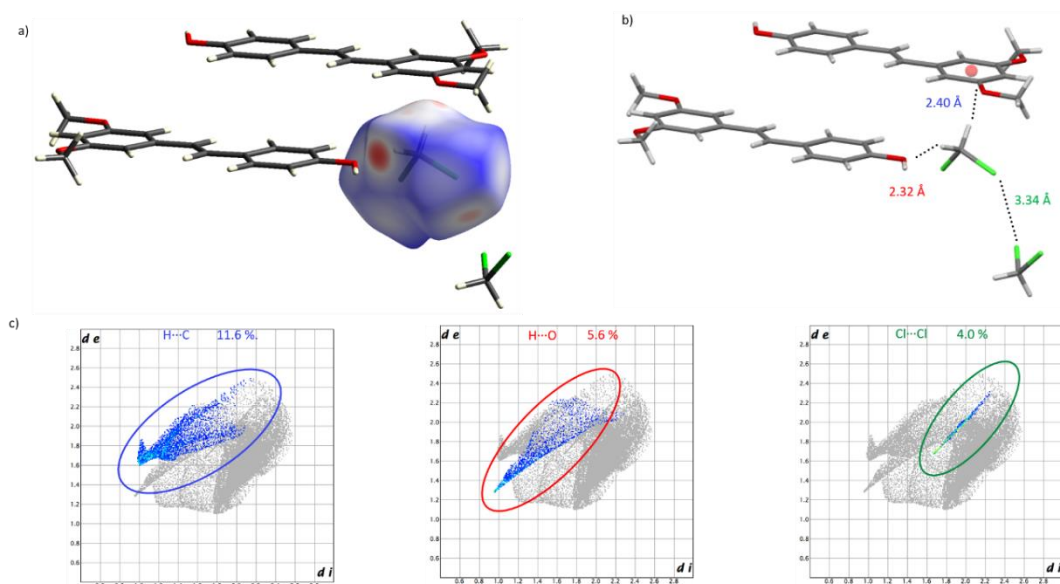


Figura 36. a) Superfície de Hirshfeld (d_{norm}) de la molècula de diclorometà rodejada per les molècules properes en l'estructura cristal·lina b) distàncies interatòmiques de les interaccions més rellevants c) representació empremta dactilar d'esquerra a dreta de les interaccions i les seves contribucions relatives (%) en la superfície de Hirshfeld H···C, H···O i Cl···Cl

En resum, l'estudi de les interaccions intermoleculares del cocristall mitjançant les tècniques computacionals QTAIM i NCI, ha permès la primera descripció de la interacció inusual del tipus $\pi(\text{C}=\text{C})\cdots\text{H}$ on el sistema π -donador de densitat electrònica és un enllaç doble, essent aquesta la primera vegada que es descriu. A més aquest estudi va evidenciar la importància del dissolvent tant en el seu paper en l'estructural com en la formació del cocristall.

4.2 UBIQUINOL

El coenzim Q_{10} és un compost lipofílic que es troba present en les membranes cel·lulars, en el seu estat reduït i oxidat, és a dir, com a ubiquinol ($CoQ_{10}-H_2$) i ubiquinona respectivament (Figura 37). Totes dues formes es troben en equilibri a través d'un cicle redox produït per la transferència d'un electró en dos passos, resultant una semiquinona intermitja. [159,160]

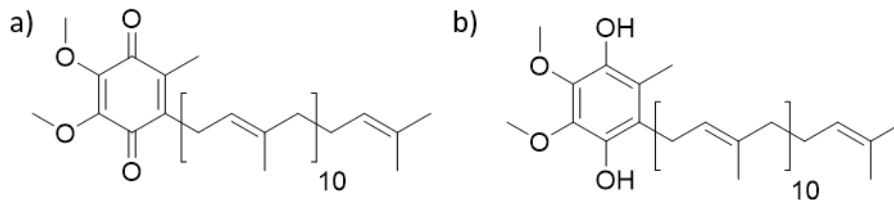


Figura 37. Estructura molecular de (a) l'ubiquinona i de (b) l'ubiquinol

L'ubiquinona actua en l'organisme com a cofactor de la cadena de transport d'electrons, en la sèrie de reaccions redox que intervenen en la síntesi de trifosfat d'adenosina (ATP). [161] A més d'aquest paper protagonista en el metabolisme, l'ubiquinol actua com antioxidant impedit la generació de radicals lliures i les modificacions de proteïnes, lípids i l'ADN. [162] Els radicals lliures són àtoms o grups d'àtoms que tenen un electró desaparellat o lliure i per tant són molt reactius i tendeixen a captar un electró de molècules estables a fi d'aconseguir la seva estabilitat electroquímica. Una vegada que el radical lliure ha aconseguit sostreure l'electró, la molècula estable que li cedeix es converteix en un radical lliure, iniciant-se així una reacció en cadena amb greu perjudici per a les cèl·lules del cos humà. De radicals lliures el cos en produeix en quantitats moderades per lluitar contra bacteris i virus, però si el cos no els processa i/o elimina de manera eficient, el seu increment/acumulació pot causar les malalties associades a l'edat com ara el càncer, malalties cardíques i el deteriorament cognitiu o demència. La forma de processar-lo és a través de la seva neutralització per mitjà de substàncies antioxidants. Aquestes es defineixen com substàncies que a baixes concentracions retarden o impedeixen l'oxidació d'un substrat. La propietat antioxidant s'aconsegueix en la majoria dels casos mitjançant mecanismes químics, com la transferència d'àtoms d'hidrogen o la transferència d'un electró. [163,164] L'ubiquinol ($CoQ_{10}-H_2$) actua com antioxidant, la neutralització d'aquests radicals lliures es produeix a través de la donació d'un àtom d'hidrogen i la formació del radical ubisemihidroquinona ($CoQ_{10}-H^{\cdot}$). Un exemple de l'efecte antioxidant de l'ubiquinol és la regeneració de la vitamina E a través

de la formació del radical ubisemihidroquinona per tal de regenerar la vitamina E (Figura 38).

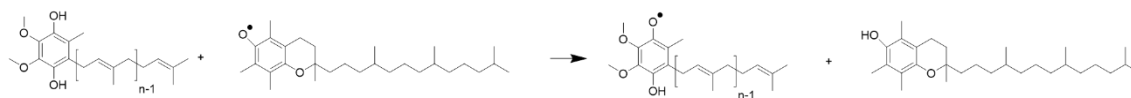


Figura 38. Neutralització del radical lliure α -tocoferol (Vitamina E)

L'efecte antioxidant de l'ubiquinol/ubiquinona es veu influenciat per l'edat, ja que el nivell d'ubiquinona/ubiquinol disminueix gradualment amb l'edat en diversos òrgans, com el cor i el cervell, probablement degut a una major utilització, a una síntesi disminuïda o a ambdues coses. [165] A més l'obtenció per mitjà de la dieta no proporciona les quantitats necessàries, de manera que és recomanable prendre'l com a suplement alimentari, sobretot en adults.

A banda d'això, existeix una certa controvèrsia sobre l'ús d'ubiquinol o ubiquinona com a suplement. Diferents estudis demostren que el primer presenta millor biodisponibilitat. [166, 167, 168] No obstant, l'ubiquinol pateix un important problema d'estabilitat en contacte amb l'aire, l'exposició a la llum i a altes temperatures. Aquest s'oxida i es transforma en ubiquinona, la qual cosa dificulta la seva preparació en formulacions farmacèutiques i encareix el cost de producció. Per tant, és una necessitat industrial trobar noves maneres d'estabilitzar l'ubiquinol per tal de trobar un procés més assequible i eficient. Actualment, l'ubiquinol es comercialitza envasat en càpsules de gelatina o com a sòlid en sobres, però aquests necessiten ser preparats sota atmosfera de nitrogen, la qual cosa dificulta el seu processat. Aquesta problemàtica ens va plantejar el repte de millorar la seva estabilitat mitjançant la recerca de noves formes sòlides. L'*screening* de cocrystals va permetre aïllar i caracteritzar un nou cocrystal d'ubiquinol amb l'àcid 3,4-dihidroxibenzoic, el qual presenta major estabilitat que l'ubiquinol. Cal afegir que l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària considera que l'àcid 3,4-dihidroxibenzoic no té associats problemes de seguretat a les concentracions emprades en aplicacions dietètiques. [169]

4.2.1. Article 5: New cocrystal of ubiquinol with high stability to oxidation

La inestabilitat de l'ubiquinol es pot atribuir a un fenomen d'autooxidació, procés que succeeix quan un àtom d'hidrogen es transfereix a l'oxigen molecular. Aquesta transferència es pot considerar una reacció radicalària inicial de la conversió total de l'ubiquinol a ubiquinona en contacte amb l'aire a través de la formació del radical superòxid ($O_2^{\cdot-}$). (Figura 39) [170]

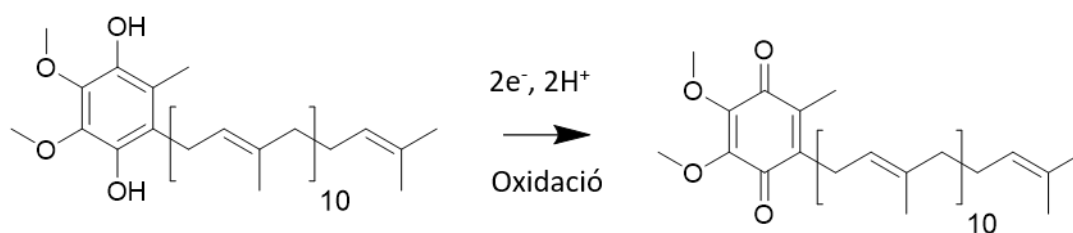


Figura 39. Estructura molecular de l'ubiquinol i la reacció d'oxidació a ubiquinona

L'*screening* de cocristalls es va plantejar amb l'objectiu d'impedir l'oxidació de l'ubiquinol seguint una estratègia basada en enginyeria cristal·lina per tal de formar cocristalls més estables. La molècula d'ubiquinol té dos grups fenol en posició *para* l'un respecte de l'altre. Aquest és un grup funcional capaç d'actuar com a donador i acceptor d'enllaços d'hidrogen. Per tant, com a coformadors es van escollir molècules que fossin capaces d'establir enllaços d'hidrogen forts amb l'ubiquinol, però que a més tinguessin capacitat antioxidant. Es van escollir compostos polifenòlics, en particular els àcids hidroxibenzoics, els quals són coneguts com a antioxidants envers els radicals superòxids, tenint la capacitat de prevenir l'autooxidació. Cal afegir que són compostos farmacològicament acceptables. Els polifenols es troben en més de 500 plantes i aliments com l'arròs, l'oli d'oliva, les prunes, les groselles i el raïm blanc entre d'altres. D'altra banda, en base la seva naturalesa dual com a fort donador i acceptor d'enllaços d'hidrogen, els grups funcionals àcid carboxílic i fenol dels àcids hidroxibenzoics tenen el potencial d'interactuar satisfactòriament amb els grups metoxi i fenol de l'ubiquinol. També s'han tingut en compte en el disseny dels cocristalls les cadenes llargues hidròfobiques de l'ubiquinol en l'empaquetament mitjançant interaccions dèbils de van

der Waals, les quals poden formar capes amb dominis polars i no polars separats en la xarxa cristal·lina.

En concret es van utilitzar 11 coformadors (àcids hidroxibenzoics i polifenols). A continuació mitjançant les tècniques experimentals de mòlta, suspensió, cristallització i evaporació lenta, es van realitzar 225 experiments amb 18 dissolvents diferents. Cal dir que va ser un procés laboriós degut a la ràpida oxidació de l'ubiquinol. Tots els experiments es varen fer sota atmosfera de nitrogen, segellant els vials i amb temps d'experiment curts, ja que tot i mantenint aquestes precaucions l'ubiquinol s'oxidava en pocs dies. Dels 11 coformadors vam obtenir evidències de noves fases amb els coformadors àcid 3,4-dihidroxibenzoic, àcid 3,5-dihidroxibenzoic, àcid 3-hidroxibenzoic, àcid 2,5-dihidroxibenzoic, resorcinol i quercetina. Malgrat tots els esforços, només es va poder aïllar i caracteritzar en forma pura el cocristall amb l'àcid 3,4-dihidroxibenzoic. La formació d'aquesta nova forma sòlida multicomponent es va determinar a través de la comparació dels difractogrames de raigs X de pols dels materials de partida (CoQ10-H₂ i les respectives formes sòlides dels coformadors) i dels productes (cocristall). (Figura 40)

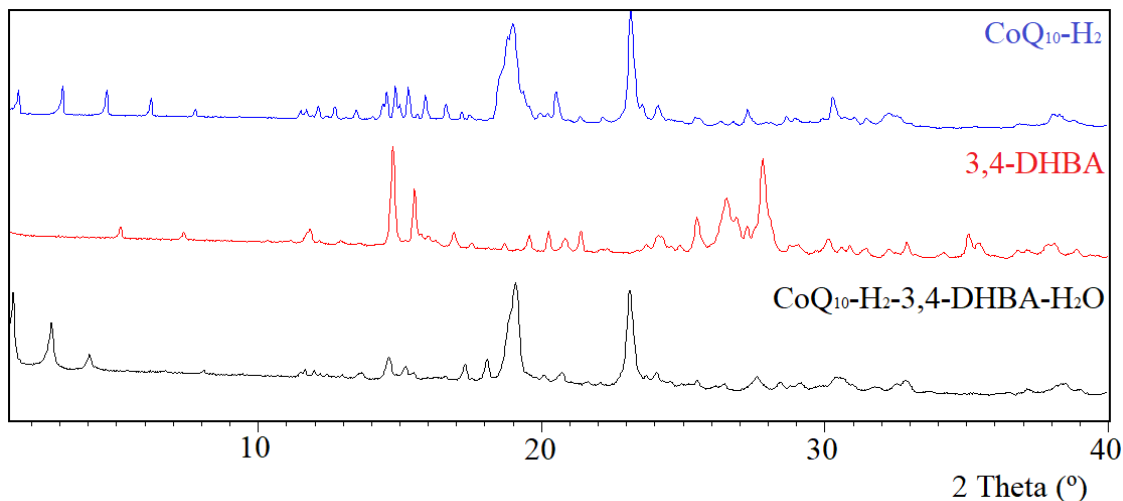


Figura 40. Difractogrames de pols comparatius d'ubiquinol (blau), àcid 3,4-dihidroxibenzoic (vermell) i l'hidrat del cocristall CoQ10-H₂-3,4-DHBA·H₂O (negre)

La caracterització del cocristall va permetre detectar la presència d'aigua en l'estructura, així com la seva estequiometria. Per tal de comprovar que l'estabilitat del cocristall és superior a la de l'ubiquinol pur, es van realitzar estudis d'estabilitat en el temps en diferents condicions d'emmagatzematge en condicions normals i forçades (25 °C i 57%

d'humitat relativa i 40 °C i 75% d'humitat relativa). Les mostres van ser emmagatzemades dins d'una estufa Binder Serie FD a temperatura constant. Per tal de controlar la humitat relativa es va utilitzar una solució saturada de bromur de sodi (57% d'humitat relativa) i una solució saturada de clorur de sodi (75% d'humitat relativa). L'estudi va consistir en analitzar l'evolució del cocristall i de l'ubiquinol, periòdicament a través de l'anàlisi per difracció de raigs X de pols. Els resultats mostren que, mentre l'ubiquinol es transforma ràpidament en ubiquinona en només 26 dies a 25 °C i 60% HR, el nou cocristall resisteix a l'oxidació durant almenys 435 dies. La Figura 41 mostra els diagrames de XPRD del cocristall a temps 0 i després de 435 dies en comparació amb l'ubiquinol, ubiquinona i l'àcid 3,4-dihidroxibenzoic.

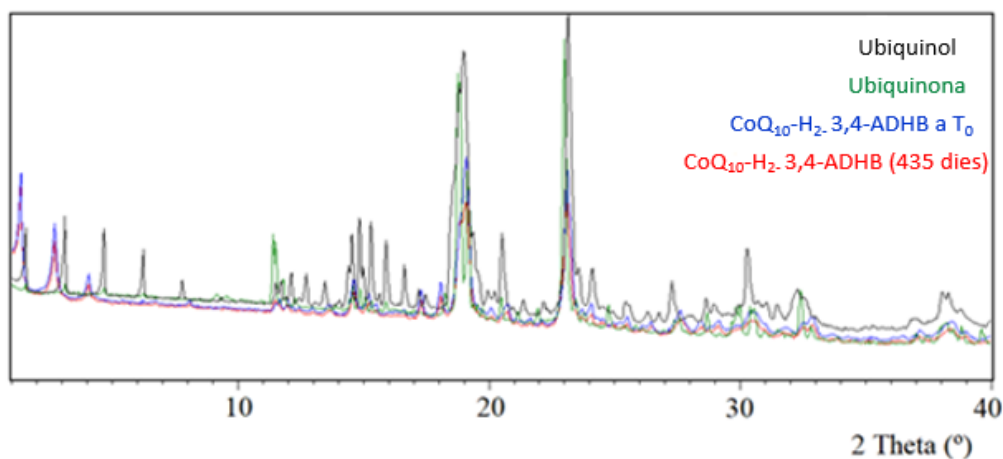


Figura 41. Diffractogrames de pols comparatius d'ubiquinol (negre), ubiquinona (verd), l'hidrat del cocristall $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (blau) i l'hidrat del cocristall $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ després de 435 dies a 25 °C i 60% HR (vermell)

Les dades indiquen que ni l'ubiquinona ni el coformador són detectats després de 435 dies, cosa que confirma l'efectivitat contra l'oxidació del cocristall. No obstant, l'estabilitat a 40 °C i 75% HR és molt menor. Així, el nou cocristall es transforma parcialment en ubiquinona en 120 dies. Cal dir que és fàcil identificar visualment l'oxidació de l'ubiquinol a ubiquinona a través del canvi de color, de groc pàl·lid inicial (ubiquinol o cocristall) a un color taronja intens (característic de l'ubiquinona).

En definitiva, la majoria de les formulacions farmacèutiques d'ubiquinol experimenten diferents camins de degradació i l'única forma eficient en el mercat per prevenir l'oxidació a ubiquinona és la formulació a través de càpsules de gelatina preparades sota

una atmosfera de nitrogen, un procediment que augmenta el cost industrial. Tanmateix, el nou cocristall (amb un mètode robust d'obtenció), ha demostrat una notable estabilitat a l'oxidació per aire, i podria ser una alternativa senzilla, eficient i assumible econòmicament. A més, és important remarcar les propietats beneficioses de l'àcid 3,4-dihidroxibenzoic, del qual se'n coneixen propietats antiinflamatòries, d'inhibició de la carcinogènesi i amb activitat antimicrobiana, entre d'altres propietats farmacològiques destacables, cosa que fa que aquest coformador confereixi addicionalment potencials efectes beneficiosos a la ja millorada forma sòlida d'ubiquinol.

4.3. VITAMINA D₃

La vitamina D es troba en dues formes: com ergocalciferol (vitamina D₂) (Figura 42a) produïda per les plantes, i com colecalciferol (vitamina D₃) (Figura 42b), produïda en el teixit animal per l'acció de la llum ultraviolada.

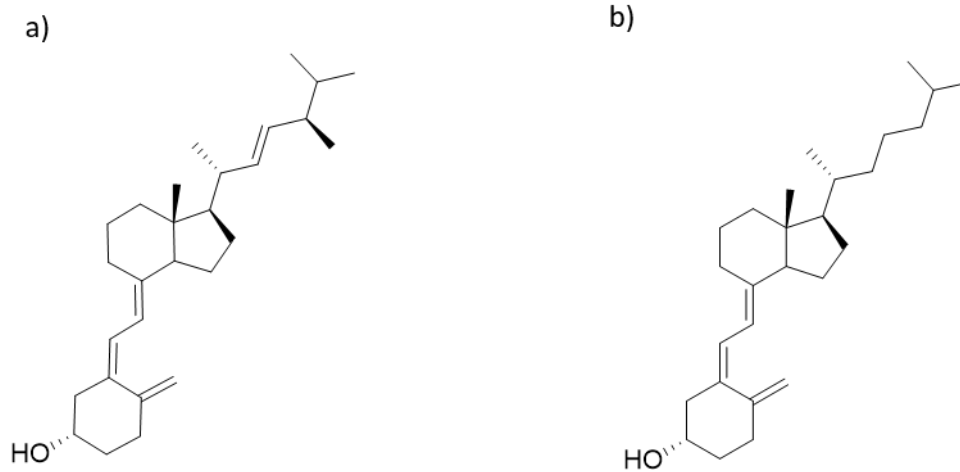


Figura 42. Estructura molecular de a) l'Ergocalciferol i b) Colecalciferol

Tant la vitamina D₂ com la vitamina D₃ són compostos inactius biològicament, però una vegada s'absorbeixen es transformen en diversos metabòlits els quals són actius i responsables de les múltiples funcions de la vitamina D en l'organisme. [171] A diferència de les vitamines essencials A, E i C, que els éssers humans han d'obtenir directament dels aliments, la vitamina D pot ser adquirida a través de la dieta i/o produïda per l'organisme, per mitjà d'una reacció fotosintètica en exposar la pell a la llum solar. De fet, la major part de la vitamina D s'obté de l'exposició de la pell a la llum solar i només s'obté en quantitat limitada de la dieta. [172] La funció principal de la vitamina D és el manteniment i la regulació dels nivells de calci a l'organisme (homeòstasis de calci), a través del metabòlit 1- α ,25-dihidroxicolecalciferol, conegut com a calcitriol i que s'obté durant el metabolisme de la vitamina D₃. (Figura 43)

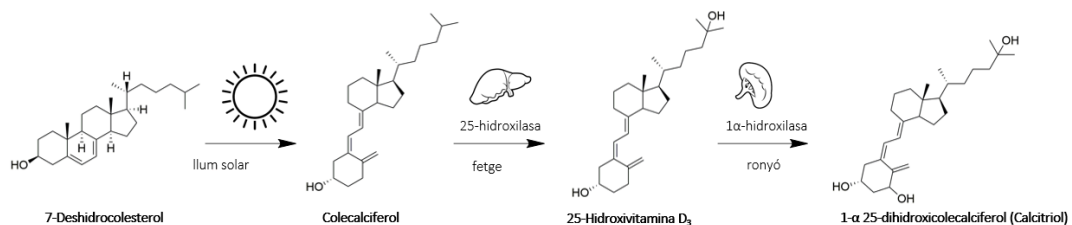


Figura 43. Representació esquemàtica del metabolisme de la Vitamina D₃ ((Adaptat de la referència [171]))

Per tant, la vitamina D₃ és un compost essencial per al desenvolupament d'un esquelet sa i, la seva insuficiència augmenta el risc d'osteoporosi, a més de relacionar-se amb malalties com la preeclàmpsia, la periodontitis, els trastorns autoimmunes, les malalties infeccioses, les malalties cardiovasculars, alguns tipus de càncer, diabetis tipus 2 i trastorns neurològics. [173] A més, recentment s'ha informat de l'efecte inhibitori de l'1- α ,25-dihidroxicolecalciferol en cèl·lules epitelials nasals humanes infectades amb SARS-CoV-2.2 i regula les respostes inflamatòries immunopatològiques en el context d'altres infeccions respiratòries. En persones grans, la producció de la forma activa de la vitamina D 1- α ,25-dihidroxicolecalciferol és limitada, especialment quan l'exposició a la llum solar és insuficient, per tant l'obtenció de vitamina D a través de suplementació alimentària és necessària, sobretot en aquests temps de pandèmia. [174] Malauradament, la vitamina D és inestable i la seva degradació és catalitzada per l'aire, la llum, la calor, la humitat i els agents oxidants. [175,176] És conegut que quan la vitamina D és irradiada per llum UV apareixen com a productes de degradació el taquisterol i el lumisterol. [177] Actualment, existeixen diferents mètodes per establir la vitamina D com ara els recobriments que impedeixen el contacte amb l'aire (embalatge en gasos inerts) els quals retarden la degradació de la vitamina.

4.3.2. Article 6: A New and Highly Stable Cocrystal of Vitamin D₃ for its use in enhanced food supplements.

Les vitamines són essencials per la salut dels humans, com també ho són per als animals. Aquests no poden sintetitzar-les i per tant les han d'adquirir a través de la dieta (premescles d'aliments en el cas d'animals de granja). La composició de la premescla afecta l'estabilitat de les vitamines, sobretot pel que fa a la presència o absència de colina. Aquest component és un nutrient essencial per a tots els animals i suplement dietètic necessari per a aus de corral. Per mantenir la potència vitamínica, es recomana tenir les premescles vitamíniques separades de la colina. Actualment existeixen les vitamines microencapsulades com a font per adquirir-les, on l'estructura química d'aquestes està protegida per microencapsulació i els nutrients s'alliberen després de la ingesta. [178] Tot i així, segueix existint la necessitat de mètodes robustos i econòmics per al processament, transport i emmagatzematge de vitamina D.

En aquest article es presenta el disseny, descobriment i caracterització del cocristall de colecalciferol (Vitamina D₃) i resorcinol, del qual s'ha estudiat la seva estabilitat enfront de la llum, la calor i els productes químics presents en les premescles d'aliments per tal de presentar una alternativa viable a la protecció de la vitamina D respecte el mètode més eficient que s'utilitza actualment (la microencapsulació). També hem estudiat la solubilitat i velocitat de dissolució i hem resolt i analitzat la seva estructura cristal·lina. Els resultats experimentals mostren que el nou cocristall és extremadament estable i pot convertir-se en la base de formulacions molt eficients de vitamina D₃.

Es va triar el resorcinol com a un dels diferents coformadors a utilitzar durant l'*screening* per les seves propietats antioxidants a més de tenir en compte un enfocament d'enginyeria cristal·lina. El resorcinol presenta dos bons donadors d'enllaç d'hidrogen capaços d'interactuar a priori amb el grup alcohol del colecalciferol. Altres coformadors polifenòlics amb propietats antioxidants com l'orcíol, l'àcid gàl·lic, l'àcid 3,4-dihidroxibenzoic i el floroglucinol també es van emprar a l'*screening*, però ens vam centrar en el resorcinol per raons regulatòries (producte FEMA GRASS). [36]

Durant l'estudi del cocristall de colecalciferol/resorcinol es varen observar dues formes multicomponent, la forma A (estable) i la forma B (metastable), ambdues en una proporció molar colecalciferol:resorcinol 1:1. Tanmateix, només la forma A es va poder aïllar en la seva forma pura. El cocristall colecalciferol/resorcinol (forma A) es va obtenir mitjançant una recristal·lització lenta a baixa temperatura a través d'una barreja d'ambdós components en dissolució pentà:acetona (3:2). De la mateixa manera es van poder aïllar els monocristalls adequats per a l'anàlisi de difracció de raigs X de monocristall. L'estructura cristal·lina resolta confirma l'estequiometria 1:1 i s'observen dues molècules de cada component a la unitat asimètrica. Les dues molècules de colecalciferol presenten diferents conformacions com a conseqüència de les rotacions dels enllaços de la cadena alifàtica terminal. (Figura 44)

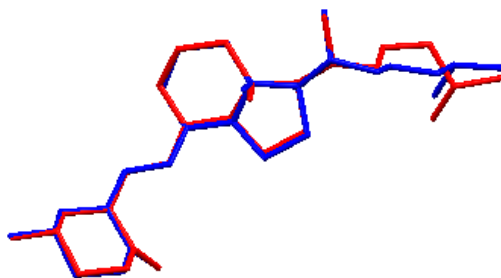


Figura 44. Superposició de les dues conformacions del colecalciferol

El grup alcohol de les molècules de colecalciferol està completament envoltat per quatre molècules de resorcinol en un conjunt combinat d'interaccions d'enllaços O-H...O i OH... π (Figura 45). La interacció OH... π amb l'anell aromàtic de molècules de resorcinol (distància OH...centroïd 2,868 Å) actua com a tap de la gàbia en que es troba encapsulat el grup alcohol del colecalciferol.

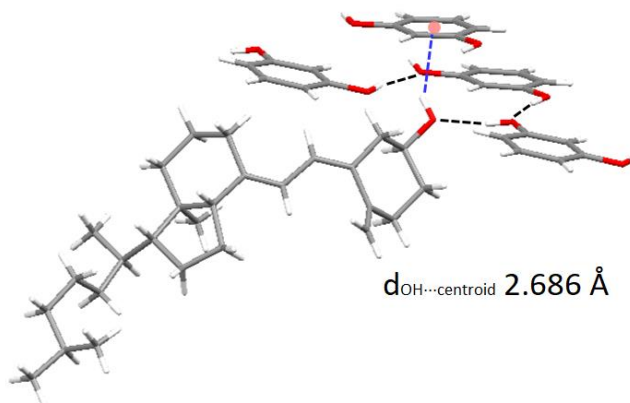


Figura 45. Estructura cristal·lina del cocristall colecalciferol / resorcinol. Es destaquen les interaccions O-H...O i O-H... π al voltant del grup alcohol de la molècula de colecalciferol

Per tal d'avaluar la fotoestabilitat del cocristall es va emprar una làmpada led de 6500K situada a una distància aproximada de la mostra de 30 cm (amb una intensitat de 5000 lx) i la seva evolució es va analitzar periòdicament durant dos mesos per HPLC. Paral·lelament es va realitzar un seguiment en condicions normals i forçades (25 °C/60% HR i 40 °C/75% HR) analitzant les mostres extretes periòdicament durant 4-5 mesos per difracció de raigs X de pols i ressonància magnètica nuclear (control a les fosques).

En aquests estudis d'estabilitat s'observa un percentatge significativament superior de colecalciferol en el cocristall respecte a la vitamina D₃ pura just després de 20 dies d'irradiació, mentre que al cap de 60 dies és 3 vegades superior, demostrant així una fotoestabilitat millorada respecte de la vitamina D₃ pura. (Figura 46) En condicions normals (25 °C/60% HR) el cocristall es va mantenir estable durant més de 5 mesos, mentre que el colecalciferol va mostrar una pèrdua de cristal·linitat formant un sòlid resinós en 4 mesos. A més, en condicions forçades (40 °C/75% HR) el colecalciferol es va tornar resinós en només 15 dies, mentre que el cocristall va romandre sense canvis durant 5 mesos.

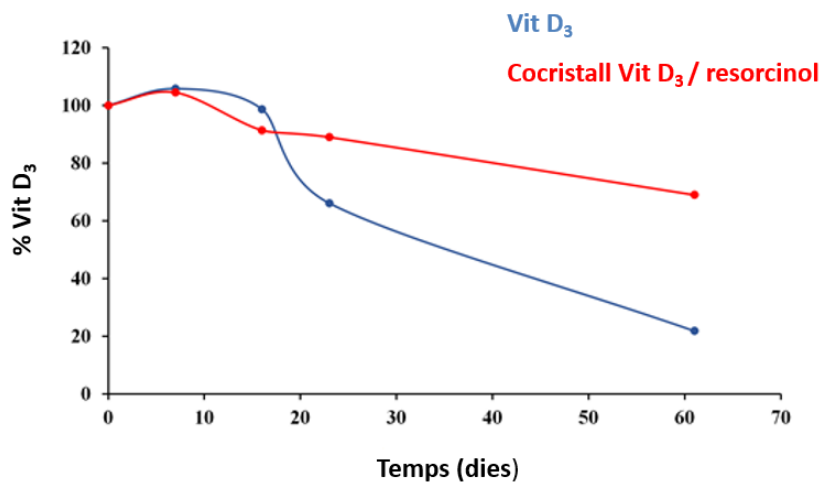


Figura 46. Evolució del contingut de colecalciferol (Vit D₃) provinent del cocristall comportament amb el colecalciferol comercial sota irradiació de 5000 lx a 25 °C.

Les mesures de velocitat de dissolució en medi FaSSIF v2 es van realitzar amb finalitats de caracterització. Tot i que alguns productes de degradació de la vitamina D₃ van aparèixer durant la prova com a conseqüència d'estar en solució, es pot assegurar també que el nou cocristall presenta un augment moderat de la velocitat de dissolució en comparació amb la vitamina D₃ pura (1,8 vegades), segons les mesures d'UV.

Per tal de veure si el cocristall podria ser utilitzat en premescles d'aliments que contenen clorur de colina, es va realitzar la premescla utilitzant el nou cocristall de colecalciferol / resorcinol com a font de vitamina D₃, enfront d'una premescla comercial. Tal i com s'ha

esmentat anteriorment el clorur de colina és un suplement habitual en l'alimentació de les aus de corral (premescles). Aquest additiu és absolutament necessari per a la prevenció d'afeccions com la perosi i l'augment del fetge. Ara bé, el clorur de colina afecta significativament l'activitat vitamínica, considerant-se un agent d'estrès. És per aquesta raó, que era necessari comprovar l'estabilitat del cocristall de vitamina D₃-resorcinol en presència de clorur de colina.

Per a realitzar aquest estudi es van emprar dues premescles, la primera contenia vitamina D₃ comercial, mentre que la segona contenia el cocristall. Totes dues es van mesclar amb una composició estàndard de vitamines i minerals. Després, es van incubar en condicions normals i forçades (25 °C/57% HR i 40 °C/75% HR) i es van analitzar periòdicament mitjançant HPLC. Els resultats mostren que ambdues premescles són inestables sota condicions d'estrès (40 °C / 75% HR) i es degraden gairebé completament en 30 dies, essent el cocristall lleugerament més estable. Aquests resultats mostren com l'entorn de premescla en condicions d'estrès afecta significativament a l'estabilitat química de la vitamina. Tot i així, existeixen diferències en condicions normals (25 °C/57% HR) en la formulació de la premescla comercial de colecalciferol. En concret, en 60 dies el cocristall mostra una disminució del contingut de colecalciferol fins a un 61% (disminuint només a un 55% en 90 dies), mentre que les premescles comercials mostren una reducció més elevada, fins a un 27%, decreixent a un 19% en 90 dies. (Figura 47)

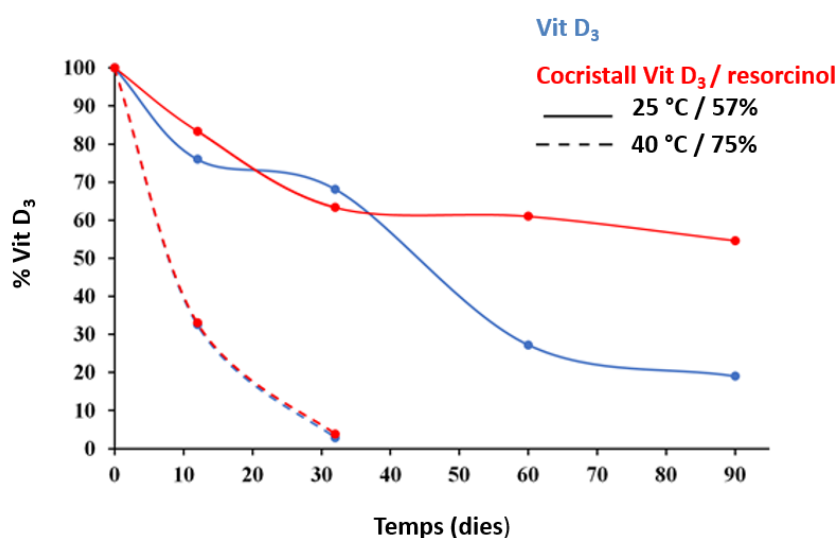


Figura 47. Evolució del contingut de colecalciferol (Vit D₃) del cocristall enfront del colecalciferol comercial en la premescla mineral i vitamínica.

Finalment, és important destacar que la formulació de premescla del nou cocristall es va preparar sense cap tècnica d'estabilització addicional, mentre que la premescla comercial de control incloïa protecció d'última generació com són la presència d'antioxidants i un recobriment protector. Tot i així el cocristall presenta millor estabilitat enfront de les condicions d'estrès.

En conclusió, aquest estudi és un nou exemple de com es poden millorar les propietats fisicoquímiques d'un nutraceutic a través de l'enginyeria cristal·lina. S'ha demostrat que el cocristall de calciferol/resorcinol presenta superior fotoestabilitat, solubilitat i estabilitat en premescles d'aliments per a animals respecte del colecalciferol pur.

5. CONCLUSIONS

Aquesta tesi doctoral s'ha centrat en el disseny de noves formes sòlides multicomponent, a fi de modular les propietats fisicoquímiques de tres compostos nutracèutics de gran rellevància farmacèutica i nutricional: pterostilbé, ubiquinol i vitamina D₃.

Per tal d'obtenir les noves formes sòlides, s'han emprat diverses tècniques d'*screening* de cocristalls. Dels més de 1.500 experiments realitzats, s'han obtingut 25 noves formes sòlides cristal·lines, entre ells polimorfs i cocristalls dels tres compostos nutracèutics, dels quals 11 estructures cristal·lines s'han resolt i analitzat les seves estructures cristal·lines. En particular, dues d'elles s'han obtingut mitjançant mètodes d'espai directe amb dades de difracció de raigs X de pols. A més, s'han utilitzat diverses tècniques *ab initio* amb diverses finalitats, com ara l'anàlisi de les interaccions intermoleculars, el càlcul de l'energia reticular, el càlcul del potencial electrostàtic molecular (MEP) o superfícies de Hirshfeld.

Durant el desenvolupament d'aquest treball experimental de doctorat s'ha estudiat amb profunditat l'entorn polimòrfic del compost nutracèutic pterostilbé, el qual ha permès l'anàlisi de diferents fenòmens de gran rellevància dins del camp de l'estat sòlid cristal·lí, com ara la polarització dels grups funcionals. La discussió de les característiques estructurals i les interaccions intermoleculars dels polimorfs de pterostilbé ha permès establir l'estabilitat relativa entre polimorfs d'aquest important producte natural.

Finalment, la cocrystal·lització s'ha utilitzat per a la modulació de les propietats fisicoquímiques.

- S'ha incrementat 10 vegades la biodisponibilitat oral del compost nutracèutic pterostilbé mitjançant la seva cocrystal·lització amb àcid picolínic. Aquest increment s'ha demostrat amb estudis de biodisponibilitat en rates.
- S'ha estabilitzat l'ubiquinol enfront l'oxidació en condicions d'estrès (humitat relativa i temperatura) mitjançant la formació del cocrystal amb l'àcid 3,4-dihidroxibenzoic, essent aquesta una molt bona alternativa per a la seva comercialització de forma eficaç i segura, a més de reduir l'ús de procediments costosos com per exemple l'ús d'atmosferes inerts durant la preparació de comprimets.

- El cocristall de vitamina D₃ i resorcinol ha demostrat ser una forma cristal·lina útil per inhibir, tant la fotodegradació com la degradació química en condicions d'estrès (humitat relativa i temperatura) de la vitamina D₃. A més, cal fer esment del potencial que pot tenir el cocristall com a estabilitzador de la vitamina D₃ en premescles d'aliments per a animals, els quals contenen minerals i additius necessaris, però que a la vegada acceleren la degradació de la vitamina D₃.

En definitiva, la cocrystal·lització ha demostrat ser una molt bona metodologia per a la millora de la biodisponibilitat oral del pterostilbé, ha millorat l'estabilitat de l'ubiquinol enfront l'oxidació per l'aire en condicions d'estrès i la de la vitamina D₃ en premescles per a alimentació animal.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Espín, J. C.; García-Conesa, M. T.; Tomás-Barberán, F. A. Nutraceuticals: Facts and fiction *Phytochemistry*. **2007**, *68*, 2986-3008.
- [2] Brower, V. N., Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? *Biotechnol.* **1998**, *16*, 728-731.
- [3] Prakash, D.; Gupta, C.; Sharma, G. Importance of Phytochemicals in Nutraceuticals. *Journal of Chinese Medicine Research and Development*. **2012**, *1*, 70-78.
- [4] Nasri, H.; Baradaran, A.; Shirzad, H.; Rafieian-Kopaei, M. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *M. Int. J. Prev. Med.* **2014**, *5(12)*, 1487-99.
- [5] Stellavato, A.; Pirozzi, A.V.; Novellis, F.; Scognamiglio, I., Vassallo, V., Giori, A.M.; Rosa M.; Schiraldi, C. In vitro assessment of nutraceutical compounds and novel nutraceutical formulations in a liver-steatosis-based model. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 1-11.
- [6] Bourbon A.I., Pinheiro A.C., Cerqueira M.A., Vicente A.A. *In vitro* digestion of lactoferrin-glycomacropeptide nanohydrogels incorporating bioactive compounds: Effect of a chitosan coating. *Food Hydrocoll.* **2018**, *84*, 267-275.
- [7] Zhang, X.; Liu, J.; Qian, C.; Kan, J.; Jin, C. H. Effect of grafting method on the physical property and antioxidant potential of chitosan film functionalized with gallic acid. *Food Hydrocoll.* **2019**, *89*, 1-10.
- [8] Khan N., Bharali D.J., Adhami V.M., et al. Oral administration of naturally occurring chitosan-based nanoformulated green tea polyphenol EGCG effectively inhibits prostate cancer cell growth in a xenograft model. *Carcinogenesis*. **2014**, *35(2)*, 415-423.
- [9] Deepshikha, S.; Vaibhav, S.; Ankit, K. Techniques for solubility enhancement of poorly soluble drugs: an overview. *Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Sciences*, **2012**, *1*, 18-38.
- [10] Schultheiss, N.; Newman, S.A.; Pharmaceutical co-crystals and their physicochemical properties, *Crystal Growth and Design*. **2009**, *9*, 2950-2967.
- [11] Shan N.; Zaworotko M.J. The role of Cocrystals in pharmaceutical science, *Drug Discovery Today*. **2008**, *13*, 440-446.
- [12] Cerreia Vioglio, P.; Chierotti, M. R.; Gobetto, R.; Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* **2017**, *117*, 86-110.

- [13] Polymorphism in Molecular Crystals, Bernstein, J. Primera Edició, *Clarendon Press*, **2002**.
- [14] Healy, A. M.; Ayenew Worku, Z; Kumar, D.; M. Madi, A. Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2017**, 117, 25-46.
- [15] Coles, S. J.; Threlfall, T. L.; Tizzard, G. J. The Same but Different: Isostructural Polymorphs and the Case of 3-Chloromandelic Acid. *Cryst. Growth Des.* **2014**, 14, 1623-1628.
- [16] Jha, K. K.; Dutta, S.; Kumar, V.; Munshi, P. Isostructural polymorphs: qualitative insights from energy frameworks. *CrystEngComm*. **2016**, 18, 8497-8505.
- [17] Dey, D.; Thomas, S. P.; Spackman, M. A.; Chopra, D. 'Quasiisostructural polymorphism' in molecular crystals: inputs from interaction hierarchy and energy frameworks. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 2141-2144.
- [18] Prohens, R.; Barbas, R.; Font-Bardia, M. Morphotropism and "Quasi-Isostructurality" in the Three High Z' Concomitant Polymorphs of Efinaconazole, *Cryst. Growth Des.* **2020**, 20, 4238-4242.
- [19] Kalman, A. Morphotropism: link between the isostructurality, polymorphism and (stereo)isomerism of organic crystals, *Acta Cryst.* **2005**, 61, 536-547.
- [20] Cruz-Cabeza, A. J.; Bernstein, J. Conformational Polymorphism. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 2170-2191.
- [21] Burger & R. Ramberger, *Microchim. Acta*, **1979**, 72, 259-271.
- [22] Rodriguez-Sponga, B.; Priceb, C. P., Jayasankar, A., Matzgerb, A.J., Rodriguez-Hornedo, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, 56, 241- 274.
- [23] Materials Studio, v 7.0, Accelrys Software, Inc., **2013**.
- [24] A. Neumann, M.; A. Perrin, M. Can crystal structure prediction guide experimentalists to a new polymorph of paracetamol? *CrystEngComm*, **2009**,11, 2475-2479.
- [25] Nyman, J.; Day, G. M. Static and lattice vibrational energy differences between polymorphs. *CrystEngComm*. **2015**, 17, 5154-5165.
- [26] K. Khankari, R.; J.W. Grant, D. Pharmaceutical hydrates. *Thermochimica Acta*, **1995**, 61-79.

- [27] Aaltonen, J.; Alles, M.; Mirza, S.; Koradia, V; Gordon, K. C.; Rantanen, J. Solid form screening—a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 23-37.
- [28] Clarke, H. D.; K. Arora, K.; Bass, H.; Kavuru, P.; Teng Ong, T.; Pujari, T.; Wojtas, L.; Zaworotko, M. J. Structure-Stability Relationships in Cocrystal Hydrates: Does the Promiscuity of Water Make Crystalline Hydrates the Nemesis of Crystal Engineering? *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 2152-2167.
- [29] Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Morris KR and Rodríguez-Hornedo N. Hydrates. Marcel Dekker, New York, **1993**, 393–440.
- [30] Patel, A.; A. Jones, S.; Ferro, A.; Patel, N. Pharmaceutical salts: a formulation trick or a clinical conundrum? *Br. J. Cardiol.*, **2009**, *16*, 281-286.
- [31] Hsieh, Y.; M. Merritt, J.; Yu, W.; S. Taylor, L.; Salt Stability The Effect of pHmax on Salt to Free Base Conversion. *Pharm Res.***2015**, *32*, 3110-3118.
- [32] Kratochvíl, B. Solid forms of pharmaceutical. *Prague Institute of Chemical Technology, Czech Republi*, Springer, **2010**, *8*, 129-140.
- [33] Jayant Dengale, S.; Grohganz, H.; Rades, T.; Löbmann, K. Recent advances in co-amorphous drug formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2016**, *100* ,116-125.
- [34] Lobmann, K.; Laitinen, R.; Grohganz H.; Gordon, K. C.; Strachan, C.; Rades, T.; Coamorphous Drug Systems: Enhanced Physical Stability and Dissolution Rate of Indomethacin and Naproxen. *Mol. Pharmaceutics*, **2011**, *8*, 1919-1928.
- [35] R. Fukte, S.; P. Wagh, M.; Rawat, S. Coformer selection:an important tool in cocrystal formation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2014**; *6(7)* 975-1491.
- [36] Encyclopedia of Food and Color Additives; George A. *Burdock CRC Press*, Boca Raton, New York, London, Tokyo, **1997**.
- [37] Wohler, F. Untersuchungen über das Chinon. *Ann. Chem. Pharm.* **1844**, *51*, 145-163.
- [38] R. Desiraju, G. Crystal and co-crystal, *CrystEngComm*, **2003**, *5(82)*, 466-467.
- [39] D. Dunitz, J. Crystal and co-crystal: a second opinion. *CrystEngComm*, **2003**, *5(91)*, 506-506.
- [40] Regulatory Classification of Pharmaceutical co-crystals guidance for industry (FDA, **2018**) Disponible a: www.fda.gov]
- [41] Jacobs, A.; Amombo Noa, F. M. Hybrid Salt-Cocrystal Solvate: pCoumaric Acid and Quinine System. *J. Chem. Crystallogr.* **2014**, *44*, 57– 62.

- [42] Cerreia Vioglio, P.; R. Chierotti, M.; Gobetto, R. Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **117**, **2017**, 86-110.
- [43] Shaikh, R.; Singh, R.; M. Walker, G.; M. Croker, D. Pharmaceutical Cocrystal Drug Products: An Outlook on Product Development, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2018**, *39*(12), 1033-1048.
- [44] Shekhar Reddy, D.; E. Ovchinnikov, Y.; V. Shishkin, O.; T. Struchkov, Y.; R. Desiraju, G. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering. Solid State Architecture and Synthon Robustness in Some 2,3-Dicyano-5,6-dichloro-1,4-dialkoxybenzenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4085-4089.
- [45] R. Desiraju, G. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering-A New Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int.* **1995**, *34*, 2311-2327.
- [46] Musumeci, D.; A. Hunter, C.; Prohens, R.; Scuderia, S.; F. McCabec, J. Virtual cocrystal screening. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 883-890.
- [47] Solis Calero, C.; Farwer, J.; J. Gardiner, E.; A. Hunter, C.; Mackey, M.; Scuderi, S.; Thompsona, S.; G. Vinter G.; Footprinting molecular electrostatic potential surfaces for calculation of solvation energies. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, *15*, 18262-18273.
- [48] A. Hunter, C; Quantifying Intermolecular Interactions: Guidelines for the Molecular Recognition Toolbox, *Angew. Chem. Int.*, **2004**, *43*, 5310-5324.
- [49] Malamatarì, M.; Ross, S. A.; Douroumis, D.; Velaga, S. P. Experimental cocrystal screening and solution-based scale-up cocrystallization methods. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2017**, *117*, 162-177
- [50] Barbas Cañero, R., Aplicacions de l'enginyeria cristal·lina al descobriment i estudi de noves formes sòlides de principis actius, Tesi Doctoral, Facultat Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Univeristat de Barcelona, **2019**.
- [51] Ibrahim, A. Y.; Forbes, R. T.; Blagden, N. Spontaneous crystal growth of co-crystals: the contribution of particle size reduction and convection mixing of the co-formers. *CrystEngComm*. **2011**, *13*, 1141-1152.
- [52] Trask, A. W.; Samuel Motherwell, W. B.; Jones W. D. Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation *Chem. Commun.*, **2004**, 890-891.

- [53] Karimi-Jafari, M.; Padrela, L.; Walker, G. M.; Croker, D. M. Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications. *Crystal Growth & Design*. **2018**, *18* (10), 6370-6387.
- [54] Fleischman, S. G.; Kuduva, S. S.; McMahon, J. A.; Moulton, B.; Walsh, R. D. B.; Rodríguez-Hornedo, N.; Zaworotko, M. J. Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases: Multiple-Component Crystalline Solids Involving Carbamazepine. *Cryst. Growth Des.* **2003**, *3*, 909-919.
- [55] Walsh, R. D. B.; Bradner, M. W.; Fleischman, S.; Morales, L. A.; Moulton, B.; Rodríguez-Hornedo, N.; Zaworotko, M. J. Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases. *Chem. Commun.* **2003**, 186-187.
- [56] Thakuriaa, R.; Deloria, A.; Maya, W. J.; Lipert, P.; Roy, L.; Rodríguez-Hornedo, N. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. **2013**, *453* (1) 101-125.
- [57] Holaňa, J.; Štěpánka, F.; Billot, P.; Ridvan, L.; The construction, prediction and measurement of co-crystal ternary phase diagrams as a tool for solvent selection *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2014**, *63* (15), 124-131.
- [58] (Prohens, R.; Puigjaner, C.; Barbas, R.; Portell, A. Cocristales farmacéuticos: el nuevo reto. El farmacéutico: profesión y cultura. **2009**, 45-54.
- [59] Chiarella, R.; J. Davey, R.; L. Peterson, M. Making Co-Crystals. The Utility of Ternary Phase Diagrams. *Crystal Growth and Design*. **2007**, *7*, 1223-1226.
- [60] Ainouz, A.; Authelin, J.; Billot, P.; Lieberman, H. Modeling and prediction of cocrystal phase diagrams. *International Journal of Pharmaceutics*. **2009**, *374*, 82-89.
- [61] Kitamura, M. Controlling factor of polymorphism in crystallization process. *Journal of Crystal Growth*. **2002**, 237-239.
- [62] McGinty, J.; Yazdanpanah, N.; Price, C.; H. ter Horst, J.; Sefcik, J. Nucleation and Crystal Growth in Continuous Crystallization. The Handbook of Continuous Crystallization. *The Royal Society of Chemistry*. **2020**, 1-50.
- [63] Engineering Crystallography: From Molecule to Crystal to Functional Form. J. Roberts, K.; Docherty, R.; Tamura R.; Seeding in Crystallisation Engineering Crystallography: From Molecule to Crystal to Functional Form, *Springer, Dordrecht*, **2017**.

- [64] Cui, Y.; S. Myerson, A. Experimental Evaluation of Contact Secondary Nucleation Mechanisms, *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 5152–5157.
- [65] Capitol 11 Unit Operations, Bioprocess Engineering Principles. Pauline M. Doran, Segona Edició, **2013**.
- [66] Ostwald, W. Studien über die Bildung und Umwandlung fester Körper. *Z. Phys. Chem.*, **1897**, *22*, 289-330.
- [67] Maruyama, K.; Kagi, H.; Inoue, T.; Ohfuji, H.; Yoshino, T. In Situ Observation of Pressure-induced. Crystallization from Amorphous Calcium Carbonate by Time-resolved X-ray Diffraction. *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 434-436.
- [68] Weiwei Tang, W.; Sima, A. D.; Gong, J., Wang, J. Li, T. Kinetic Difference between Concomitant Polymorphism and Solvent-Mediated Phase Transformation: A Case of Tolfenamic Acid. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20*, 3, 1779-1788.
- [69] Kariuki, B. M.; Zin, D. M. S.; Tremayne, M.; Harris, K. D. M. Crystal Structure Solution from Powder X-ray Diffraction Data: The Development of Monte Carlo Methods to Solve the Crystal Structure of the γ -Phase of 3-Chloro-trans-cinnamic Acid. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 565-569.
- [70] A Treatise on Crystallography. Miller, W.H. J. & J. J. Deighton, **1839**.
- [71] Boultif, A.; Louër, D. Indexing of powder diffraction patterns for low-symmetry lattices by the successive dichotomy method. *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 987-993.
- [72] de Wolf, P.M. A simplified criterion for the reliability of a powder pattern indexing, *J. Appl. Crystallogr.* **1968**, *1*, 108-113.
- [73] Smith, G.S. y Snyder, R.L. A criterion for rating powder diffraction patterns and evaluating the reliability of powder-pattern indexing. *J. Appl. Crystallogr.* **1979**, *12*, 60-65.
- [74] A. Le Bail, H. Duroy y J.L. Fourquet, Ab-initio structure determination of LiSbWO₆ by X-ray powder diffraction, *Mater. Res. Bull.* **1988**, *23*, 447.
- [75] Rodríguez-Carvajal, J. Recent Developments of the Program FULLPROF, in Commission on Powder Diffraction (IUCr), *Newsletter*, **2001**, *26*, 12-19.
- [76] Gront, D.; Kolinski, A. Efficient scheme for optimization of parallel tempering Monte Carlo method. *J. Phys.* **2007**, 1-9.

- [77] Favre-Nicolin, V.; Cerny, R. FOX, 'free objects for crystallography': a modular approach to ab initio structure determination from powder diffraction. *J. Appl. Cryst.* **2002**, 35, 734-743.
- [78] Rietveld, H.M.J. "A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures". *Appl. Cryst.* **1969**, 65-71.
- [79] Pindelska, E.; Sokal, A. Kolodziejski, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2017**, 117, 1, 111-146.
- [80] Berry, D. J.; Steed, J. W. Pharmaceutical cocrystals, salts and multicomponent systems; intermolecular interactions and property based design. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2017**, 117, 3-24.
- [81] Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. The nature of π - π interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525-5534.
- [82] Thakuria, R.; Nath, N. K.; Saha, B. K. The Nature and Applications of π - π Interactions: Perspective. *Cryst. Growth Des.* **2019**, 19, 523-528.
- [83] Cavallo, G.; Metrangolo, P.; Milan, R.; Pilati, T.; Priimagi, A.; Resnati, G.; Terraneo, G. *The Halogen Bond. Chem. Rev.* **2016**, 116, 2478-2601.
- [84] Etter, M. C. Encoding and Decoding Hydrogen-Bond Patterns of Organic Compounds. *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 23, 120-126.
- [85] Atoms in Molecules: A Quantum Theory, Richard F. W. Bader (International Series of Monographs on Chemistry. *Oxford University Press*, **1991**.
- [86] R. Johnson, E.; Keinan, S.; Mori-Sanchez, P.; Contreras-Garcia, J.; J. Cohen, A.; Yang, W. Revealing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6498-6506.
- [87] Shyam, P.; Kumar, V.; Raghavendra, V.; Subramanian, V. Bader's Theory of Atoms in Molecules (AIM) and its Applications to Chemical Bonding, *Journal of Chemical Sciences.* **2016**, 128, 1527-1536.
- [88] The Quantum Theory of Atoms in Molecules. Matta, C. F.; Boyd, R. J. WILEY-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2007
- [89] Karmakar, M.; Frontera, A.; Chattopadhyay, S.; Mooibroek, T. J.; Bauzá, A. Intramolecular Spodium Bonds in Zn (II) Complexes: Insights from Theory and Experiment. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21(19), 1-14.

- [90] Hirshfeld, F. L., Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. *Theoretica chimica acta*. **1977**, 44, 129-138.
- [91] J. McKinnon, J.; Jayatilaka, D.; A. Spackman, M.; Towards quantitative analysis of intermolecular interactions with Hirshfeld surfaces. *Chem Commun*. **2007**, 3814-3816.
- [92] Spackman, M. A.; McKinnon, J. J. Fingerprinting Intermolecular Interactions in Molecular Crystals. *CrystEngComm*. **2002**, 4, 378-392.
- [93] Spackman, M. A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld surface analysis. *CrystEngComm*. **2009**, 11, 19-32.
- [94] Turner, M. J.; McKinnon, J. J., Wolff, S. K., Grimwood, D. J., Spackman, P. R., Jayatilaka, D. Visualisation and characterisation of voids in crystalline materials. *CrystEngComm*. **2011**, 13, 1804-1813.
- [95] Turner, M. J.; McKinnon, J. J., Wolff, S. K., Grimwood, D. J., Spackman, P. R., Jayatilaka, D. Spackman, M. A. CrystalExplorer17, **2017**. University of Western Australia (<https://hirshfeldsurface.net>).
- [96] Hildebrand, A history of solution theory *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1981**, 32, 1-23.
- [97] Veseli, A.; Zakelj, S.; Kristl, A. A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterization. *Drug Dev Ind Pharm*, **2019**, 45(11), 1717-1724.
- [98] Nehm, S., Rodríguez-Spong, B.; Rodríguez-Hornedo, N. Phase Solubility Diagrams of Cocrystals Are Explained by Solubility Product and Solution Complexation. *Cryst. Growth Des.* **2006**, 6, 592-600.
- [99] Thakuriaa, R.; Deloria, A.; Jonesa, W.; P. Lipertb, M.; Royb, L.; Rodríguez-Hornedo, N. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *Int J Pharm*, **2013**, 453, 101-125.
- [100] Bethune, S. J.; Huang, N.; Jayasankar, A.; Rodríguez-Hornedo, N. Understanding and Predicting the Effect of Cocrystal Components and pH on Cocrystal Solubility. *Cryst. Growth Des.*, **2009**, 9, 3976-3988.
- [101] Bakaa, E.; Comer, J.; Takács-Nováka, K.; Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**, 46(2), 335-341.
- [102] Pharmaceutical Dissolution Testing, Umesh V. Banakar, CRC Press, New York, **1991**.

- [103] Shekunov, B.; Ross Montgomery, E. Theoretical Analysis of Drug Dissolution: I. Solubility and Intrinsic Dissolution Rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2016**, *105*, 2685-2697.
- [104] Gravestock, T.; Box, K.; Comer, J.; Frake, E.; Judge, S.; Ruiza, R. The “GI dissolution” method: a low volume, in vitro apparatus for assessing the dissolution/precipitation behaviour of an active pharmaceutical ingredient under biorelevant conditions. *Anal. Methods*, **2011**, *3*, 560-567.
- [105] Suresh, K.; Nangia, A. Curcumin: pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability. *CrystEngComm*, **2018**, *20*, 3277–3296
- [106] Ostwald, W. Studien über die Bildung und Umwandlung fester Körper. *Z. Phys. Chem.*, **1897**, *22*, 289-330.
- [107] Shargel, L. and A.B. Yu Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. **1999**, *4*, New York: McGrawHill.
- [108] Aungst, B. J.; Novel Formulation Strategies for Improving Oral Bioavailability of Drugs with Poor Membrane Permeation or Presystemic Metabolism, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1993**, *82*(10), 979-987.
- [109] Urso, R.; Blardi, P.; Giorgi GA short introduction to pharmacokinetics. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. **2002**, *6*, 33-34.
- [110] Toutain, P. L.; Bousquet-Mélou, A. Bioavailability and its Assessment. *J Vet Pharmacol Ther*. **2004**, *27*(6), 455-66.
- [111] *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. E. Aulton, M. Elsevier Limited, **2002**.
- [111] Stanton M.K., Bak A. Physicochemical Properties of Pharmaceutical Co-Crystals: A Case Study of Ten AMG 517 Co-Crystals. *Cryst. Growth Des*. **2008**, *8*, 3856-3862.
- [111] ICH, “Harmonized tripartite guideline: a) Stability testing of new drug substances and drug products ICH-Q1A, **2003**.
- [113] *Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products*, ICH-Q1B, **1998**.
- [114] Ahmad, I.; Ahmed, S.; Anwar, Z.; Ali Sheraz, M.; Marek Sikorski, M. Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products. *International Journal of Photoenergy*. **2016**, 1-19.

- [115] Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation, W. Baertschi, S.; M. Alsante, K.; A. Reed, R. CRC Press, second edition, **2016**.
- [116] Burton WK, Cabrera N, Frank FC, The growth of crystals, Phil Tran R, Soc Lond A, **1951**, *243*, 299-358.
- [117] Patent WO2001097853A1 Improvement of itraconazole bioavailability, Ramaswami Bharatrajan, Deepak Hegde, Neeta Nerlekar, **2001**.
- [118] Stephen Chan, H. C.; Kendrick, J.; Neumann, M. A.; Leusen, F. J. J. Towards ab initio screening of co-crystal formation through lattice energy calculations and crystal structure prediction of nicotinamide, isonicotinamide, picolinamide and paracetamol multi-component. *CrystEngComm*, **2013**, *15*, 3799-3807.
- [119] Fábíán, L. Cambridge structural data base analysis of molecular complementarity in cocrystals. *Crystal Growth & Design*, **2009**, *9*(3), 1437-1443.
- [120] Loschen, C.; Klamt, A. COSMOtherm as a Valuable tool for cocrystal screening and development, *COSMOlogic GmbH & Co.KG*, **2011**, 1-11
- [121] Rimando, A. M.; Cuende, M.; Desmarchelier, C.; MehtaJohn, R. G.; Pezzuto, M.; Duke, S. O. Cancer Chemopreventive and Antioxidant Activities of Pterostilbene, a Naturally Occurring Analogue of Resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3453-3457.
- [122] Mikstacka, M.; Rimando, A. M.; Ignatowicz, E. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010, *65*, 57-63.
- [123] Micaela Mattio, L.; Catinella, G; Dallavalle, S.; Pinto, A. Stilbenoids: A Natural Arsenal against Bacterial Pathogens. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19525.
- [124] Daniel Casey Elixir of immortality? Wine, resveratrol and sirtuins: an overview. *Journal of Wine Research.* **2012**, *23*, 247-252.
- [125] Baur, J. A.; Sinclair, D. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery.* **2006**, *5*, 493-506.
- [126] Orallo, F. Trans-Resveratrol: A Magical Elixir of Eternal Youth? *Current Medicinal Chemistry.* **2008**, *15*, 1887-1898.
- [127] RIUS, M. Antioxidantes, ¿el elixir de la eterna juventud? *La Vanguardia*, **2012**.
- [128] McCormack, D.; McFadden; D. A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume*, **2013**, 1-15.

- [129] Lorgeril, M.; Salen, P. Paillard, F.; Laporte, F.; Boucher, F.; Leiris, J. Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovascular Research*. **2002**, 54 503-515.
- [130] Patent WO2010/141107A1: Solid forms of Pterostilbene, **2010**.
- [131] Patent WO2011/097372A2: Pterostilbene cocrystals, **2011**.
- [132] Brittain, H. G. Cocrystal Systems of Pharmaceutical Interest. *Cryst. Growth Des.* **2011**, 11, 2817-2823.
- [133] Schultheiss, N.; Bethune, S.; Henck, J. Nutraceutical cocrystals: utilizing pterostilbene as a cocrystal former. *CrystEngComm*. **2010**, 12, 2436–2442
- [134] Gu, C.; YOUNG, V.; Grant, D J. W. Polymorph Screening: Influence of Solvents on the Rate of Solvent-Mediated Polymorphic Transformation. *Journal of pharmaceutical science*. **2001**, 90, 11, 1878-1890.
- [135] Spartan'10, v 1.1.0.; Wavefunction, Inc., Irvine, CA, **2010**.
- [136] D. Dunitz, J.; Bernstein, J. Disappearing Polymorphs. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 193-200.
- [137] Krešimir Bučar, D.; W Lancaster, R.; Bernstein, J. Disappearing Polymorphs. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2015**, 8, 54(24), 6972-6993.
- [138] Mortazavi, M.; Johannes Hoja, M.; Aerts, L.; Quéré, L.; Van de Streek, J.; Neumann, M. A.; Tkatchenko, A. Computational polymorph screening reveals latea ppearing and poorly-soluble form of rotigotine. *Commnications chemistry*. **2019**, 2, 1-17.
- [139] Nguyen, T. T. H.; Rosbottom, I.; Marziano, I.; Hammond, R. B.; Roberts, K. J. Crystal Morphology and Interfacial Stability of RS-Ibuprofen in Relation to Its Molecular and Synthonic Structure. *Cryst. Growth Des.* **2017**, 17, 3088-3099.
- [140] Vippagunta, S. R.; Brittain, H. G.; Granta, D. J. W. Crystalline sòlids. *Advanced Drug Delivery. Reviews.* **2001**, 48, 3-26.
- [141] Belenguer, A. M.; Lampronti, G. I.; Cruz-Cabeza, A. J.; Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. Solvation and surface effects on polymorph stabilities at the nanoscale. *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 6617-6627.
- [142] Hammond, R. B.; Jeck, S.; Ma, C. Y.; Pencheva, K.; Roberts, K. J.; Auffret, T. An Examination of Binding Motifs Associated With InterParticle Interactions between

Facetted Nano-Crystals of Acetylsalicylic Acid and Ascorbic Acid through the Application of Molecular GridBased Search Methods. *J. Pharm. Sci.* **2009**, 98, 4589–4602.

[143] Hammond, R. B.; Pencheva, K.; Roberts, K. J. A Structural– Kinetic Approach to Model Face-Specific Solution/Crystal Surface Energy Associated with the Crystallization of Acetyl Salicylic Acid from Supersaturated Aqueous/Ethanol Solution. *Cryst. Growth Des.* **2006**, 6, 1324–1334.

[144]. G. Friedel. Studies on the law of Bravais. *Bull. Soc. Franc. Min.* 1907, 30, 326-455.

[145] Donnay, J. D. H.; Harker. D. A new law of crystal morphology extending the law of Bravais. *Am. Mineral.* **1937**, 22, 446-467.

[146] Docherty, R.; Clydesdale, G.; Roberts, K.; Bennema, P. Application of Bravais-Friedel-Donnay-Harker, attachment energy and Ising models to predicting and understanding the morphology of molecular crystals. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1991**, 24, 89-99.

[147] Berkovitch-Yellin, Z. Toward an ab initio derivation of crystal morphology. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 8239-8253.

[148] Wulff, G. Zur Frage der Geschwindigkeit des Wachstums und der Auflösung der Krystallflagen. *Zeitschrift für Kristallographie.* **1901**, 34, 449-530.

[149] Prywer, J. Kinetic and geometric determination of the growth morphology of bulk crystals: *Recent developments.* **2005**, 50, 1-38.

[150] Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G. P.; Taylor, R.; Towler, M.; Van de Streek, J. Mercury: visualization and analysis of Crystal Structures. *J. Appl. Cryst.* **2006**, 39, 453-457.

[151] Chen, G., Xia, M., Lei, W.; Wang, F.; Gong, X. A study of the solvent effect on the morphology of RDX crystal by molecular modeling method. *J. Mol. Model.*, **2013**, 19, 5397-5406.

[152] J Box, K.; Comer, J.; Taylor, R.; Karki, S.; Ruiz, R.; Price, R.; Fotaki, N. Small-Scale Assays for Studying Dissolution of Pharmaceutical Cocrystals for Oral Administration. *AAPS PharmSciTech.* **2016**, 17, 245-251.

[153] Yeo, S. C. M.; Ho, P. C.; Lin, H. S. Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: the impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation and dosing route on bioavailability. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, 57 (6), 1015-1025.

- [154] Brain, R. S.; Grant, S.E.; Coggan, E.; Smythe, G.A. The Physiological Action of Picolinic Acid in the Human. *Int J Tryptophan Res.* **2009**, *2*, 71-79.
- [155] López Briz, E.; Giner García, R. Chocolate, café, té y otros estimulantes: bebidas energéticas avant la lettre. *Revista Española de Drogodependencias.* **2013**, *38*, 391-409.
- [156] ICH, "Harmonized tripartite guideline Residual Solvents: ICH-Q3C, **2017**.
- [157] Grodowska, K.; Parczeswsk, A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica.* **2010**, *67*, 3-12.
- [158] Belenguer, A. M.; Lampronti, G. L.; Mitri, N.; Driver, M.; Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. Understanding the Influence of Surface Solvation and Structure on Polymorph Stability: A Combined Mechanochemical and Theoretical Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 49, 17051-17059.
- [159] Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, *1660*, 171-199.
- [160] Crane, F. L. Hydroquinone dehydrogenases. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 439-469.
- [161] Ernster, L.; Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**:195–204; 1995.
- [162] Overvad, K.; Diamant, B.; Holm, L.; Holmer, G.; Mortensen, S. A.; Stender, S. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**, *53*, 764–770.
- [163] MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G.; Garg, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2046-2056.
- [164] Apak, R.; Özyurek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 997–1027.
- [165] Zhang, Y.; Liu, J.; Chena, X.; Oliver, C. Y. Ubiquinol is superior to ubiquinone to enhance Coenzyme Q10 status in older men. *Chen Food Funct.* **2018**, *9*, 5653-5659.
- [166] Evans, M.; Baisley, J.; Barss, S.; Guthrie, N. A randomized, double-blind trial on the bioavailability of two CoQ10 formulations. *J. Funct. Foods*, **2009**, *1*, 65-73.
- [167] Hosoe, K.; Kitano, M; Kishida, H.; Kubo, H.; Fujii, K.; Kitahara, M. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2007**, *47*, 19-28.

- [168] V. Miles, M.; Horn, P.; Miles, L.; Tang, P.; Steele, P.; DeGrauw, T. Bioavailability of Coenzyme Q10: An Overview of the Absorption Process and Subsequent Metabolism. *Nutr. Res.*, **2002**, 22, 919-929.
- [169] Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation: Benzyl alcohols, benzaldehydes, a related acetal, benzoic acids, and related esters from chemical groups 23 and 301, EFSA J., **2012**, 10(12), 2994.
- [170] Maroz, A.; F. Anderson, R.; Robin, A., Smith, J.P. Murphy, M. Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* **2009**,46,105-109.
- [171] Funciones plenamente reconocidas de nutrientes. Vitamina D. Santarosa, B.; Araújo, L. *International Life Sciences Institute Do Brasil*, **2015**.
- [172] Heaney, R. P.; Davies, K.M.; Chen, T.C.; Holick, M.F.; Barger Lux, M. J. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr.* 2003, 77, 204 -210.
- [173] B. Jäpelt R.; Jakobsen, J. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci.* 2013, 4, 136.
- [174] C. Gallagher, J. Vitamin D and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **2013**, 42(2), 319-332.
- [175] Sazali, H.; Alshishani, A.; Saad, B.; Y. Chew, K.; Me Chong, M.; Miskam, M.; Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of vitamin D3 in milk samples. *R. Soc. open sci.* **2019**, 6, 190952.
- [176] Mahmoodani, F.; O. Perera, C.; Fedrizzi, B.; Abernethy, G.; Chen, H. Lipid oxidation and vitamin D3 degradation in simulated whole milk powder as influenced by processing and storage. *Food Chemistry.* **2017**, 219, 373-381.
- [177] T. Grady, L.; D. Thakker, K. Stability of Solid Drugs: Degradation of Ergocalciferol (Vitamin D2) and Cholecalciferol (Vitamin D3) at High Humidities and Elevated Temperatures. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **1980**, 69(9),1099-1102.
- [178] Gonçalves, A.; Estevinho, B.N.; Rocha, F. Microencapsulation of vitamin A: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **2016**, 51, 76-87.

7.APÈNDIX

Hydrogen bond polarization overcomes unfavourable packing in the most stable high Z' polymorph of Pterostilbene

Lidia Bofill,[†] Dafne de Sande[†], Rafael Barbas[§] and Rafel Prohens^{†, §}*

[†] Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L. Palma de Mallorca, Spain

[§]. Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain.

Electronic Supplementary Information

Table of contents:

1. Experimental methods.....	2
Table S1.....	2
Table S2.....	3
Table S3.....	4
2. Characterization of the solids.....	5
Table S4.....	18
3. References.....	19

1. Experimental methods

1.1. Materials and measurements.

Pterostilbene was purchased from Dynveo and purified, since Pterostilbene capsules contain pterostilbene (form I) and two excipients: calcium hydrogen phosphite and magnesium stearate. Pure pterostilbene was obtained according to the following method: the material from the capsules ($\approx 12 - 18$ g) was suspended in dichloromethane (200 mL) at 25 °C into a round-bottomed flask provided with magnetic stirring and it was stirred overnight. Then, the solution was first filtered using a paper filter. A turbid solution was obtained and it was filtered again through a 0.45 μm filter. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the solid was suspended in heptane (100 mL). The suspension was stirred for 3 days at 25 °C and it was filtered, dried and analyzed by PXRD. The PXRD analysis confirms that pterostilbene form II was obtained with a suitable purity.

A polymorph screening has been carried out (Table S1) and as a result, the three forms have been isolated and characterized.

Table S1. Screening of pterostilbene (form II)

Methodology	Solvent	Form obtained (according to PXRD)
Slow evaporation at 25 °C	ACN, Methyl isobutyl ketone, DMF, Et ₂ O and THF	Form I
	Butanol, Formic acid, Pentane, Heptane, AcOEt, Dimethyl ether, Isopropyl ether, Dioxane, Dichloromethane, Chloroform and Acetic acid	Form II
	Methanol	Form III

Pterostilbene form I has been obtained by slow evaporation at 25 °C in ACN after 6 days. Pterostilbene form II has been obtained by slow evaporation at 25 °C in butanol after 9 days. Pterostilbene form III has been obtained by slow evaporation at 25 °C in methanol after 2 days.

The polymorphic stability of pterostilbene was studied through slurry interconversion experiments in heptane. Form I appears to be thermodynamically favored compared to Form II-III at 25 °C.

Table S2. Polymorphic stability of Pterostilbene

Forms	XRPD Result	Time (days)
Form I-II	Form I	5
Form I-III	Form I	4
Form II-III	Form II	4

1.2. X-ray crystallographic analysis.

Powder X-ray diffraction patterns of polymorph screening were obtained on a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer in transmission configuration using Cu K α 1+2 radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) with a focalizing elliptic mirror and a PIXcel detector working at a maximum detector's active length of 3.347° . Configuration of convergent beam with a focalizing mirror and a transmission geometry with flat samples sandwiched between low absorbing films measuring from 1 or 2 to 40 or 75° in 2θ , with a step size of 0.026° and a total measuring time of two or four hours. The powder diffractograms of form I, II and III were indexed and the lattice parameters were refined by means of LeBail fits by means of Dicvol04,¹ and the space groups were determined from the systematic absences. The crystal structure was determined by direct space methodologies starting from a molecular model optimized with the commercial software SPARTAN² by means of the program FOX with the parallel tempering algorithm. Some constraints were introduced to FOX, considering aromatic rings as rigid groups. Several trials of 20 million runs were performed. The refinement of the structure has been performed by the Rietveld method using FullProf,³ figures S4, S8 and S12 depicts the final Rietveld plot, respectively.

Table S3. Crystallographic data of pterostilbene forms

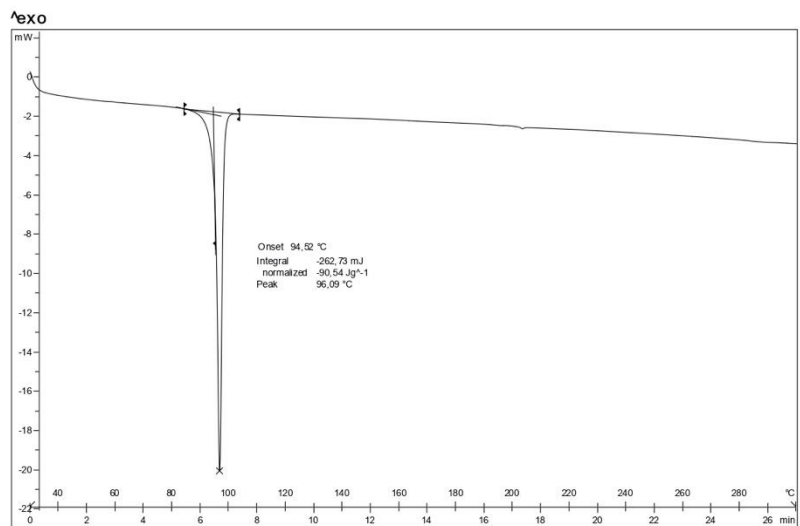
Structure	Form I	Form II	Form III
Empirical formula	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	C ₁₆ H ₁₆ O ₃
Formula Weight	256.3	256.3	256.3
Temperature (K)	298	298	298
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c
a, b, c (Å)	15.4310(9) 5.7893(3) 30.8114(19)	9.5466(3) 4.11726(9) 33.6694(13)	15.7225(8) 11.0550(5) 7.6201(3)
β (°)	93.277(2)	93.162(2)	94.025(2)
Volume (Å ³)	2748.0(3)	1321.39(7)	1321.20(10)
Z, Density (calc.) (Mg/m ³)	8, 1.250	4, 1.288	4, 1.288
θ range for data collection (°)	1.0 to 40 step 0.026 (2θ)	2.0 to 75 step 0.026 (2θ)	2.0 to 65 step 0.026 (2θ)
Refinement method	Rietveld	Rietveld	Rietveld
Final R indices [I > 2σ(I)]	R _{wp} = 10.4 Chi ² = 60.7	R _{wp} = 10.6 Chi ² = 105	R _{wp} = 9.08 Chi ² = 31.2
CCDC	1896241	1896242	1896244

1.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC). Differential scanning calorimetry analysis were carried out by means of a Mettler-Toledo DSC-822e calorimeter. Experimental conditions: aluminium crucibles of 40 µL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 °C/min. The calorimeter was calibrated with indium of 99.99% purity (m.p.: 156.8 °C; ΔH: 28.47 J/g).

1.4 Thermogravimetric Analysis (TGA). Thermogravimetric analyses were performed on a Mettler-Toledo TGA-851e thermobalance. Experimental conditions: alumina crucibles of 70 µL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 °C/min.

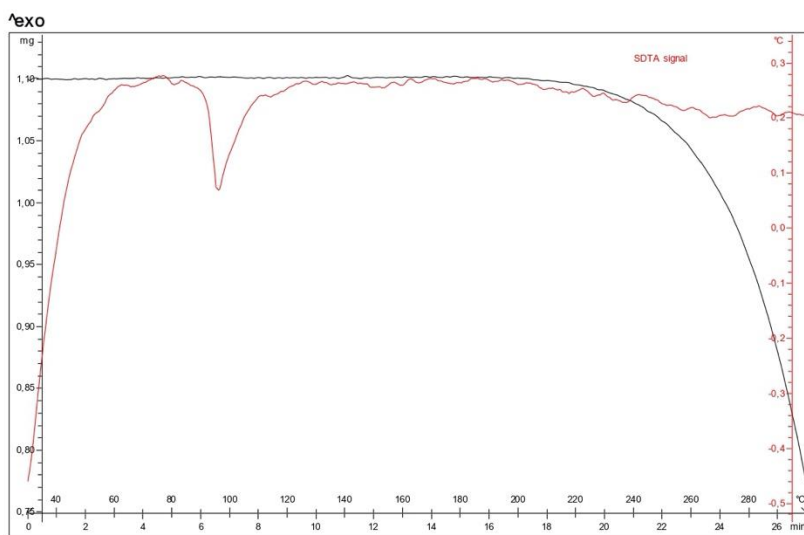
2.- Characterization of the solids

Figure S1: DSC of Form I



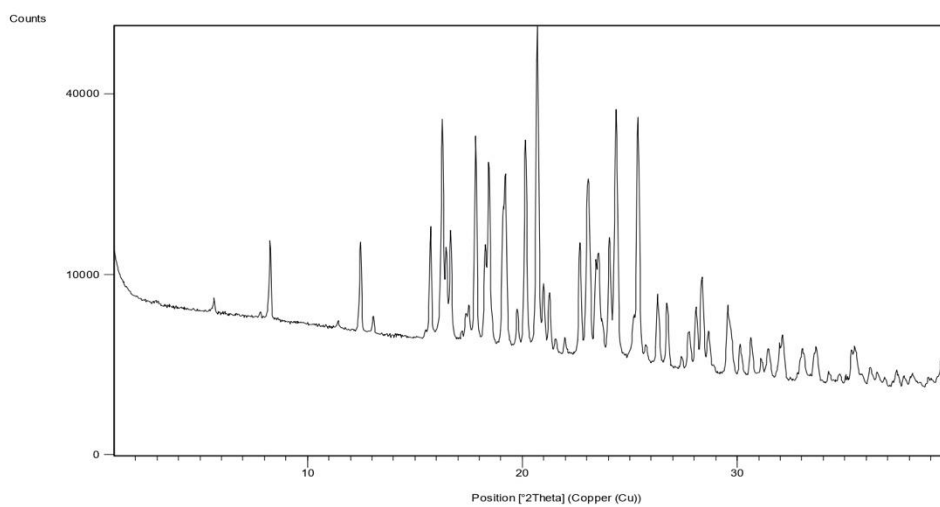
5

Figure S2: TGA Form I



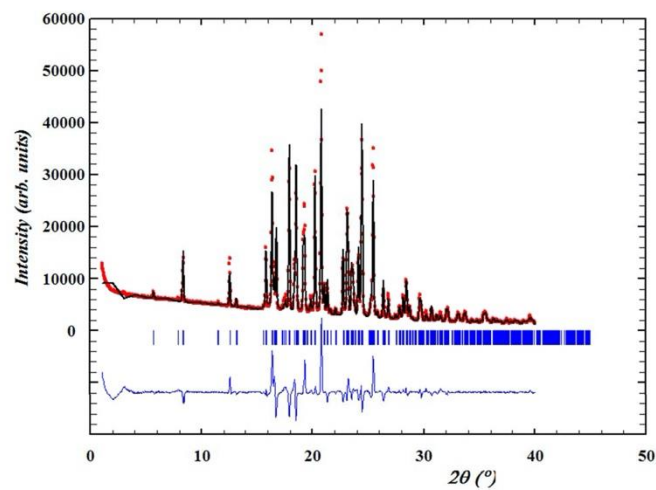
6

Figure S3: PXRD of Form I



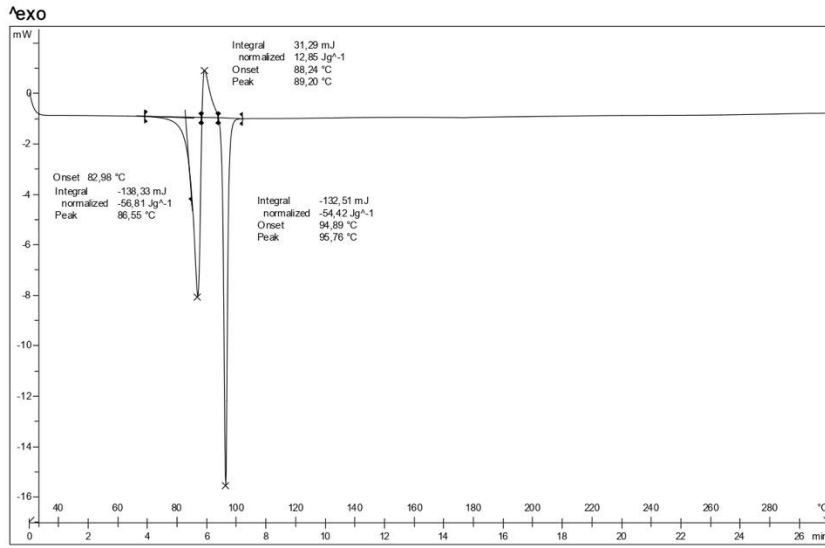
7

Figure S4: The XRPD of Form I has been indexed with the following proposed monoclinic cell: $a=15.4310(9)$ Å, $b=5.7893(3)$ Å, $c=30.8114(19)$ Å, $\beta=93.277(2)^\circ$, $V=2748(3)$ Å³ ($R_{wp}=10.4$), a $P2_1/c$ space group is compatible with the cell.



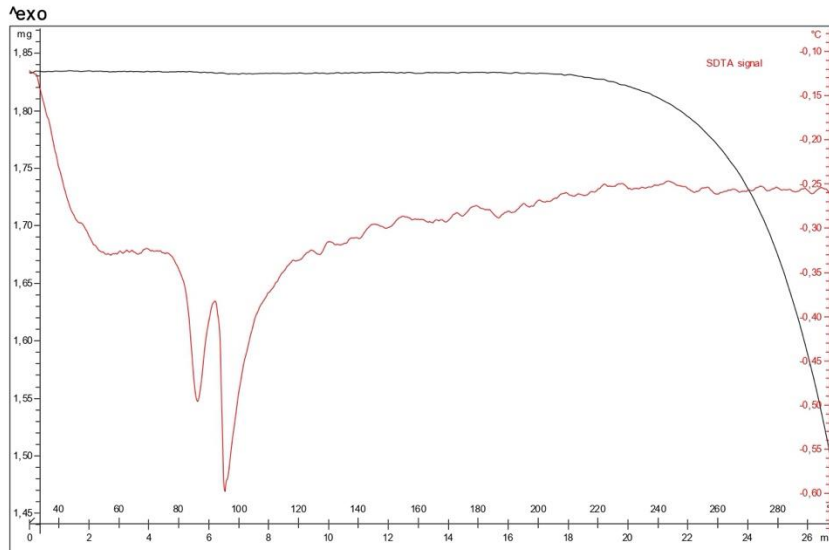
8

Figure S5: DSC of Form II



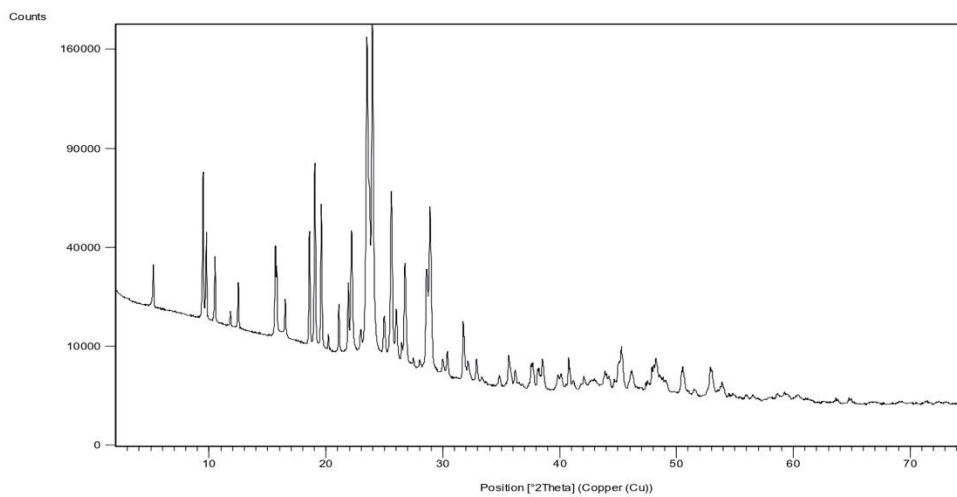
9

Figure S6: TGA Form II



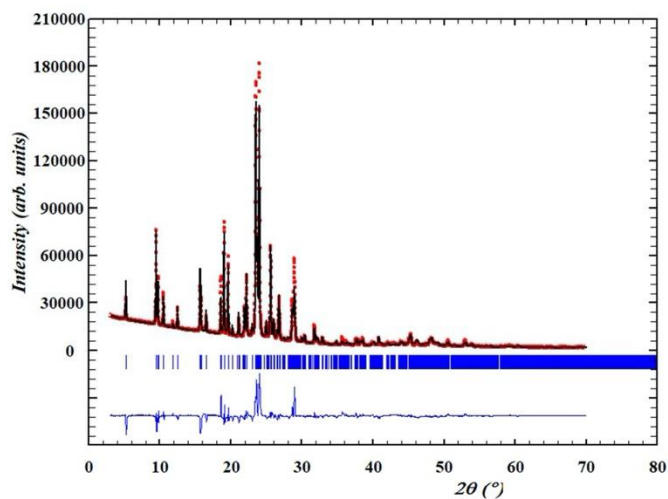
10

Figure S7: PXRD of Form II



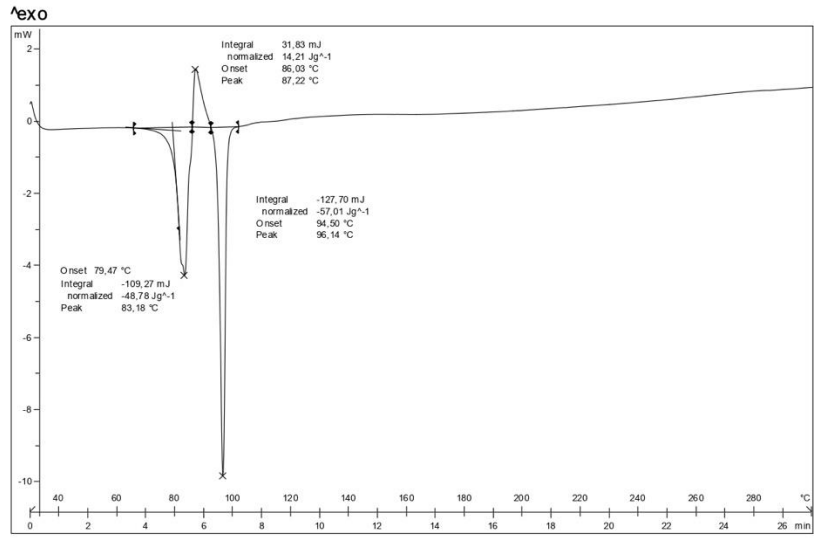
11

Figure S8: The XRPD of Form II has been indexed with the following proposed monoclinic cell: $a=33.6698(13)$ Å, $b=4.11759(9)$ Å, $c=9.54694(3)$ Å, $\beta=93.1620(2)^\circ$, $V=1321(7)$ Å³ ($R_{wp}=10.6$), a $P2_1/n$ space group is compatible with the cell



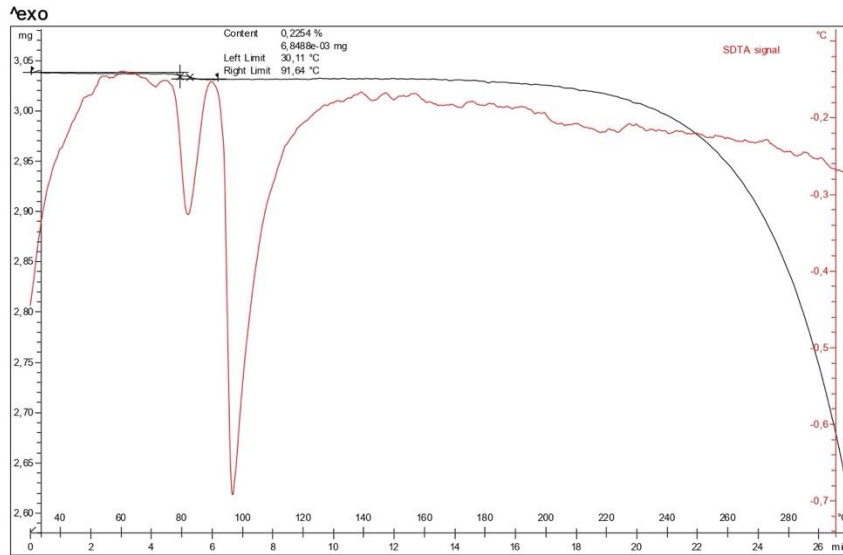
12

Figure S9: DSC Form III



13

Figure S10: TGA Form III



14

Figure S11: PXRD of Form III

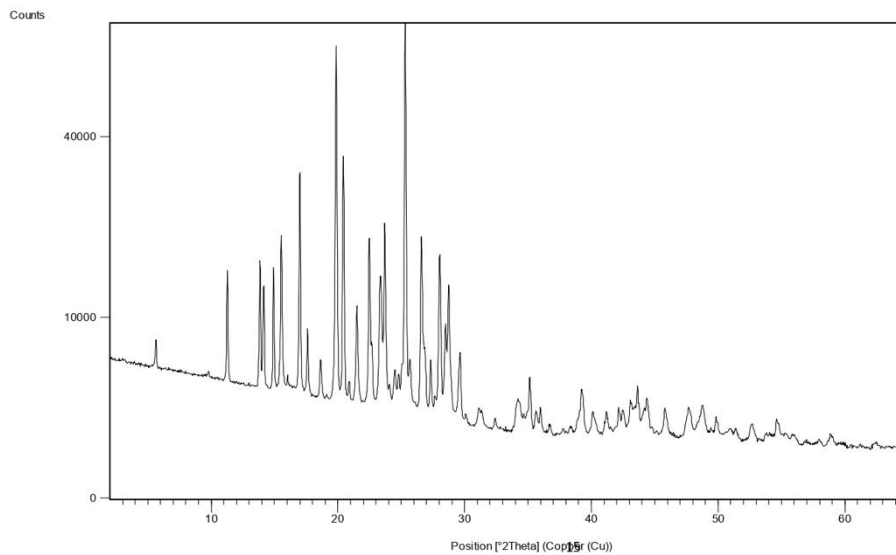


Figure S12: The XRPD of Form III has been indexed with the following proposed monoclinic cell: $a=15.7225(8)$ Å, $b=11.0550(5)$ Å, $c=7.6201(3)$ Å, $\beta=94.025(2)^\circ$, $V=1321.20(10)$ Å³ ($R_{wp}=9.07$), a $P2_1/c$ space group is compatible with the cell

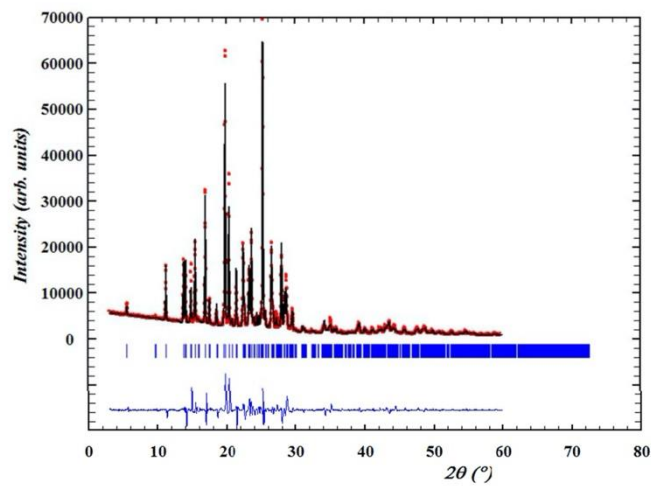
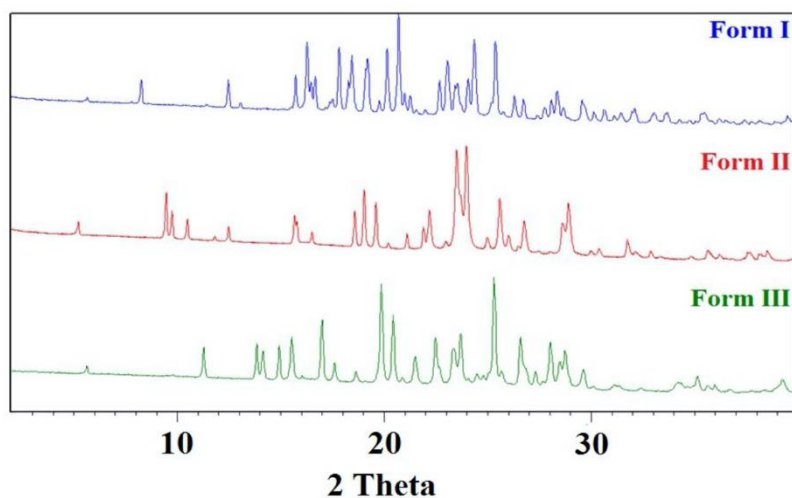


Figure S13: Comparison of the PXRD patterns of Pterostilbene forms: from 2 to 40 (2θ)



17

Table S4. H-bond parameters of the terminal unit (donor or acceptor) in the aggregates of the three polymorphs of pterostilbene and product of the H-bond parameters ($\alpha\beta$) for the monomer (N=1) to the tetramer (N=4) in the H-bonded aggregates of the three polymorphs of pterostilbene. The α value corresponds to the phenol hydrogen in all three forms but the β value corresponds to the phenol oxygen in form I but to the methoxy oxygen in forms II and III.

Form I				Form II				Form III			
N	α	β	$\alpha\beta$	N	α	β	$\alpha\beta$	N	α	β	$\alpha\beta$
1	3,56	4,06	14.4	1	3,50	3,70	12.9	1	3,50	3,93	13.8
2	4,47	6,11	27.3	2	3,00	3,72	11.1	2	3,84	4,48	17.2
3	4,74	6,98	33.1	3	2,93	4,00	11.7	3	4,04	4,71	19.0
4	4,60	7,24	33.3	4	2,84	4,07	11.6	4	4,11	4,87	20.0

18

3.- References

1. A. Boulouf and D. Louër, *J. Appl. Crystallogr.* 1991, **24**, 987-993.
2. Spartan'10, version 1.1.0. Wavefunction, Inc. Irvine, CA. 2010.
3. J. Rodríguez-Carvajal, *Physica B.* 1993, **192**, 55-69.

Electronic Supplementary Material (ESI) for CrystEngComm.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

A Late Appearing Polymorph of Nutraceutical Pterostilbene

Lidia Bofill,^a Dafne de Sande,^b Rafael Barbas,^b Antonio Frontera^c and Rafel Prohens*^b*

^a Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L. Palma de Mallorca, Spain

^b Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain.

^c Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Crta de Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain.

Electronic Supplementary Information

Table of contents:

1. Experimental methods	2
2. Characterization of the new Pterostilbene polymorph (Form IV).....	4
3. DSC thermograms of the other Pterostilbene polymorphs.....	5
4. Crystal data and structure refinement.....	7
5. Morphologies predictions of Pterostilbene crystal forms.....	8
6. Theoretical Methods.....	13
7. References.....	14

1. Experimental methods

1.1. Synthesis of Pterostilbene (Form IV)

Synthesis of the new anhydrous form IV of Pterostilbene was conducted by liquid assisted grinding and crystallization methodologies. Details of synthesis are as follows:

Bulk powder

Pterostilbene (Form II) (20 mg, 0.0780 mmol) and acetone (one drop) were grinded using a Retsch MM 2000 grinding mill. The sample was placed in 2 mL volume stainless steel jars, along with two stainless tungsten grinding balls of 3 mm diameter. Grinding was performed for 15 minutes, with a mill frequency of 30 Hz at 25 °C. The sample was collected immediately without prior drying for PXRD analysis. The formation of a new solid form (Form IV) was confirmed by comparison of PXRD patterns of Pterostilbene polymorphs (Forms I, II and III).

Single crystal

Pterostilbene Form IV (50 mg, 0.195 mmol) was dissolved in toluene (0.7 mL) at 90 °C. Then, the solution was kept sealed and allowed to cool down to room temperature. After 57 days, the obtained crystals were analyzed by single crystal X-ray diffraction.

1.2. X-ray crystallographic analysis.

Powder X-ray diffraction pattern of Pterostilbene Form IV was obtained on a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer in transmission configuration using Cu K α 1+2 radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) with a focalizing elliptic mirror and a PIXcel detector working at a maximum detector's active length of 3.347°. Configuration of convergent beam with a focalizing mirror and a transmission geometry with flat sample sandwiched between low absorbing films measuring from 1 to 40 ° in 2 θ , with a step size of 0.026° and a total measuring time of 30 minutes.

1.3 Single X-ray crystallographic analysis

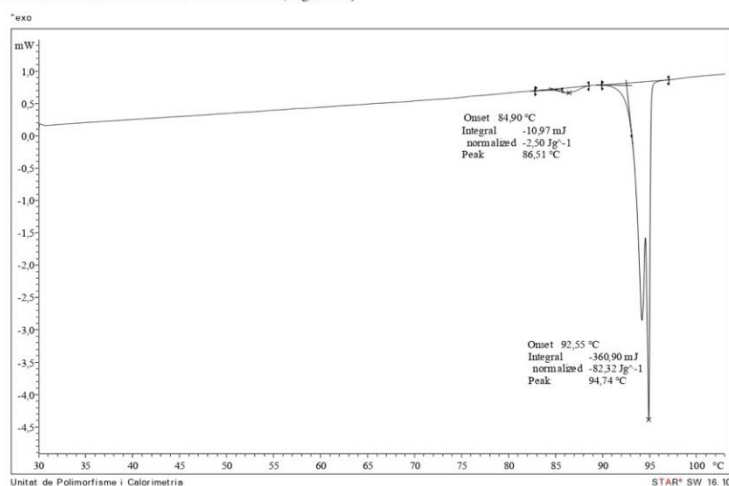
Single crystal X-ray diffraction (SCXRD) intensity data of the crystal form of Pterostilbene (Form IV) was collected using a D8 Venture system equipped with a multilayer monochromator and a Mo microfocus ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a SAINT algorithm. Data were corrected for absorption effects using the multi-scan method (SADABS).¹ The structure was solved and refined using the Bruker SHELXTL Software Package, a computer program for automatic solution of crystal structures and refined by full-matrix least-squares method with ShelXle Version 4.8.0, a Qt graphical user interface for SHELXL computer program.²

1.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC). Differential scanning calorimetry analysis was carried out by means of a Mettler-Toledo DSC-822e calorimeter. Experimental conditions: aluminum crucibles of 40 μL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The calorimeter was calibrated with indium of 99.99% purity (m.p.: 156.8 $^{\circ}\text{C}$; ΔH : 28.47 J/g).

3

2.- Characterization of the new Pterostilbene polymorph (Form IV)

Figure S1: DSC of Form IV: DSC analysis shows a first endothermic phenomenon starting at 84.9 $^{\circ}\text{C}$ with an associated heat of 2.5 J/g and a second endothermic phenomenon (overlapping of two phenomena) starting at 92.5 $^{\circ}\text{C}$ with an associated heat of 82.3 J/g. First phenomenon suggests an endothermic polymorph transition between Form IV and presumably Form I which melts approximately at 93 $^{\circ}\text{C}$ (in concordance with DSC reported for Form I from the reference 4 of the article, figure S2)



4

3. DSC thermograms of the other Pterostilbene polymorphs

Figure S2: DSC of Form I

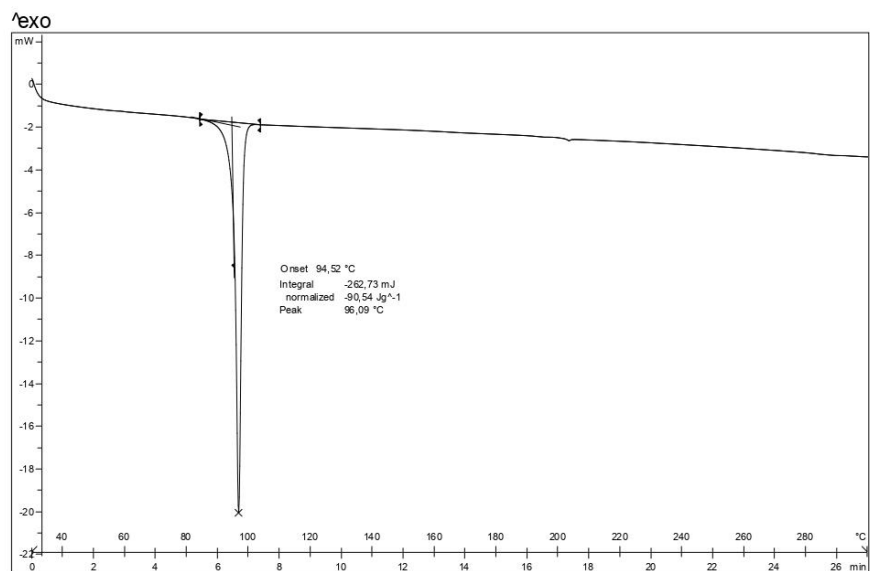


Figure S3: DSC of Form II

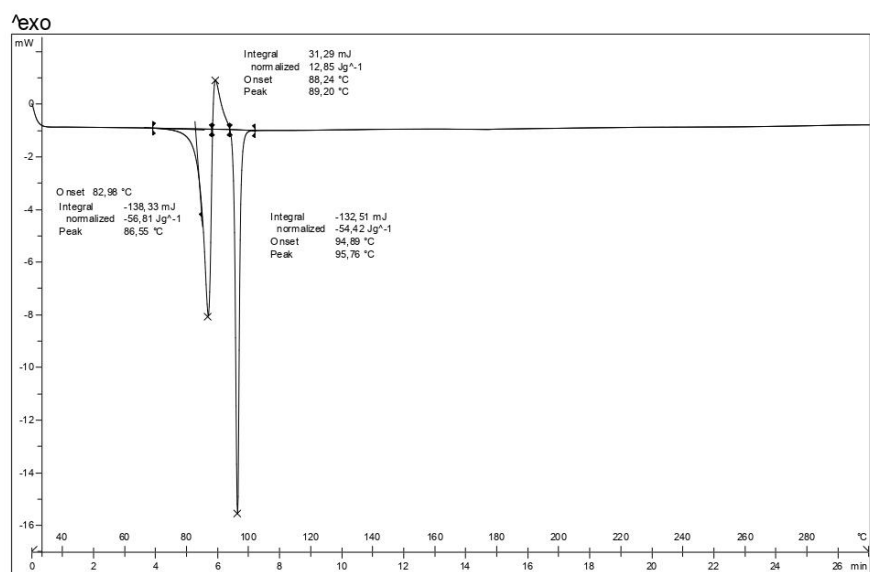
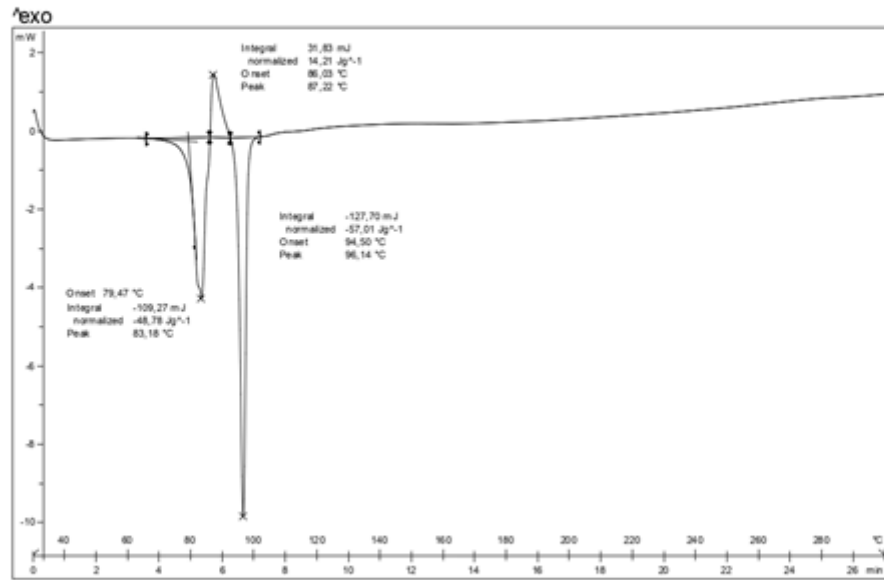


Figure S4: DSC of Form III



4.- Crystal data and structure refinement

4.1 Pterostilbene Form IV (mo_023XB92_0m_a): 1986003

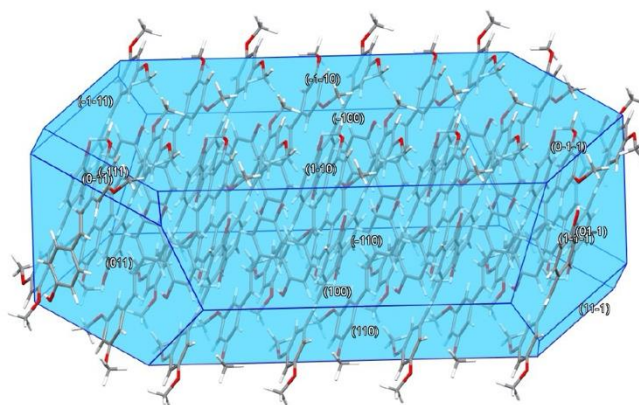
Table S1. Crystal data and structure refinement for mo_023XB92_0m_a.

Identification code	mo_023XB92_0m_a		
Empirical formula	C ₁₆ H ₁₆ O ₃		
Formula weight	256.29		
Temperature	298(2) K		
Wavelength	0.71073 Å		
Crystal system	Monoclinic		
Space group	C 2/c		
Unit cell dimensions	a = 17.282(10) Å	α = 90°.	
	b = 7.629(4) Å	β = 98.812(17)°.	
	c = 41.71(2) Å	γ = 90°.	
Volume	543.5(5) Å ³		
Z	16		
Density (calculated)	1.253 Mg/m ³		
Absorption coefficient	0.086 mm ⁻¹		
F(000)	2176		
Crystal size	0.305 x 0.192 x 0.106 mm ³		
Theta range for data collection	2.385 to 26.423°.		
Index ranges	-21 ≤ h ≤ 21, -9 ≤ k ≤ 9, -52 ≤ l ≤ 52		
Reflections collected	31746		
Independent reflections	5555 [R(int) = 0.0498]		
Completeness to theta = 25.242°	99.8 %		
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents		
Max. and min. transmission	0.7454 and 0.6692		
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²		
Data / restraints / parameters	5555 / 1 / 351		
Goodness-of-fit on F ²	1.063		
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0489, wR2 = 0.1029		
R indices (all data)	R1 = 0.0746, wR2 = 0.1173		
Extinction coefficient	n/a		
Largest diff. peak and hole	0.282 and -0.163 e.Å ⁻³		

Table S2. Hydrogens bonds for mo_023XB92_0m_a [Å and °]

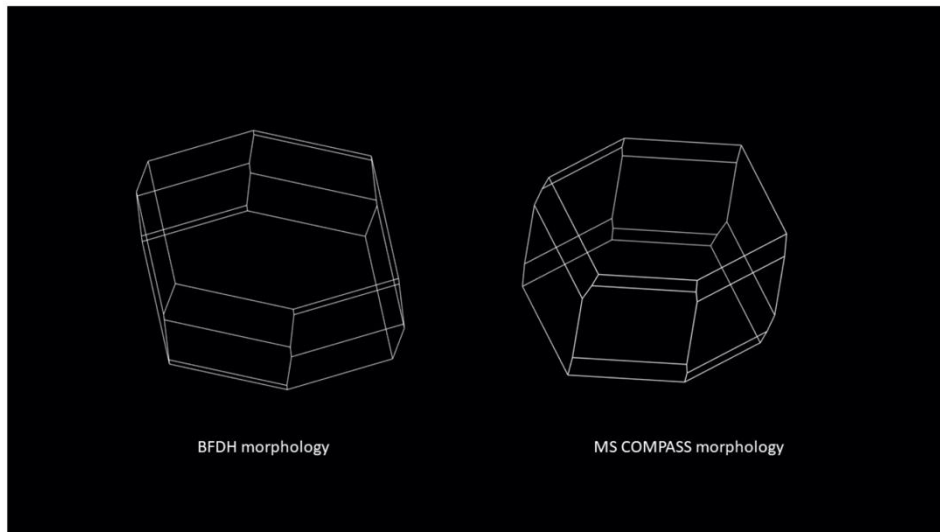
Res Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D-H...A)
O(1A) --H(1A)...O(2B)	[]	0.87(3)	1.93(2)	2.773(3)	163.8(16)
O(1B) --H(1B)...O(2A)	[1/2+x, 1/2-y, -1/2+z]	0.90(2)	1.97(3)	2.857(3)	166(2)

5.3. BFDH morphology prediction of Pterostilbene (Form III)



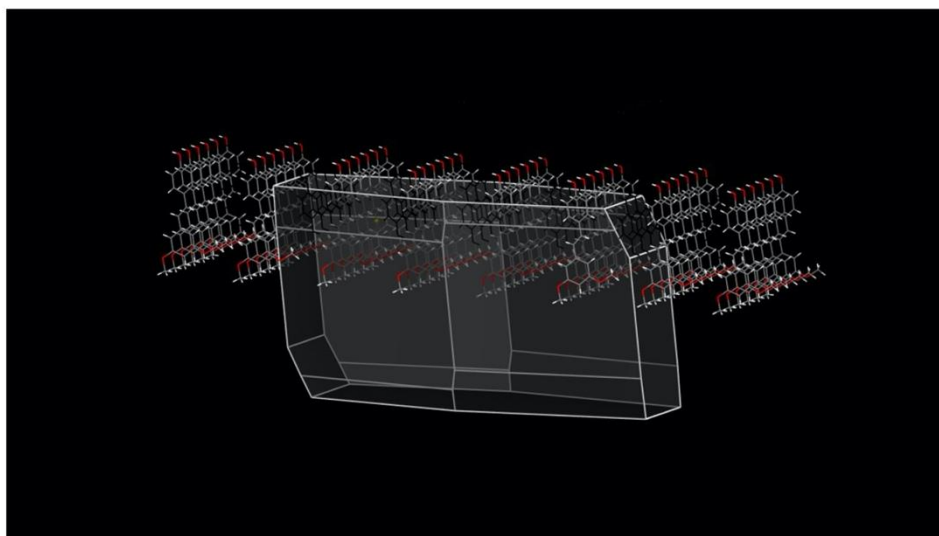
10

5.4 Comparative of Pterostilbene (Form IV) morphologies: BFDH morphology (left) and MS COMPASS morphology (right)



11

5.5 Pterostilbene (Form IV) MS COMPASS morphology prediction: It shows Pterostilbene molecules with the phenol groups pointing out of the surface in a similar way as BFDH morphology prediction



12

6. Theoretical methods

All DFT calculations were carried out using the Gaussian-16 program³ at the PBE1PBE⁴-D3⁵/def2-TZVP⁶ level of theory and using the crystallographic coordinates, unless otherwise noted. For instance, the isomers A and B of Figure 5 (main text) have been fully optimized. The formation energies of the assemblies have been evaluated by calculating the difference between the total energy of the assembly and the sum of the monomers that constitute the assembly, which have been maintained frozen. The molecular electrostatic potential was computed at the same level of theory and plotted onto the 0.001 a.u. isosurface, and Atoms-in-Molecules (AIM)⁷ analysis was carried out at the same level of theory. The calculation of AIM properties was done using the AIMAll program and the same level of theory.⁸

13

7. References

- [1]. SADABS Bruker AXS; Madison, Wisconsin, USA, 2004; SAINT, Software Users Guide, Version 6.0; Bruker Analytical X-ray Systems: Madison, WI, 1999. Sheldrick, G. M. SADABS v2.03; Area-Detector Absorption Correction; University of Göttingen: Germany, 1999. Saint, Version 7.60A; Bruker AXS 2008; SADABS, V. 2008-1, 2008.
- [2]. G. M. A. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A.*, 2008, **64**, 112–122.
- [3]. Gaussian 16, Revision A.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [4]. C. Adamo, V. Barone. *J. Chem. Phys.* 1999, **110**, 6158–6170.
- [5]. S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, et al., *J. Chem. Phys.* 2010, **132**, Art. Nr: 154104.
- [6]. a) F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, **7**, 3297-3305; b) F. Weigend, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, **8**, 1057-1065.
- [7]. R. F. W. Bader, *Acc. Chem. Res.* 1985, **18**, 9-15
- [8]. Keith, T. A. AIMAll (Version 13.05.06), TK Gristmill Software, Overland Park, KS, 2013.

A Novel Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene

Lidia Bofill,^a Rafael Barbas,^b Dafne de Sande,^b Mercè Font-Bardia,^c Clara Ràfols,^d Joan Albertí,^a and Rafel Prohens*^{a,b}

a. Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac, 4-8, 08028, Barcelona, Spain.

b. Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

c. Unitat de Difracció de Raigs X, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Spain

d. Departament de Enginyeria Química i Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

Electronic Supplementary Information

Table of contents:

1. Experimental.....	2
2. Synthesis of the different crystal forms.....	4
3. Crystal data and structure refinement.....	7
4. Characterization of the solids.....	11
5. References.....	40

1. Experimental: materials and methods

1.1 Materials

Pterostilbene used in this study was purchased from Dynveo. Details of its purification have been reported previously by some of us.¹ According to its purification procedure, pure pterostilbene anhydrous form II was obtained with a suitable purity.

The following 56 cofomers have been used and two additional cofomers have been considered after the qualitative solubility experimental results (acetic acid and formic acid): acetic acid, formic acid, propionic acid, lactic acid, pyruvic acid, malic acid, succinic acid, fumaric acid, citric acid, 2-picolinic acid (PA), gallic acid, glutamic acid, 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid, nicotinic acid, L-ascorbic acid, 4'-hydroxy-4-biphenylcarboxylic acid, indole-2-carboxylic acid, orotic acid, orcinol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, glutamine, L-arginine, theobromine, theophylline, 1,4-dimethylpiperazine, L-cystine, ethylenediamine, piperazine, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 3-ethylpyridine, isoquinoline, pyrrolidine, L-leucine, L-lysine, 2,3,5-trimethylpyrazine, indole, 1-methyl-2-pyrrolidone, glycine, 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, N-benzyl-2-phenethylamine, 2,2-dibromo-2-cyanoacetamide, piperine, 5-ethyl-2-methylpyridine, N, N'-dibenzylethylenediamine, piperidine, 1-methylimidazole, 1-10-phenanthroline, urea, dimethyl sulfone and acesulfame K.

The cofomers were purchased from Sigma-Aldrich except propionic acid, which was purchased from Reidel-de Haën.

1.2. Solubility qualitative determination of pterostilbene form II

The solvents selected to be used in the cocrystal screening are highlighted in black.

Pterostilbene (form II) was dissolved in 30 solvents in a temperature range of 25-90 °C. Pterostilbene is soluble at 25 °C in the following solvents: **methanol** (0.05 mL), **ethanol** (0.05 mL), **IPA** (0.05 mL), **butanol** (0.05 mL), **ethylene glycol** (0.1 mL), **formic acid** (0.1 mL), **ACN** (0.05 mL), **MEK** (0.05 mL), **acetone** (0.05 mL), **MiBK** (0.05 mL), **DMF** (0.05 mL), **DMSO** (0.05 mL), **toluene** (0.2 mL), **xylene** (0.3 mL), **AcOEt** (0.05 mL), **diethyl ether** (0.05 mL), **THF** (0.05 mL), **dimethyl ethylene glycol** (0.05 mL), **diisopropyl ether** (0.05 mL), **dioxane** (0.05 mL), **dichloromethane** (0.05 mL), **chloroform** (0.05 mL), **acetic acid** (0.05 mL), **benzyl alcohol** (0.2 mL) and diethylamine (0.05 mL). At 90 °C it is partially soluble in **cyclohexane** (2.0 mL). It is insoluble in **water**, **pentane**, **heptane**, and NH₃ (32 %) in water.

Table S1. Cocrystal screening of Pterostilbene

Methodology	Cofomers	N° Experiments	N° Solids	Positive results ^a	Cofomers	Form obtained (according to PXRD)
Solubility Study	-	30	27	-	-	Pterostilbene anhydrous forms (I, II and III)
Net grinding at 25 °C	9	9	9	1 / 2	2 / 1	2 new evidences and Pterostilbene-Ethylenediamine I
Liquid assisted grinding at 25 °C	49	262	262	1	37	37 new evidences
Reaction Crystallization at 25 °C	37 ^b	244	244	1 / 2	1 / 4	Pterostilbene-Picolinic acid Pterostilbene-DABCO Pterostilbene-1,4,8,11-Tetraacyclotetradecane Pterostilbene-Theophylline-DCM
Solvent mediated transformation at 25 °C	5	8	8	2	3	Pterostilbene-Ethylenediamine-H ₂ O II Pterostilbene-1,4-Dimethylpiperazine Pterostilbene-2,3,5-Trimethylpyrazine
Solution crystallization at different temperatures	9	70	35	3	6	Pterostilbene-Ethylenediamine I Pterostilbene-DABCO Pterostilbene-1,4,8,11-Tetraacyclotetradecane Pterostilbene-1,4-Dimethylpiperazine Pterostilbene-Theophylline-DCM Pterostilbene-2,3,5-Trimethylpyrazine
Preparation of the solid forms: scale up batches	3	11	11	2	3	Pterostilbene-Picolinic acid Pterostilbene-Ethylenediamine-H ₂ O II Pterostilbene-Ethylenediamine I

^a (1) positive: Pterostilbene + cofomer + new peaks observed in PXRD, (2) positive: cocrystal, (3) single crystal

^b The following 37 cofomers have been tested through reaction crystallization methodology: acetic acid, formic acid, lactic acid, pyruvic acid, fumaric acid, 2-picolinic acid (PA), gallic acid, glutamic acid, 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, nicotinic acid, L-ascorbic acid, 4'-hydroxy-4-biphenylcarboxylic acid, orotic acid, orcinol, resorcinol, philoroglucinol, L-arginine, theobromine, theophylline, 1,4-dimethylpiperazine, L-cystine, ethylenediamine, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), L-leucine, L-lysine, 2,3,5-trimethylpyrazine, indole, glycine, 1,4,8,11-tetraacyclotetradecane, 1-10-phenanthroline, urea and aceulfame K.

2. Synthesis of Pterostilbene cocrystals

Synthesis of the new multicomponent forms of Pterostilbene were conducted by solvent mediated transformation (SMT), reaction crystallization (RC) or solution crystallization methodologies. Stoichiometry has been assessed based on NMR and TGA measurements when the crystal structure was not available. Details of synthesis of the bulk powder and single crystal are as follows:

2.1 Pterostilbene – picolinic acid cocrystal (I) (1:1)

Bulk powder

Pterostilbene (300.0 mg, 1.17 mmol) was dissolved in toluene (1.5 mL) at 60 °C. Then, picolinic acid (97.5 mg, 0.79 mmol) was added and the mixture was stirred 3 hours at 25 °C. The resulting suspension was filtered and dried under vacuum

2.2 Pterostilbene - ethylenediamine cocrystal (I) (2:1)

Bulk powder

Pterostilbene (50 mg, 0.195 mmol) was dissolved in ethylenediamine (0.05 mL) at 50 °C. Then, the mixture was slowly cooled down to 25 °C and it was kept sealed at 25 °C. After 5 days, the mixture crystallized and it was filtered and dried under vacuum.

Single crystal

Pterostilbene (50 mg, 0.195 mmol) and ethylenediamine (1 drop) were mixed and dissolved in dichloromethane (2.0 mL) at 25 °C. A single crystal was observed after 35 days.

2.3 Pterostilbene - ethylenediamine hydrate cocrystal (II) (2:1:2)

Bulk powder

Pterostilbene (162 mg, 0.632 mmol) and ethylenediamine (2 mL) were mixed and stirred overnight at 25 °C. The resulting suspension was filtered and dried under vacuum.

2.4 Pterostilbene – DABCO (2:1)

Bulk powder

DABCO (100.0 mg, 0.892 mmol) was dissolved in xylene (1.5 mL) at 50 °C. Then, the solution was slowly cooled down to 25 °C and pterostilbene (197.1 mg, 0.769 mmol) was added and the mixture was stirred overnight. The resulting suspension was filtered and dried under vacuum.

Single crystal

Pterostilbene (50 mg, 0.195 mmol) and DABCO (10.94 mg, 0.0975 mmol) were dissolved in xylene (1.2 mL) at 60 °C. Then, the mixture was slowly cooled down to 25 °C and it was kept sealed at 25 °C. A single crystal was observed after 35 days.

2.5 Pterostilbene - 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane cocrystal (2:1)

Bulk powder mixed with single crystal

Pterostilbene (50 mg, 0.195 mmol) and 1,4,8,11-tetraazacyclohexadecane (20 mg, 0.0998 mmol) were mixed and dissolved in chloroform (0.3 mL) at 25 °C. Then, the solution was kept sealed at 25 °C. After 35 days, the obtained crystals were filtered and dried under vacuum.

2.6 Pterostilbene - 1,4-dimethylpiperazine cocrystal (2:1)

Bulk powder

Pterostilbene (97.6 mg, 0.381 mmol) and 1,4-dimethylpiperazine (0.3 mL) were mixed and stirred overnight at 25 °C. The resulting suspension was filtered and dried under vacuum.

Single crystal

Pterostilbene (50 mg, 0.195 mmol) and 1,4-dimethylpiperazine (1 drop) were mixed and dissolved in ACN (0.3 mL) at 25 °C. Then, the solution was kept sealed at 25 °C. A single crystal was observed after 35 days.

2.7 Pterostilbene - theophylline dichloromethane solvate cocrystal (1:1:1)

Bulk powder

Pterostilbene (113 mg, 0.441 mmol) was dissolved in dichloromethane (0.2 mL) at 25 °C. Then, theophylline (20 mg, 0.111 mmol) was added and the resulting suspension was stirred overnight and it was filtered and dried under vacuum.

Single crystal

A solution of pterostilbene and theophylline in a 1:1 molar ratio (20 mg of the final mixture) in dichloromethane (1.5 mL) was prepared at 25 °C. Then, the solution was tightly sealed and kept at 25 °C. A single crystal was observed after 33 days.

2.8 Pterostilbene - 2,3,5-trimethylpirazine cocystal (2:1)

Bulk powder

Pterostilbene (61.3 mg, 0.239 mmol) and 2,3,5-trimethylpirazine (0.05 mL) were mixed and stirred overnight at 25 °C. The resulting suspension was filtered and dried under vacuum.

Single crystal

Pterostilbene (1107.2 mg, 4.32 mmol) and 2,3,5-trimethylpirazine (1.5 mL) were mixed and formed a liquid. Then, it was kept sealed at 4-8 °C. After 35 days, the obtained crystals were filtered and dried under vacuum.

PXRD patterns of the new pterostilbene multicomponent forms are shown in Figure S1.

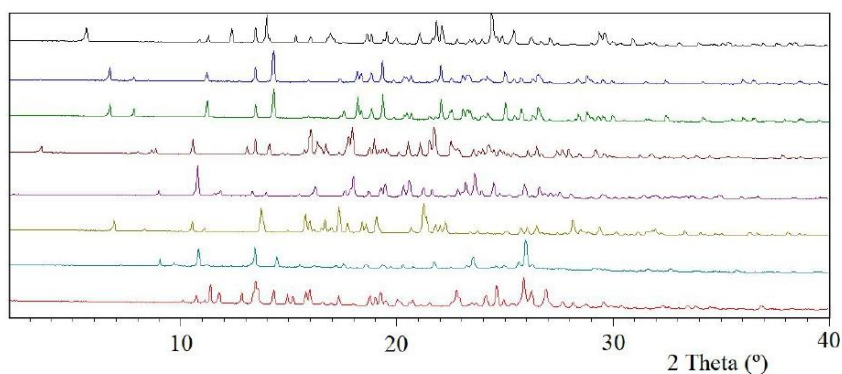


Figure S1: PXRD diagrams of pterostilbene new multicomponent crystal forms with the coformers: picolinic acid (black), ethylenediamine (blue), ethylenediamine-H₂O (green), DABCO (brown), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (purple), 1,4-dimethylpiperazine (olive), theophylline-dichloromethane (teal) and 2,3,5-trimethylpyrazine cocystal (red).

3. Crystal data and structure refinement

3.1 Pterostilbene : Ethylenediamine I (mo_023XB27_0m)

Table S2. Crystal data and structure refinement for mo_023XB27_0m.

Identification code	mo_023XB27_0m	
Empirical formula	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃	
Formula weight	286.34	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21/c	
Unit cell dimensions	a = 11.3119(3) Å	α = 90°.
	b = 5.13890(10) Å	β = 101.0990(10)°.
	c = 26.6010(8) Å	γ = 90°.
Volume	1517.41(7) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.253 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.086 mm ⁻¹	
F(000)	612	
Crystal size	0.198 x 0.094 x 0.040 mm ³	
Theta range for data collection	2.168 to 26.405°.	
Index ranges	-14 ≤ h ≤ 14, -5 ≤ k ≤ 6, -33 ≤ l ≤ 33	
Reflections collected	44966	
Independent reflections	3109 [R(int) = 0.0511]	
Completeness to theta = 25.242°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7454 and 0.7097	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3109 / 0 / 203	
Goodness-of-fit on F ²	1.039	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0375, wR2 = 0.0912	
R indices (all data)	R1 = 0.0488, wR2 = 0.0977	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.205 and -0.257 e.Å ⁻³	

Table S3. Hydrogen bonds for mo_023XB27_0m [Å and °].

Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D-H...A)
N(1) --H(1N) ..O(3)	[2-x, 1/2+y, 1/2-z]	0.922(17)	2.346(16)	3.1626(14)	147.4(13)
O(1) --H(1O) ..N(1)	[]	0.918(16)	1.778(16)	2.6860(14)	169.8(15)
N(1) --H(2N) ..O(1)	[x, -1+y, z]	0.88(2)	2.40(2)	3.1754(14)	146.4(16)

3.2 Pterostilbene : DABCO (mo_023XB28_0ma_a)

Table S4. Crystal data and structure refinement for mo_023XB28_0ma_a.

Identification code	mo_023XB28_0ma_a	
Empirical formula	C ₃₈ H ₄₄ N ₂ O ₆	
Formula weight	624.75	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21/c	
Unit cell dimensions	a = 27.1201(16) Å	α = 90°.
	b = 6.1642(4) Å	β = 112.389(2)°.
	c = 21.6656(13) Å	γ = 90°.
Volume	3348.9(4) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.239 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.083 mm ⁻¹	
F(000)	1336	
Crystal size	0.236 x 0.183 x 0.055 mm ³	
Theta range for data collection	2.033 to 26.536°.	
Index ranges	-33<=h<=33, -7<=k<=7, -27<=l<=27	
Reflections collected	38423	
Independent reflections	6920 [R(int) = 0.0944]	
Completeness to theta = 25.242°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7454 and 0.6843	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	6920 / 7 / 478	
Goodness-of-fit on F ²	1.059	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0779, wR2 = 0.2067	
R indices (all data)	R1 = 0.1331, wR2 = 0.2541	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.802 and -0.463 e.Å ⁻³	

Table S5. Hydrogen bonds for mo_023XB28_0ma_a [Å and °].

Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D - H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D - H...A)
O(1) --H(1O) ..N(2)	[1-x,1/2+y,1/2-z]	0.78(5)	1.93(5)	2.689(4)	165(6)
O(4) --H(4O) ..N(1)	[x,-1+y,z]	0.88(4)	1.86(4)	2.718(4)	167(2)

3.3 Pterostilbene : 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane (mo_023XB19_0m_a)

Table S6. Crystal data and structure refinement for mo_023XB19_0m_a.

Identification code	mo_023XB19_0m_a	
Empirical formula	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃	
Formula weight	356.45	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21/n	
Unit cell dimensions	a = 8.4888(3) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 11.2401(5) Å	$\beta = 95.955(2)^\circ$.
	c = 19.8309(9) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	1881.95(14) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.258 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.084 mm ⁻¹	
F(000)	768	
Crystal size	0.184 x 0.101 x 0.083 mm ³	
Theta range for data collection	2.065 to 30.569°.	
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 9, -16 ≤ k ≤ 16, -28 ≤ l ≤ 28	
Reflections collected	55466	
Independent reflections	5748 [R(int) = 0.0549]	
Completeness to theta = 25.242°	99.7 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7461 and 0.7153	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	5748 / 0 / 247	
Goodness-of-fit on F ²	1.032	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0437, wR2 = 0.1049	
R indices (all data)	R1 = 0.0662, wR2 = 0.1162	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.399 and -0.266 e.Å ⁻³	

Table S7. Hydrogen bonds for mo_023XB19_0m_a [Å and °].

Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D - H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D - H...A)
O(1) --H(1) ..N(1)	[]	0.893(15)	1.832(16)	2.7204(13)	172.9(13)
N(1) --H(1N) ..N(2)	[]	0.920(16)	2.521(16)	2.9155(14)	106.3(11)
N(1) --H(1N) ..N(2)	[-x,-y,1-z]	0.920(16)	2.195(15)	2.9405(13)	137.6(13)
N(2) --H(2N) ..?		0.912(17)			

3.4 Pterostilbene : 1,4-Dimethylpiperazine (mo_023XB97_0m_a)

Table S8. Crystal data and structure refinement for mo_023XB97_0m_a.

Identification code	mo_023XB97_0m_a	
Empirical formula	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₃	
Formula weight	313.38	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21/c	
Unit cell dimensions	a = 10.4766(4) Å	α = 90°.
	b = 6.6402(3) Å	β = 93.391(2)°.
	c = 25.5452(12) Å	γ = 90°.
Volume	1773.98(13) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.173 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.079 mm ⁻¹	
F(000)	672	
Crystal size	0.269 x 0.218 x 0.194 mm ³	
Theta range for data collection	3.459 to 36.557°.	
Index ranges	-13<=h<=17, -11<=k<=11, -42<=l<=40	
Reflections collected	57614	
Independent reflections	8593 [R(int) = 0.0396]	
Completeness to theta = 25.242°	98.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7471 and 0.7031	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	8593 / 0 / 213	
Goodness-of-fit on F ²	1.040	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0475, wR2 = 0.1318	
R indices (all data)	R1 = 0.0617, wR2 = 0.1466	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.741 and -0.211 e.Å ⁻³	

Table S9. Hydrogen bonds for mo_023XB97_0m_a [Å and °].

Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D - H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D - H...A)
O(2) --H(2A) ..N(1)	[]	0.879(12)	1.840(12)	2.7051(8)	167.6(8)

3.5 Pterostilbene : 2,3,5-Trimethylpyrazine (mo_023XB120_0m_a)

Table S10. Crystal data and structure refinement for mo_023XB120_0m_a.

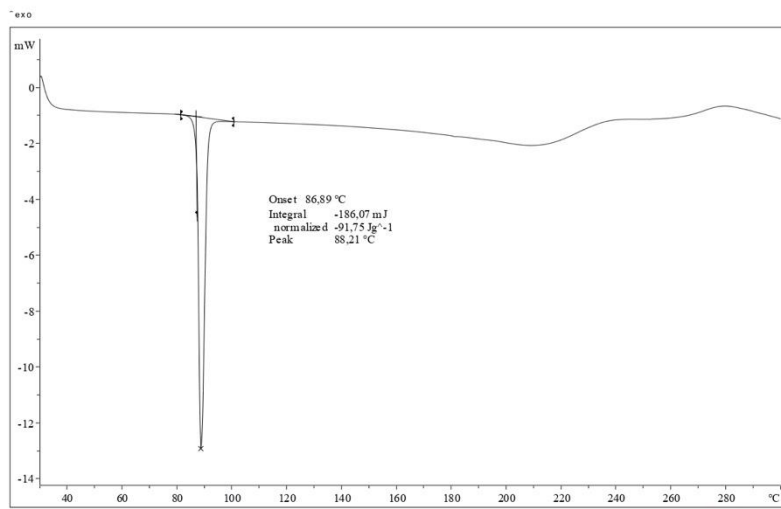
Identification code	mo_023XB120_0m_a	
Empirical formula	C ₃₉ H ₄₂ N ₂ O ₆	
Formula weight	634.74	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P -1	
Unit cell dimensions	a = 7.9098(9) Å	α = 83.699(5)°.
	b = 9.2397(10) Å	β = 88.189(5)°.
	c = 23.359(3) Å	γ = 79.189(5)°.
Volume	1666.6(3) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.265 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.085 mm ⁻¹	
F(000)	676	
Crystal size	0.386 x 0.068 x 0.052 mm ³	
Theta range for data collection	2.333 to 32.124°.	
Index ranges	-11<=h<=11, -13<=k<=13, -34<=l<=34	
Reflections collected	61639	
Independent reflections	11579 [R(int) = 0.0975]	
Completeness to theta = 25.242°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7463 and 0.6969	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	11579 / 0 / 435	
Goodness-of-fit on F ²	1.052	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0759, wR2 = 0.1397	
R indices (all data)	R1 = 0.1271, wR2 = 0.1604	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.408 and -0.289 e.Å ⁻³	

Table S11. Hydrogen bonds for mo_023XB120_0m_a [Å and °].

Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D - H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D - H...A)
O(1) --H(1) ..N(2)	[x, 1+y, z]	0.91(2)	1.85(2)	2.737(2)	163.6(18)
O(4) --H(4) ..N(1)	[x, -1+y, z]	0.82(2)	2.01(2)	2.832(2)	173(2)

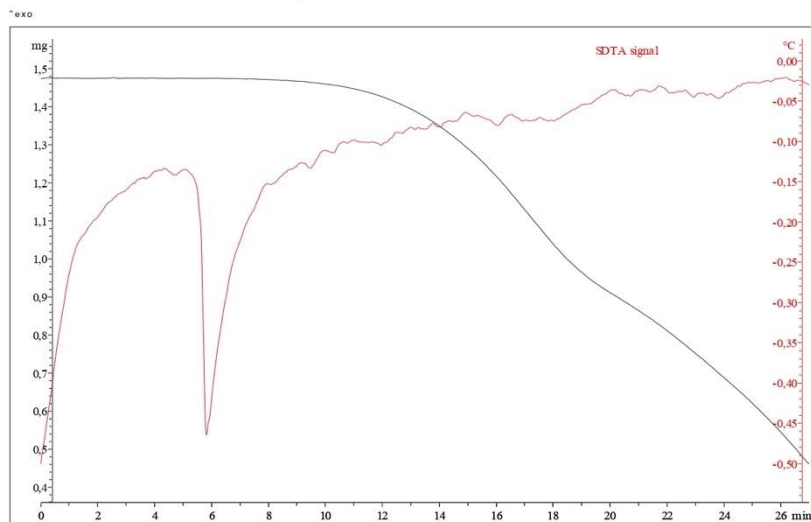
4.- Characterization of the solids

Figure S2: DSC of Pterostilbene-Picolinic acid cocrystal



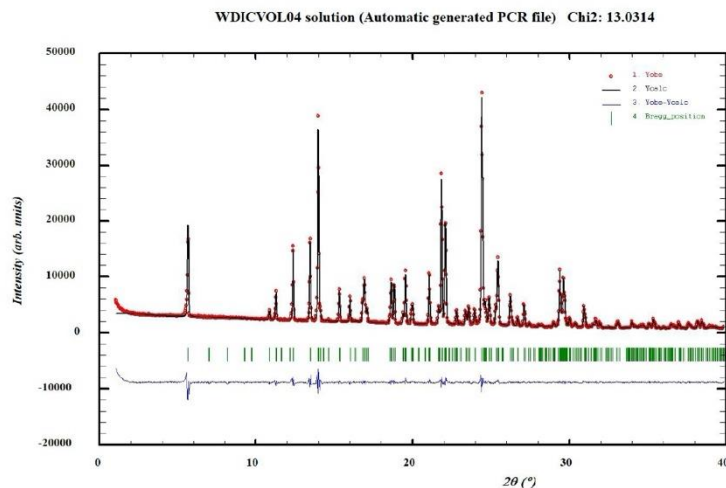
12

Figure S3: TGA of Pterostilbene-Picolinic acid cocrystal



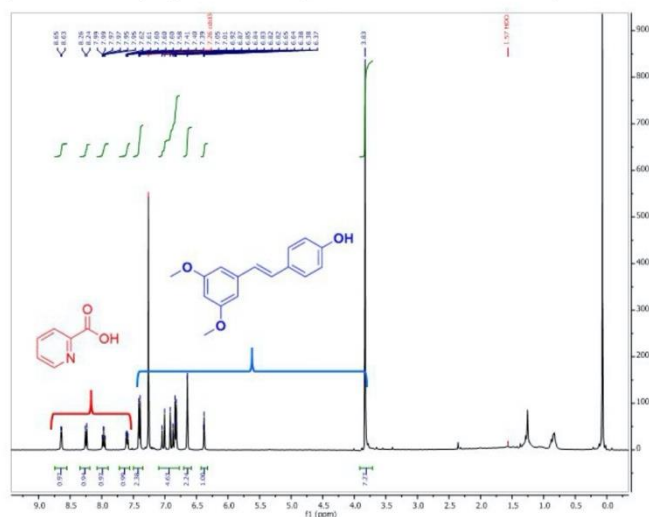
13

Figure S4: The PXRD of Pterostilbene-Picolinic acid cocrystal has been indexed with the following proposed monoclinic cell: $a=15.920(1)$ Å, $b=9.5200(8)$ Å, $c=12.870(1)$ Å, $\beta=100.345(7)^\circ$, $V=1918.7(3)$ Å³ (Figures of Merit: $M=33$, $F=103$), with number of impurities equal to zero. A $P2_1/c$ space group is suggested and the cell volume is compatible with 1 molecule of pterostilbene and 1 molecule of picolinic acid. ($R_{wp}: 6.90$; $R_{exp}: 1.91$). $Z'=1$, $Z=4$.



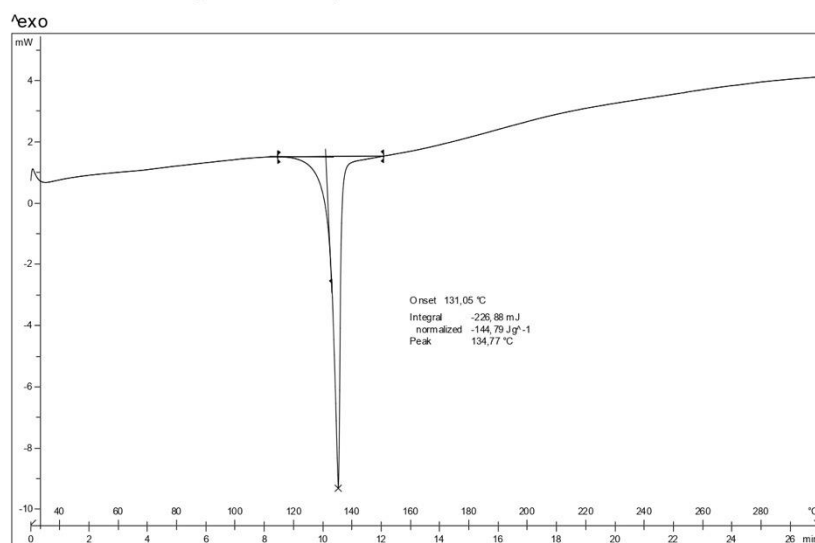
14

Figure S5: ¹H-NMR (chloroform-*d*: delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of Pterostilbene-Picolinic acid cocrystal



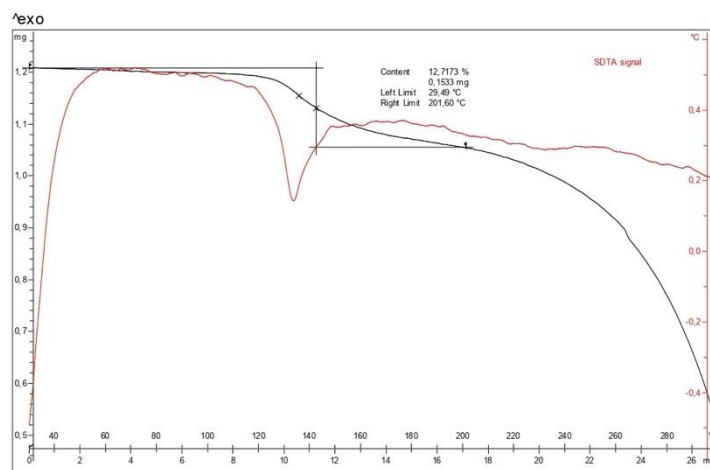
15

Figure S6: DSC of Pterostilbene-Ethylenediamine I cocrystal



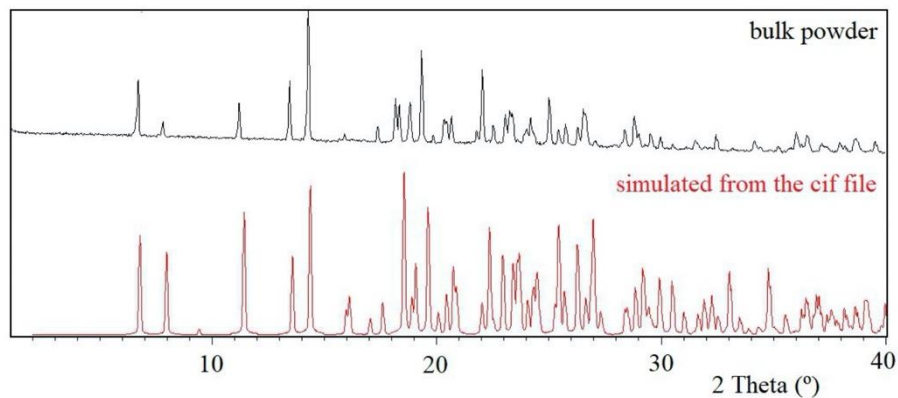
16

Figure S7: TGA of Pterostilbene-Ethylenediamine I cocrystal: a weight loss of 12.7% is detected from 30 °C to 202 °C which could be attributed to 1 molecule of ethylenediamine per 2 molecules of pterostilbene (theoretical weight loss of 9.5%). This weight loss partially corresponds to decomposition on melting (SDTA signal), which explains the higher value with respect to the theoretical one.



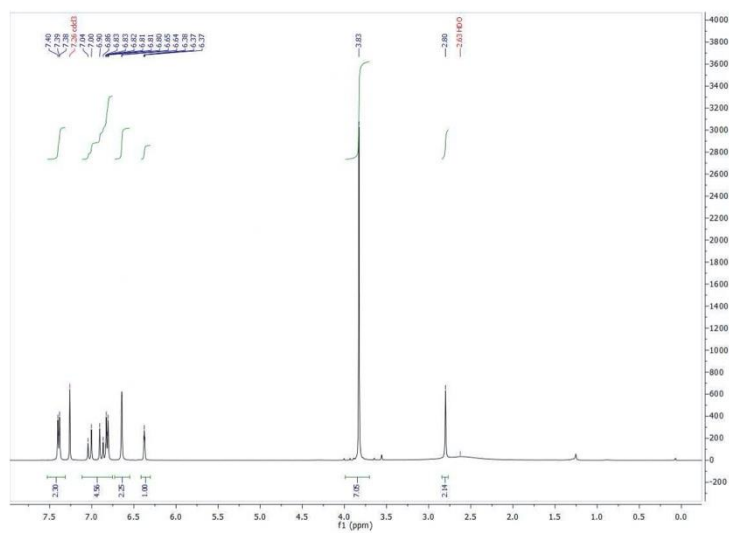
17

Figure S8: Comparative PXRD diffractograms between bulk Pterostilbene-Ethylenediamine I cocrystal (2:1) (black) and simulated from the cif file (red). Differences are due to the thermal dilatation since the crystal structure was solved at 100 K and the PXRD diagram was obtained at 298 K.



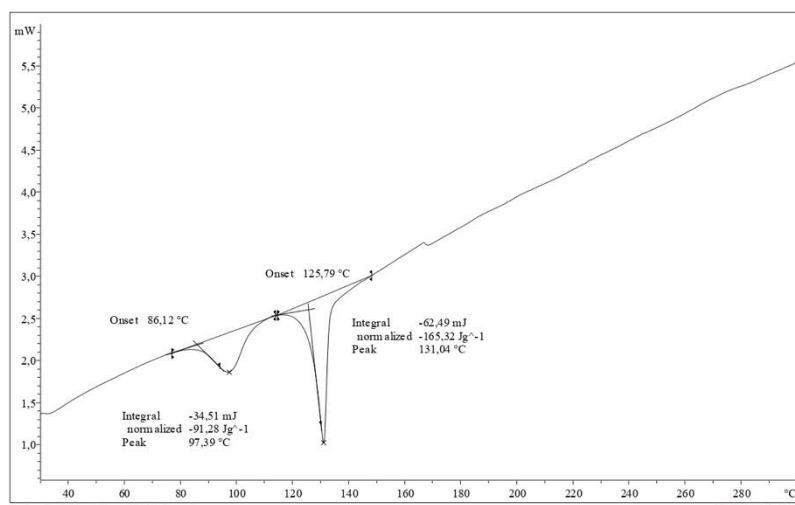
18

Figure S9: ¹H-NMR (chloroform-*d*: delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of Pterostilbene-Ethylenediamine I cocrystal



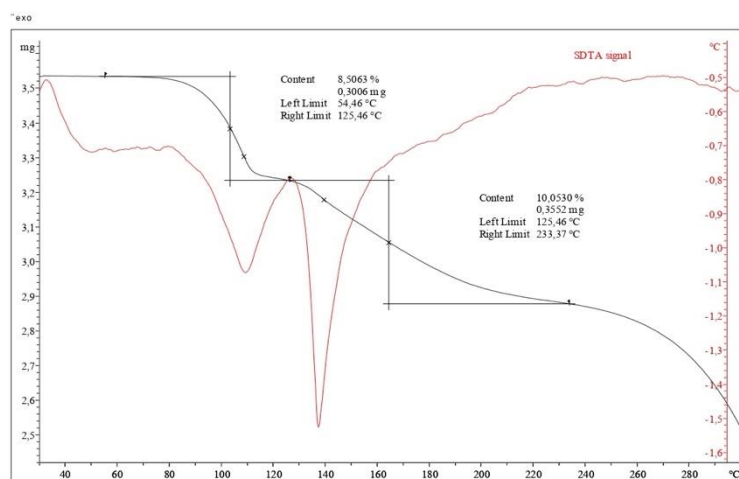
19

Figure S10: DSC of Pterostilbene-Ethylenediamine-H₂O II cocrystal hydrate



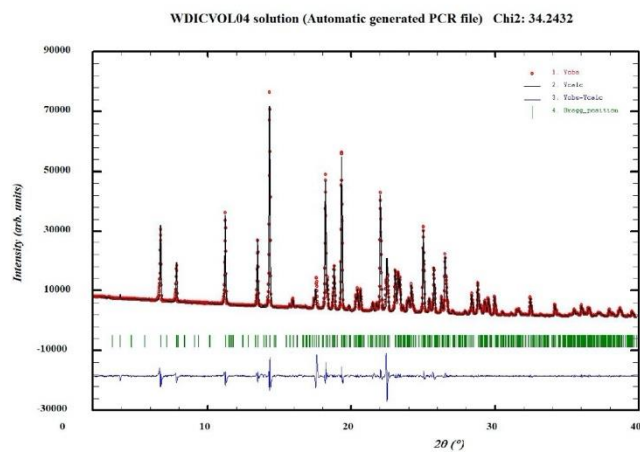
20

Figure S11: TGA of Pterostilbene-Ethylenediamine-H₂O II cocrystal hydrate: a first weight loss of 8.5% is detected from 54 °C to 125 °C and a second weight loss of 10.1% from 125 °C to 233 °C which could be attributed to 2 molecules of water and 1 molecule of ethylenediamine per 2 molecules of pterostilbene (theoretical weight loss of 5.6% and 9.0%, respectively) according to dehydration and decomposition on melting (SDTA signal)



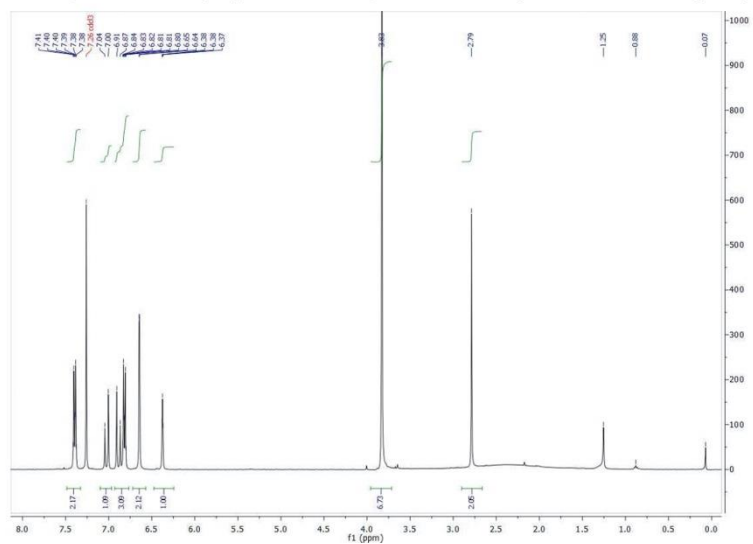
21

Figure S12: The PXRD of Pterostilbene-Ethylenediamine-H₂O II cocrystal hydrate has been indexed with the following proposed monoclinic cell: a=26.745(3) Å, b=5.1961(4) Å, c=22.971(2) Å, β= 100.526(6) °, V=3138.5(6) Å³ (Figures of Merit: M= 11, F= 35), with number of impurities equal to zero. A *P2₁/n* space group is suggested and the cell volume is compatible with 8 molecules of pterostilbene, 4 molecules of ethylenediamine and 8 molecules of water. (R_{wp}: 7.99; R_{exp}: 1.37). Z'=2, Z=8.



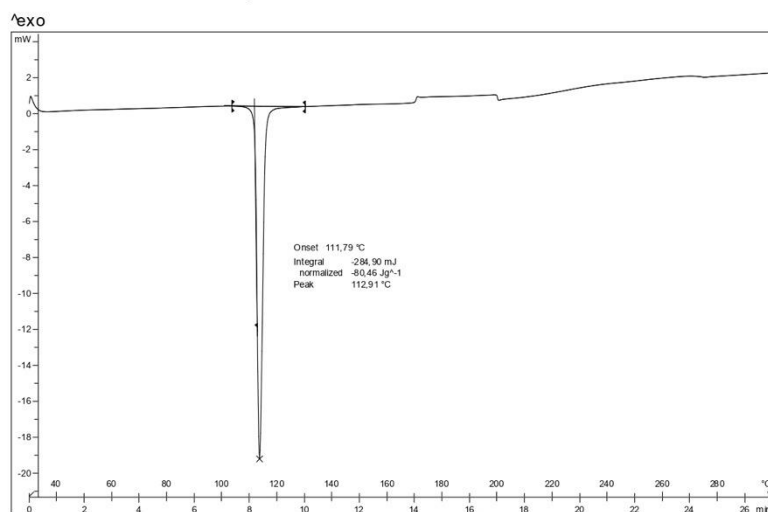
22

Figure S13: ¹H-NMR (chloroform-*d*: delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of Pterostilbene-Ethylenediamine-H₂O II cocrystal hydrate



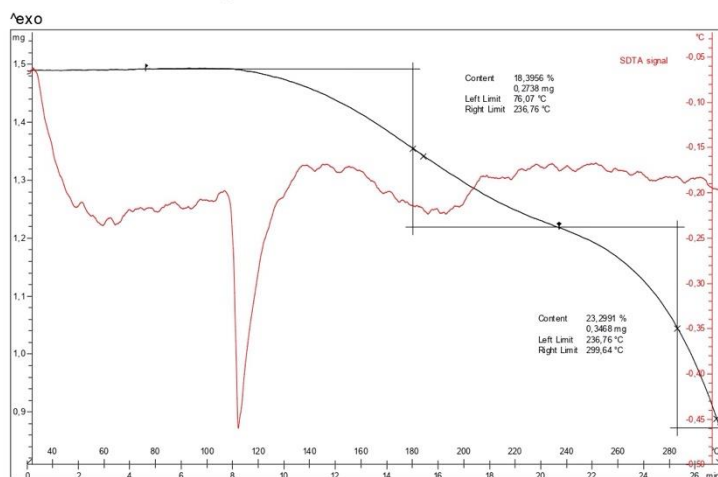
23

Figure S14: DSC of Pterostilbene-DABCO cocrystal



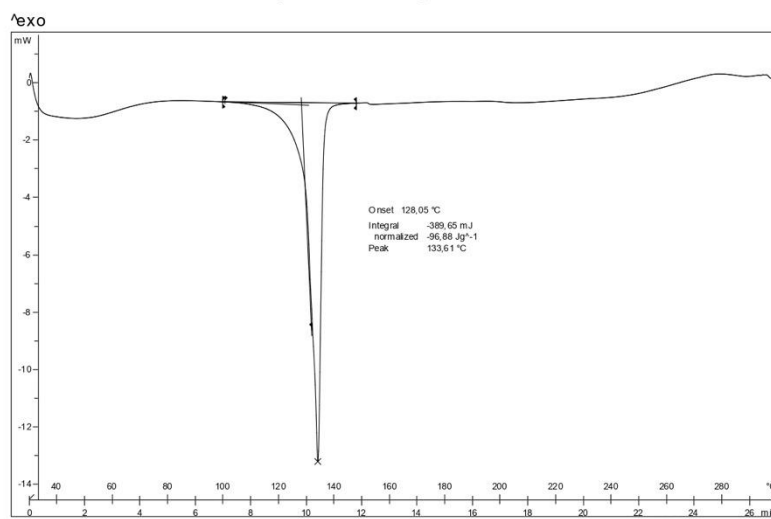
24

Figure S15: TGA of Pterostilbene-DABCO cocrystal



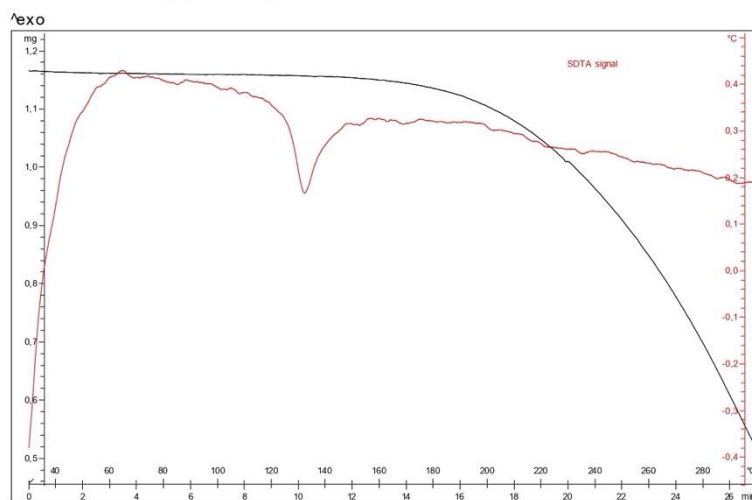
25

Figure S18: DSC of Pterostilbene-1,4,8,11-Tetrazacyclotetradecane cocrystal



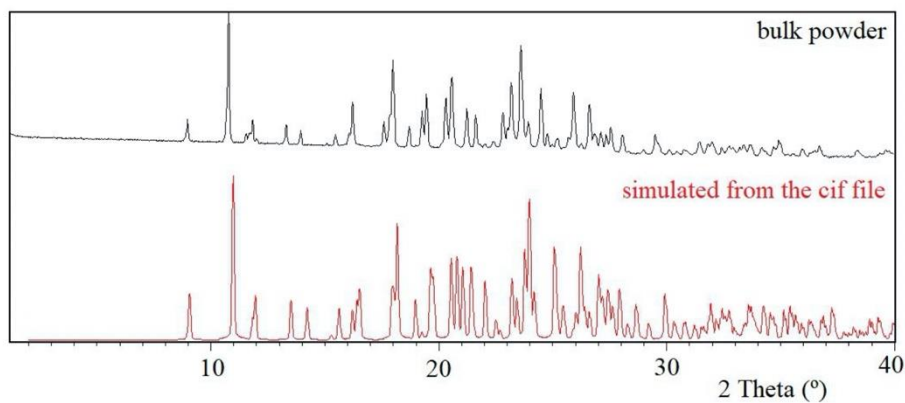
28

Figure S19: TGA of Pterostilbene-1,4,8,11-Tetrazacyclotetradecane cocrystal



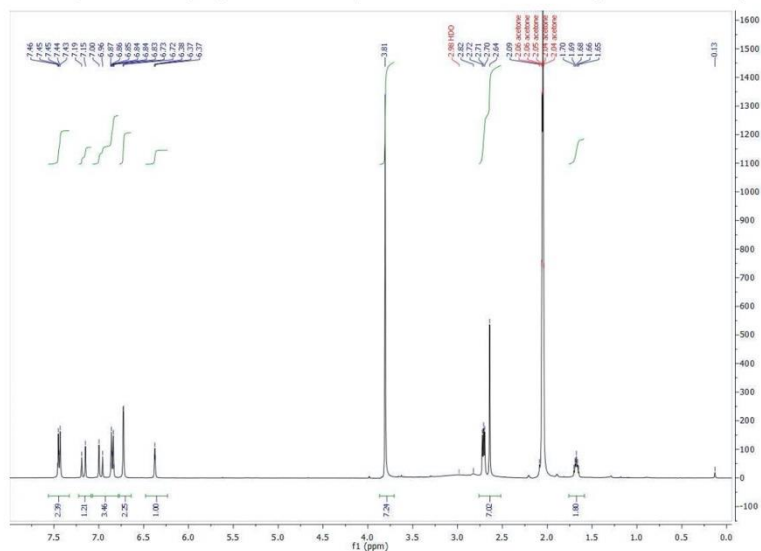
29

Figure S20: Comparative PXRD diffractograms between bulk Pterostilbene-1,4,8,11-Tetrazacyclotetradecane cocystal (2:1) (black) and simulated from the cif file (red). Differences are due to the thermal dilatation since the crystal structure was solved at 100 K and the PXRD diagram was obtained at 298 K.



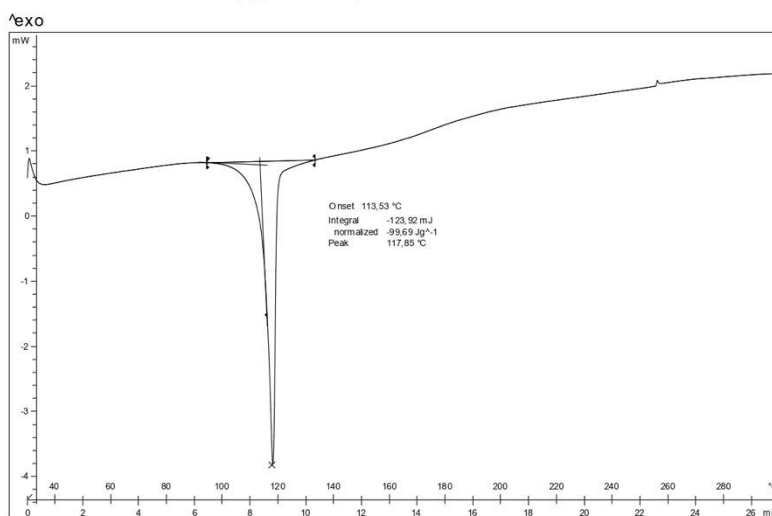
30

Figure S21: ¹H-NMR (acetone-*d*₆; delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of Pterostilbene-1,4,8,11-Tetrazacyclotetradecane cocystal



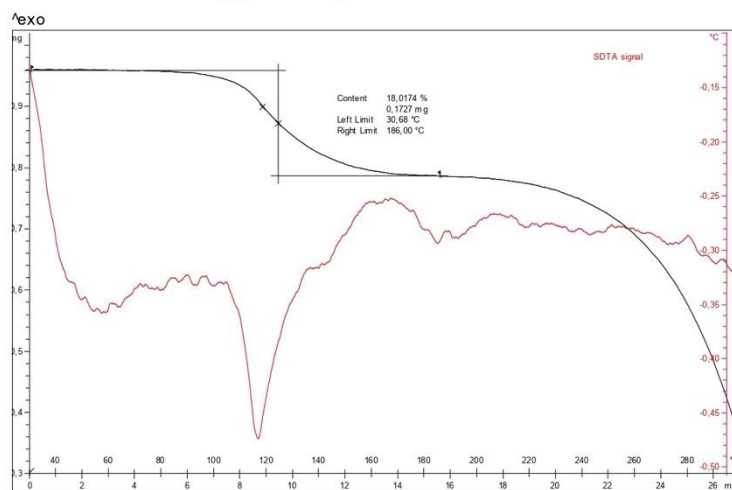
31

Figure S22: DSC of Pterostilbene-1,4-Dimethylpiperazine cocrystal



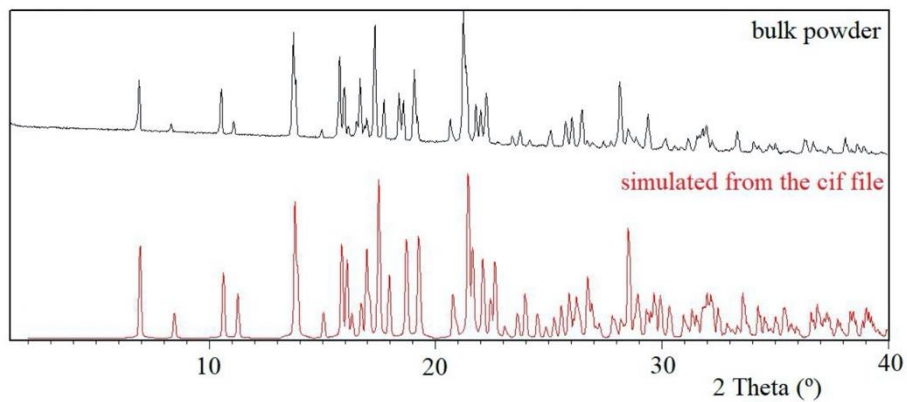
32

Figure S23: TGA of Pterostilbene-1,4-Dimethylpiperazine cocrystal



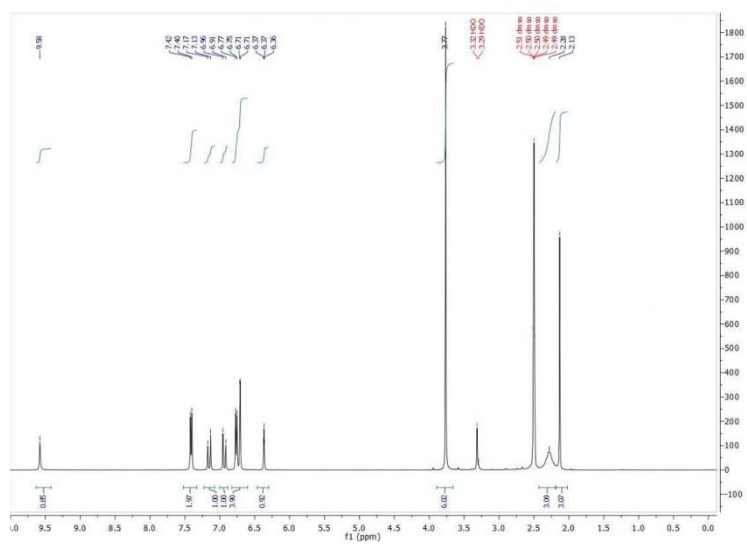
33

Figure S24: Comparative PXRD diffractograms between bulk Pterostilbene-1,4-Dimethylpiperazine cocrystal (2:1) (black) and simulated from the cif file (red). Differences are due to the thermal dilatation since the crystal structure was solved at 100 K and the PXRD diagram was obtained at 298 K.



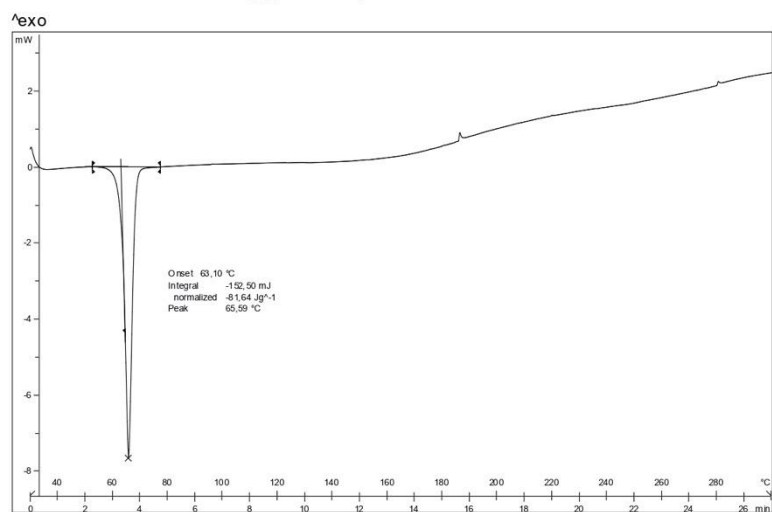
34

Figure S25: ¹H-NMR (dms0-d₆; delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of Pterostilbene-1,4-Dimethylpiperazine cocrystal



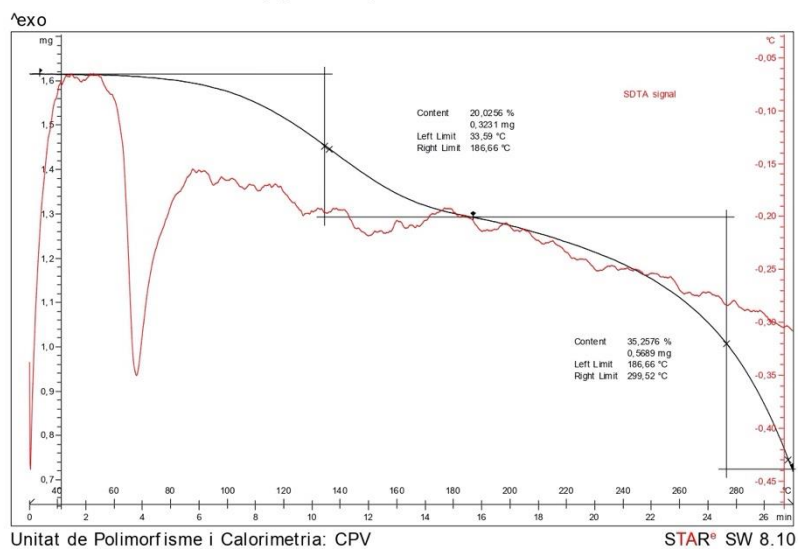
35

Figure S26: DSC of Pterostilbene-2,3,5-Trimethylpyrazine cocrystal



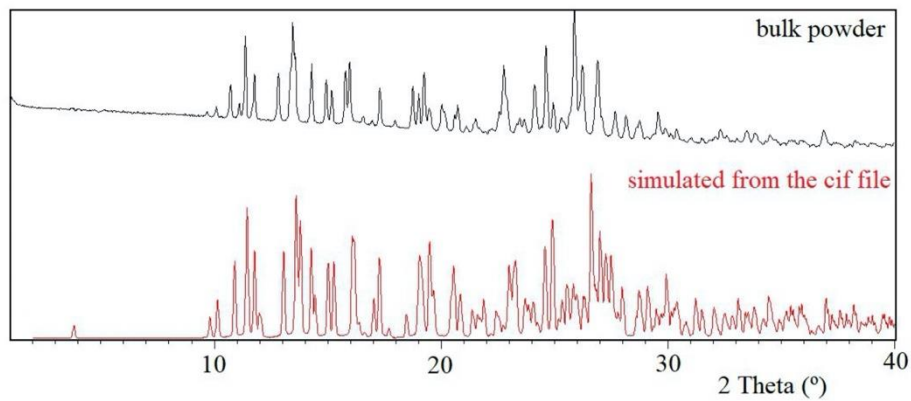
36

Figure S27: TGA of Pterostilbene-2,3,5-Trimethylpyrazine cocrystal



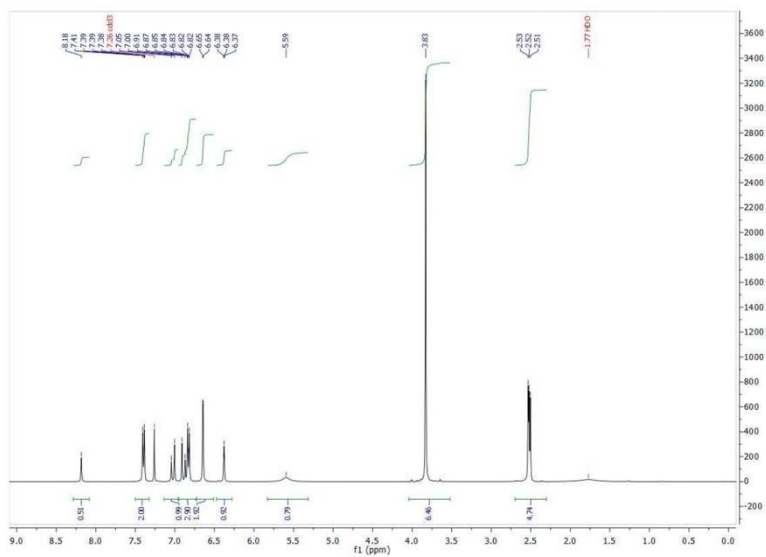
37

Figure S28: Comparative PXRD diffractograms between bulk Pterostilbene-2,3,5-Trimethylpyrazine cocrystal (2:1) (black) and simulated from the cif file (red). Differences are due to the thermal dilatation since the crystal structure was solved at 100 K and the PXRD diagram was obtained at 298 K.



38

Figure S29: ¹H-NMR (chloroform-*d*; delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of Pterostilbene-2,3,5-Trimethylpyrazine cocrystal



39

5. References

- [1] Bofill, L., de Sande, D., Barbas, R., Prohens, R. Hydrogen Bond Polarization Overcomes Unfavorable Packing in the Most Stable High Z' Polymorph of Pterostilbene. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 5, 2552-2556.

DFT analysis of uncommon $\pi \cdots \text{H}$ -bond array
interaction in a new pterostilbene/theophylline
cocrystal

Lidia Bofill,^a Rafel Prohens,^{ a,b} Rafael Barbas^b and Antonio Frontera^{*c}*

^a Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac, 4-8, 08028, Barcelona, Spain.

^b Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain.

^c Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Crta de Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain.

Electronic Supplementary Information

Table of contents:

1. Experimental methods	2
2. Characterization of new cocrystal of pterostilbene/theophylline.....	5
3. Crystal data and structure refinement.....	9
4. CSD Survey of theophylline crystal structures.....	10
5. CSD Survey of theophylline crystal structures exhibiting $\pi \cdots \text{H}$ -bonded array interactions.....	17
6. Computational methods.....	18
7. References.....	21

1

1. Experimental methods

1.1. Experimental procedures

Table S1. Experimental synthesis procedures of pterostilbene/theophylline cocrystal dichloromethane solvate (PTBE-THEO-DCM)

Methodology	N° Experiments	N° Solids	Positive results ^a	Form obtained (according to PXRD)
Liquid assisted grinding at 25 °C	8	8	-	-
Reaction Crystallization at 25 °C	5	5	2	PTBE-THEO-DCM
Solvent mediated transformation at 25 °C	7	7	1 / 2	PTBE-THEO-DCM
Crystallizations at slow cooling rate	4	4	2	PTBE-THEO-DCM
Preparation of the solid forms: scale up batches	1	1	1 / 2	PTBE-THEO-DCM

^a (1) positive: PTBE + coformer + new peaks observed in PXRD, (2) positive: cocrystal

1.2. Synthesis of new cocrystal pterostilbene/theophylline dichloromethane solvate (1:1:1) (PTBE-THEO-DCM)

Synthesis of the new cocrystal of pterostilbene/theophylline dichloromethane solvate was conducted by reaction crystallization and crystallization methodologies. Details of synthesis are as follows:

Bulk powder

Pterostilbene (113 mg, 0.441 mmol) was dissolved in dichloromethane (0.2 mL) at 25 °C. Then, theophylline (20 mg, 0.111 mmol) was added and the resulting suspension was stirred overnight and it was filtered and dried under vacuum.

Single crystal

Solution of pterostilbene/theophylline in a 1:1 molar ratio (20 mg of the final mixture) was dissolved in dichloromethane (1.5 mL) at 25 °C. Then, the solution was tightly sealed and kept at room temperature. After 33 days, crystals were obtained and analyzed by single crystal X-ray diffraction.

1.3. Desolvation of new cocrystal pterostilbene/theophylline dichloromethane solvate

Bulk powder

Pterostilbene/theophylline dichloromethane solvate cocrystal (30 mg) was placed into a round-bottomed flask and it was heated up to 80 °C in a silicone oil bath under vacuum for 1 hour, until total desolvation.

1.4. X-ray crystallographic analysis.

Powder X-ray diffraction pattern of new cocrystal of pterostilbene/theophylline as a dichloromethane solvate was obtained on a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer in transmission configuration using Cu K α 1+2 radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) with a focalizing elliptic mirror and a PIXcel detector working at a maximum detector's active length of 3.347°. Configuration of convergent beam with a focalizing mirror and a transmission geometry with flat sample sandwiched between low absorbing films measuring from 1 to 40 ° in 2 θ , with a step size of 0.026° and a total measuring time of 30 minutes.

1.5 Single X-ray crystallographic analysis

Single crystal X-ray diffraction (SCXRD) intensity data of the crystal form of pterostilbene/theophylline dichloromethane solvate was collected using a D8 Venture system equipped with a multilayer monochromator and a Mo microfocus ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a SAINT algorithm. Data were corrected for absorption effects using the multi-scan method (SADABS).¹ The structure was solved and refined using the Bruker SHELXTL Software Package, a computer program for automatic solution of crystal structures and refined by full-matrix least-squares method with ShelXle Version 4.8.0, a Qt graphical user interface for SHELXL computer program.²

1.6 Differential Scanning Calorimetry (DSC).

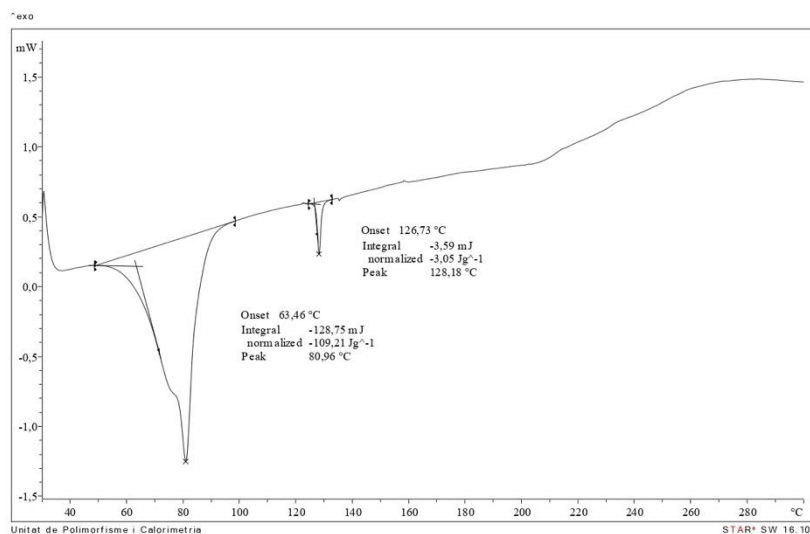
Differential scanning calorimetry analysis was carried out by means of a Mettler-Toledo DSC-822e calorimeter. Experimental conditions: aluminum crucibles of 40 μL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The calorimeter was calibrated with indium of 99.99% purity (m.p.: 156.7 $^{\circ}\text{C}$; ΔH : 28.37 J/g).

1.7 Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric analyses was performed on a Mettler-Toledo TGA-851e thermobalance. Experimental conditions: alumina crucibles of 70 μL volume, atmosphere of dry nitrogen with 50 mL/min flow rate, heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

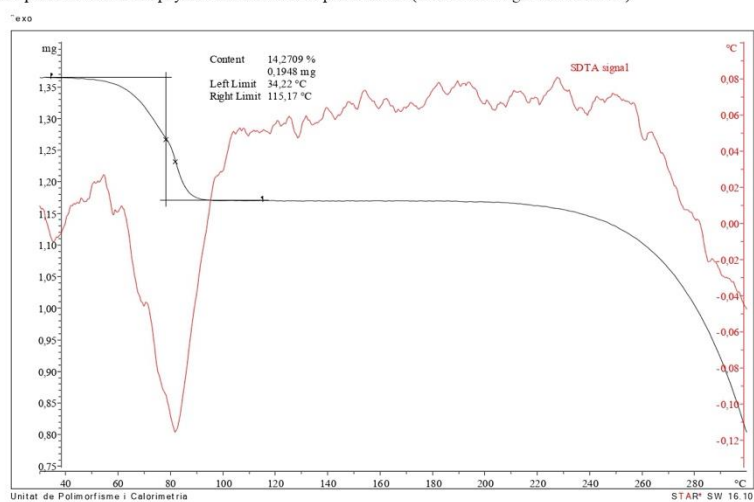
2.- Characterization of pterostilbene/theophylline cocrystal dichloromethane solvate (PTBE-THEO-DCM)

Figure S1: DSC of PTBE-THEO-DCM:



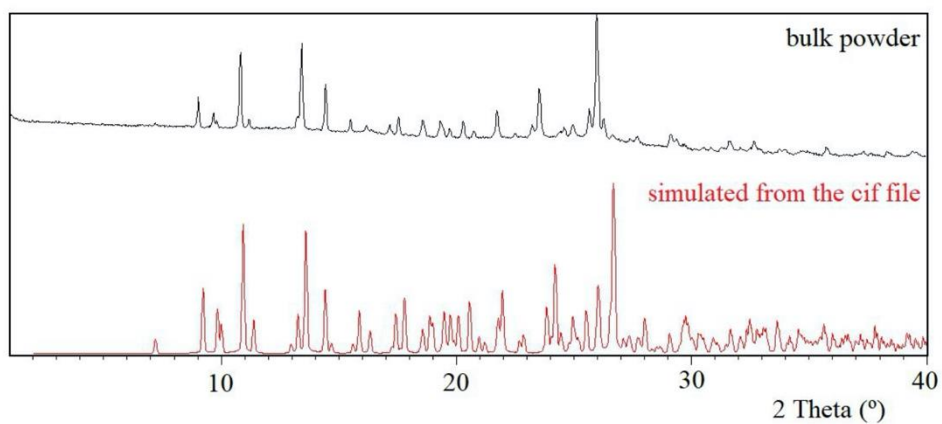
6

Figure S2: TGA of PTBE-THEO-DCM: a weight loss of 14.3% is detected from 30 °C to 115 °C which can be attributed to 1 molecule of dichloromethane per molecule of theophylline and molecule of pterostilbene (theoretical weight loss of 16.3%)



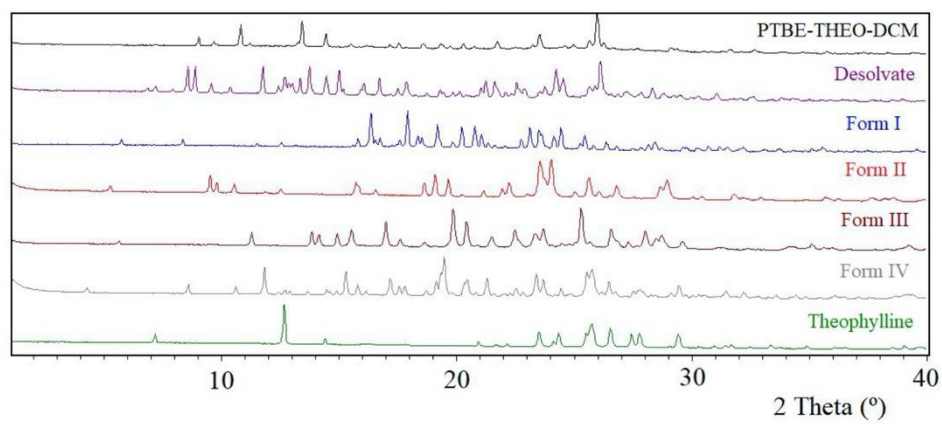
7

Figure S3: Comparative PXRD diffractograms of PTBE-THEO-DCM: bulk powder (black) and simulated from the cif file (red)



8

Figure S4: Comparative PXRD diffractograms of PTBE-THEO-DCM: bulk powder (black) and desolvate (purple), pterostilbene crystal forms: form I (blue), form II (red), form III (brown), form IV (grey) and theophylline bulk powder (green)



9

3.- Crystal data and structure refinement

3.1 Pterostilbene/theophylline dichloromethane solvate cocrystal (mo_023XB59_0m_a): 2010505

Table S2. Crystal data and structure refinement for mo_023XB59_0m_a.

Identification code	mo_023XB59_0m_a	
Empirical formula	C ₂₄ H ₂₆ Cl ₂ N ₄ O ₅	
Formula weight	521.39	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C 2/c	
Unit cell dimensions	a = 20.0576(10) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 10.1851(5) Å	$\beta = 106.925(2)^\circ$.
	c = 25.6891(11) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	5020.7(4) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.380 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.301 mm ⁻¹	
F(000)	2176	
Crystal size	0.2 x 0.1 x 0.1 mm ³	
Theta range for data collection	2.281 to 25.729°.	
Index ranges	-24<=h<=24, -12<=k<=12, -28<=l<=31	
Reflections collected	25548	
Independent reflections	4790 [R(int) = 0.0518]	
Completeness to theta = 25.242°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7453 and 0.6889	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4790 / 0 / 321	
Goodness-of-fit on F ²	1.019	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0359, wR2 = 0.0814	
R indices (all data)	R1 = 0.0601, wR2 = 0.0899	
Extinction coefficient	0.00069(9)	
Largest diff. peak and hole	0.267 and -0.347 e.Å ⁻³	

Table S3. Hydrogens bonds for mo_023XB59_0m_a [Å and °]

Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D-H...A)
O1---H1O...O4	[x,1-y,1/2+z]	0.84	1.87	2.6966(16)	169
N3---H3...O5	[1-x,1-y,1-z]	0.88	1.89	2.7414(17)	164

4. CSD Survey of theophylline crystal structures

Name	CCDC	T (K)	DOI	Space Group	Dimer formation
Theophylline	BAPLOT	283-303	10.1107/S0108270111024280	Pna21	
Theophylline	BAPLOT01	283-303	10.1107/S0108270197001960		
Theophylline form IV	BAPLOT02	283-303	10.1107/S1600536811047532	P21/c	YES
Theophylline form IV	BAPLOT03	100	10.1107/S010827011104786X	P21/c	YES
Theophylline form I	BAPLOT04	100	10.1107/S010827011104786X	Pna21	
Theophylline form I	BAPLOT05	120	10.1021/cg201499s	Pna21	
Theophylline form II	BAPLOT06	120	10.1021/cg201499s	Pna21	
Theophylline form II	BAPLOT07	273	10.1016/j.ibiod.2016.04.013	Pna21	
Theophylline	DUWXA	283-303	Bulgarian chemical communications (izvestiya po Khimiya)	Pn	
Theophylline (Diferent Polimorf IV)	KOJNJ	283-303	10.1039/C9CE00460B	P21/c	
Theophylline monohydrate	THEOPH	283-303	10.1107/S0365110X58000232	P21	
Theophylline monohydrate	THEOPH01	173	10.1107/S1600536802002921	P21/n	YES
Theophylline monohydrate	THEOPH02	120	10.1021/cg201499s		
Theophylline monohydrate	THEOPH03	120	Cryst. Growth Des. (2012), 12, 1395		
Theophylline monohydrate	THEOPH04	20	Cryst. Growth Des. (2012), 12, 1395		
Theophylline hydrochloride	THEOPI	283-303	J. Korean Chem. Soc. (1978), 22, 86	Pna21	
Theophylline perchlorate	VURNAY	283-303	10.1021/cg9012685	P21/n	YES
Theophylline dimethyl sulfoxide solvate	RIGYEM	150	10.1107/S1600536807028267	P21/c	
Theophylline pyridine-2,6-diamine	DEDMEH	283-303	10.1107/S205322961701230X	P21/c	
Theophylline 5-Chlorosalicylic acid complex	CSATEO	283-303	10.1002/jps.2600580613	P21/c	YES
Theophylline (S)-malic acid	CODCOO	283-303	10.1039/B717532A	P21	
Theophylline (RS)-malic acid	CIZTAH	283-303	10.1039/B717532A	P21/n	
Theophylline bis(acesulfame)	BUKYOX	283-303	10.1021/acs.cgd.5b00207	P-1	

Theophylline bis(Sulfamethazine)	AWIJEW	283-303	10.1107/S0108270111024280	P21/c	
Theophylline aspirin	DIPJAQ	283-303	10.1021/acs.cgd.8b01330	P-1	
Theophylline 3-hydroxybenzoic acid	DOPMUS	170	10.1021/cg501204k	P-1	YES
Theophylline 2,3-dihydroxybenzoic acid	DOPNAZ	100	10.1021/cg501204k	P21/c	
Theophylline 2,4-dihydroxybenzoic acid monohydrate	DOPNED	170	10.1021/cg501204k	P21/c	
Theophylline 2,4-dihydroxybenzoic acid monohydrate	DEYREF	283-303	10.1107/S1600536807010410	P21/n	
Theophylline tegafur monohydrate	DOXFIH	110	10.1021/cg501469r	P-1	
Theophylline gentisic acid	DUCROJ	110	10.1107/S1600536809031031	P-1	YES
Theophylline hemikis(N,N'-ethane-1,2-diyldiformamide)	DUWXAW	283-303	Bulgarian chemical communications (2015), 47, 311	P-1	
Theophylline urea	DUXZAX	283-303	10.1002/ardp.19863190715	C2/c	
Theophylline isonicotinamide	EVEYAH	283-303	10.1021/acs.cgd.6b00928	P21/c	
Theophylline Lamotringine monohydrate	FISNIH	283-303	10.1016/j.ejps.2019.01.007	P-1	
Theophylline Methyl gallate	GAFTUE	173	10.1039/c000614a	P21/c	YES
Glibenclamide theophylline	GEKMUH	283-303	10.1021/acs.cgd.7b00933	P-1	
Theophylline melamine dimethylsulfoxide solvate	GIDBAY	283-303	10.1039/C2CE25495F	P21/c	
Niclosamide theophylline	HEBFEB	283-303	10.1021/cg300784v	P21/c	

Niclosamide theophylline acetonitril solvate	HEBFIF	283-303	10.1021/cg300784v	P-1	YES
Sulfacetamide theophylline	HOCCUZ	100	10.1039/C4CE00103F	P-1	
Theophylline 4-aminobenzoic acid	HUMNEK	283-303	10.1021/acs.cgd.5b00279	P-1	
Theophylline 4-aminobenzoic acid	HUMNEK01	100	10.1021/acs.cgd.5b01293	P-1	
P-coumaric acid theophylline polymorph I	IJIBEJ	120	10.1039/COCE00214C	P-1	
P-coumaric acid theophylline polymorph II	IJIBEJ01	120	10.1039/COCE00214C	P21/n	
Pyrimethamine Theophylline	KICWIE	180	10.1039/C3CE26765B	P-1	
Theophylline citric acid monohydrate	KIGKAN	120	10.1021/mp0700054	P21/c	
Theophylline sorbic acid	KIGLAO	100	10.1021/mp0601345	P21/m	
Theophylline salicylic acid	KIGLES	100	10.1021/mp0601345	P21/m	YES
Theophylline salicylic acid	KIGLES01	180	10.1039/C5CE00240K	P21/n	YES
Theophylline 1-hydroxy-2-naphthoic acid	KIGLIW	173	10.1021/mp0601345	P21/c	YES
Theophylline 4-hydroxybenzoic acid	KIGLOC	173	10.1021/mp0601345	P21/c	
Theophylline paracetamol	KIGLUI	100	10.1021/mp0601345	P21/n	YES
Theophylline paracetamol	KIGLUI01	180	10.1021/mp0601345	P21/n	YES
Theophylline 3-(Dihydroxyboryl)benzoic acid	LEDVOH	283-303	10.1107/S1600536812029467	P21/c	YES

Theophylline phtalic acid	LUKXUL	283-303	10.1007/s10973-007-8902-1	P21/c	
Caffeine theophylline	NEHJER	120	10.1039/c2cc33412g	P-1	YES
Caffeine theophylline	NEHJER01	283-303	10.1021/cg401179s	P21/c	
BIS(theophylline) L-tartaric acid	NUJCAY	283-303	10.1039/B613073A	P21	
BIS(theophylline) DL-tartaric acid	NUJCEC	283-303	10.1039/B613073A	P-1	YES
Theophylline diclofenac	OPOFUW	173	10.1021/mp5004652	P-1	YES
Theophylline difunisal	OPOGAD	150	10.1021/mp5004652	P21/c	YES
Theophylline 2,3,5-trifluorobenzoic acid	OPUKIV	283-303	10.1039/C6CE00293E	P21/c	YES
Theophylline 2,3,6-trifluorobenzoic acid	OPUKOB	283-303	10.1039/C6CE00293E	P21/c	YES
Theophylline 2,4,5-trifluorobenzoic acid form II	OPUKUH	283-303	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES
Theophylline 2,4,5-trifluorobenzoic acid form I	OPUKUH01	283-303	10.1039/C6CE00293E	P-1	
Theophylline 2,4,5-trifluorobenzoic acid form I	OPULES	298	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES
Theophylline 2,4,5-trifluorobenzoic acid form II	OPULES01	298	10.1039/C6CE00293E	Pbca	
Theophylline 3,4,5-trifluorobenzoic acid	OPULOC	150	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES
Theophylline 2,3,4,5-trifluorobenzoic acid	OPULUI	150	10.1039/C6CE00293E	P21/c	YES
Theophylline pentafluorobenzoic acid form I	OPUMAP	283-303	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES

Theophylline pentafluorobenzoic acid form II	OPUMAP01	150	10.1039/C6CE00293E	P-1	
Theophylline 2,3,5-trifluorobenzoic acid	OPUMIX	180	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES
Theophylline 3-fluorobenzoic acid	OPUMOD	283-303	10.1039/C6CE00293E	P21/n	
Theophylline 3,5-difluorobenzoic acid	OPUMUJ	283-303	10.1039/C6CE00293E	P21/c	YES
Theophylline 2-fluorobenzoic acid	OPUNAQ	283-303	10.1039/C6CE00293E	P21/n	
Bis(2,5-difluorobenzoic acid) theophylline	OPUNEU	283-303	10.1039/C6CE00293E	P-1	
Theophyllin3,4-difluorobenzoic acid e form II	OPUNYI	150	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES
Theophylline 2-fluorobenzoic acid nitromethane solvate	OPUNOE	283-303	10.1039/C6CE00293E	P21/c	YES
Theophylline 2,3,4,6-tetrafluorobenzoic acid	OPUPIA	283-303	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES
Theophylline 3,4-difluorobenzoic acid	OPUPOG	283-303	10.1039/C6CE00293E	P-1	YES
Theophylline 2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid	OPUPUM	283-303	10.1039/C6CE00293E	P21/c	YES
Theophylline (+)-dihydromyricetin acetonitrile solvate	OQIFUR	283-303	10.1039/C6CE00293E	P212121	
Bis(theophylline) tris(pyrrolidin-2-one)	PICMLA	180	10.1039/C8CE00871J	P21/n	
Theophylline pyrrolidin-2-one	PICMOG	180	10.1039/C8CE00871J	P-1	
Theophylline benzamide form II	RABXIE	180	10.1021/acs.cgd.5b00905	P21/c	
Theophylline benzamide form II	RABXIE01	283-303	10.1021/acs.cgd.5b01776	P21/n	

Theophylline benzamide form P41	RABXIE02	283-303	10.1107/S2053229616002643	P41	
Theophylline benzamide form P41	RABXIE03	283-303	10.1107/S2053229616002643	P41	
Theophylline acetamide	RABXOK	120	10.1021/acs.cgd.5b00905	P-1	
Theophyllin N,N-dimethylformamide	RABXUQ	250	10.1021/acs.cgd.5b00905	P21/c	
Theophyllin formamide form I	RACDUX	270	10.1021/acs.cgd.5b00905	P21/m	
Theophyllin formamide form II	RACDUX01	270	10.1021/acs.cgd.5b00905	P-1	
Theophyllin N-methylformamide	RACFEJ	180	10.1021/acs.cgd.5b00905	P-1	
Theophylline pyrazinamide form II	RACFIN	180	10.1021/acs.cgd.5b00905	P-1	YES
Theophylline pyrazinamide form I	RACFIN01	180	10.1021/acs.cgd.5b00905	Pna21	
Theophylline sulfathiazole	SULTHE	283-303	ACS, Abstr. Papers (Summer), (1970, 35	P21/c	
Theophylline sulfathiazole	SULTHE01	283-303	10.1002/jps.2600600228	P21/c	
Theophylline pyrazole-3,5-dicarboxylic acid monohydrate	UNITER	283-303	10.1021/cg1012846	P-1	
Theophylline benzoic acid	VAXSAQ	283-303	10.1039/c2ce25236h	P21/n	
Theophylline benzoic acid	VAXSAQ01	283-303	10.1039/c2ce25236h	P21/n	
Theophylline resorctinol monohydrate	WOCGOM	100	10.1039/C3CE42332H	Cc	
Theophylline phloroglucinol monohydrate	WOCGUS	100	10.1039/C3CE42332H	P21/c	

Theophylline orcinol dihydrate	WOCHAZ	100	10.1039/C3CE42332H	Pbca	
Theophylline 3,5-dihydroxybenzoic acid	WOCHIH	283-303	10.1039/C3CE42332H	P-1	YES
Theophylline 3,5-dihydroxybenzoic acid	WOCHIH01	170	10.1039/C3CE42332H	P-1	YES
Theophylline 3,4-dihydroxybenzoic acid form I	WOCHON01	100	10.1021/cg501204k	P-1	YES
Theophylline 3,4-dihydroxybenzoic acid form II	WOCHON02	173	10.1107/S2053229618006861	Pbca	
Theophylline cinnamic acid	WOCHUT	283-303	10.1039/C3CE42332H	P21/c	
Theophylline 2-aminobenzoic acid isobutanol solvate	WUTHIE	100	10.1021/acs.cgd.5b01293	P2/n	YES
Theophylline 3-aminobenzoic acid	WUTJAY	283-303	10.1021/acs.cgd.5b01293	P21/c	
Theophylline N-(2-amiminoethyl)carbamate	WUYROX	283-303	10.1023/A:1019966529819	Cc	
Bis(Theophylline) oxalic acid	XEJWUF	180	10.1016/j.ijpharm.2006.04.018	P21/c	YES
Theophylline malonic acid	XEJXAM	180	10.1016/j.ijpharm.2006.04.018	C2/c	YES
Theophylline maleic acid	XEJXEQ	180	10.1016/j.ijpharm.2006.04.018	P-1	YES
Theophylline glutaric acid	XEJXIU	180	10.1016/j.ijpharm.2006.04.018	P21/c	YES
Theophylline saccharin	XOBCUN	173	10.1039/B801713C	P-1	
Theophylline thiosaccharin nitromethane solvate	YAJHID	150	10.1021/acs.cgd.6b01669	P-1	YES
Theophylline 4-hidroxybenzamide	YEVMIY	100	10.1039/C7CE01915G	Pben	

Theophylline acetazolamide	YEVNUK	283-303	10.1039/C7CE01915G	C2/c	
Theophylline bis(3,4-dichlorobenzoic acid)	YEVNAR	283-303	10.1039/C7CE01915G	P-1	
Bis(Theophylline) picolinamide	YEVNEV	100K	10.1039/C7CE01915G	P-1	

5. Table S4. CSD Survey of theophylline cocrystals showing $\pi \cdots \text{H}$ -bond array interactions

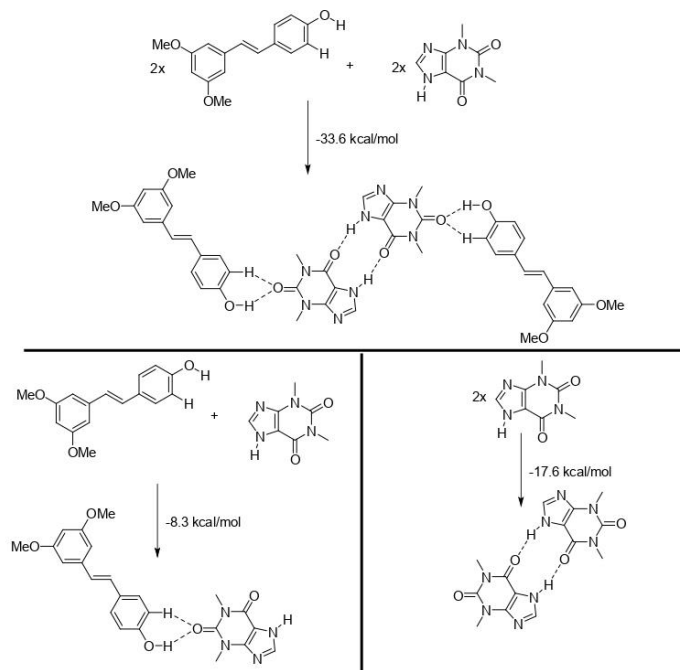
CCDC	π donor
OPUKIV	theophylline
OPUKOB	theophylline
OPUKUH	theophylline
OPULUI	theophylline
OPUMUJ	theophylline
OPUNY	difluorophenyl
OPUPOG	difluorophenyl
OPUPUM	theophylline
RACFIN	amide
ULUQUP	4-chlorophenyl
ULURAW	4-iodophenyl
WOCHIH	1,3-dihydroxyphenyl
WOCHIH01	1,3-dihydroxyphenyl
WOCHON	1,2-dihydroxyphenyl
WOCHON01	1,2-dihydroxyphenyl
WUTHEA	o-aminobenzoic acid
XEJXAM	COOH
XEJXEQ	COOH
XEJXIU	COOH
YEVNUK	theophylline
YEVNEV	theophylline
YIZGLA	theophylline
ZEKPIR	theophylline
ZEKPIR01	theophylline
ZIQDUA	o-aminobenzoic acid

6. Computational methods

The energies of the complexes included in this study were computed at the PBE1PBE-D3/def2-TZVP level of theory by using the program Gaussian-16.³ The interaction energy (or binding energy in this work) ΔE , is defined as the energy difference between the multicomponent assembly and the sum of the energies of the monomers. The basis set superposition error has been corrected using the counterpoise method.⁴ For the calculations we have used the Weigend def2-TZVP^{5,6} basis set and the PBE1PBE DFT functional.^{7,8} Grimme's D3 dispersion correction has been used^{9,10} to better estimate the π - π interactions. The MEP (Molecular Electrostatic Potential) surfaces calculations have been computed using Gaussian-16 software at the PBE1PBE-D3/def2-TZVP level of theory. The NCIPLOT^{11,12} index and QTAIM analyses have been performed using the PBE1PBE-D3/def2-TZVP wave function and the NCIPLOT program.¹³

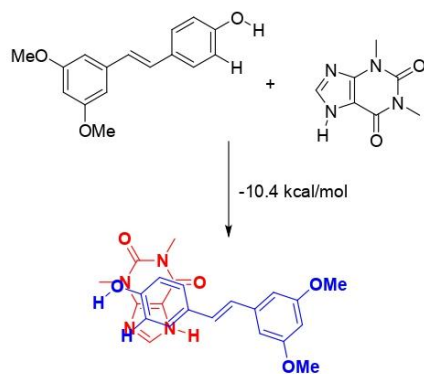
It should be mentioned that although the QTAIM theory is widely used to characterize and confirm the existence of noncovalent interactions, it has been criticized by numerous manuscripts which have been recently summarized in the recent work published by Jablonski.¹⁴

The binding energies included in Figure 3 of the main text were computed using the procedure of Scheme S1.



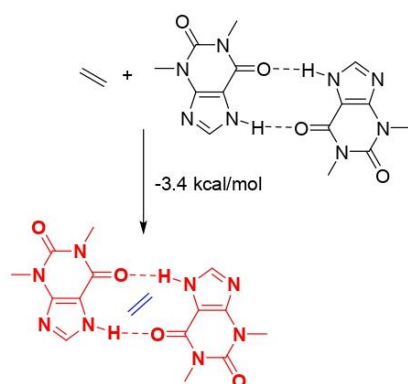
Scheme S1. Chemical equations used to calculate the energies of Figure 3 (main text)

The binding energies included in Figure 4 of the main text were computed using the procedure of Scheme S2



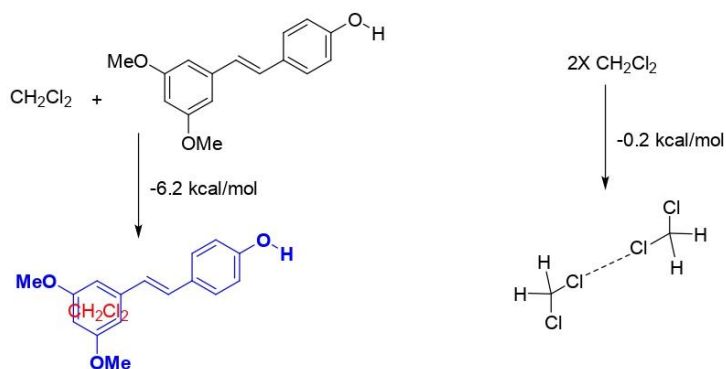
Scheme S2. Chemical equation used to calculate the energies of Figure 4 (main text)

The binding energy included in Figure 5 of the main text was computed using the procedure of Scheme S3



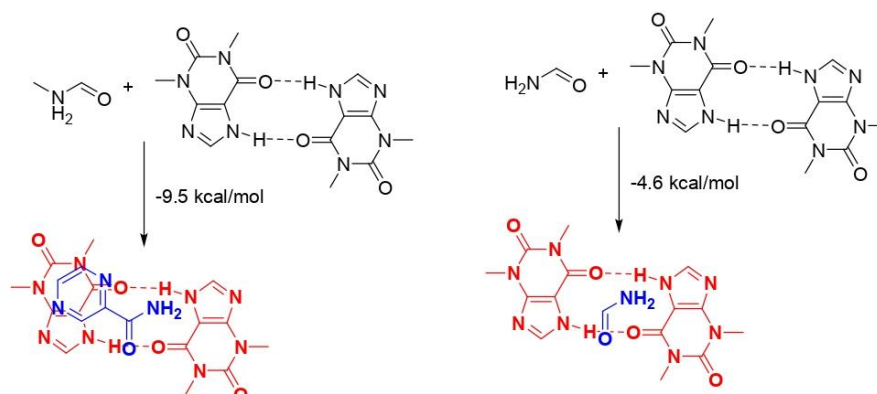
Scheme S3. Chemical equation used to calculate the interaction energy of Figure 5 (main text)

The binding energies included in Figure 6 of the main text were computed using the procedure of Scheme S4



Scheme S4. Chemical equations used to calculate the energies of Figure 6 (main text)

The binding energies included in Figure 7 of the main text were computed using the procedure of Scheme S5



Scheme S5. Chemical equations used to calculate the energies of Figure 6 (main text)

6. References

- [1]. SADABS Bruker AXS; Madison, Wisconsin, USA, 2004; SAINT, Software Users Guide, Version 6.0; Bruker Analytical X-ray Systems: Madison, WI, 1999. Sheldrick, G. M. SADABS v2.03; Area-Detector Absorption Correction; University of Göttingen: Germany, 1999. Saint, Version 7.60A; Bruker AXS 2008; SADABS, V. 2008-1, **2008**.
- [2]. G. M. A. Sheldrick, A Short History of SHELX. *Acta Crystallogr., Sect. A.* **2008**, *64*, 112-122.
- [3]. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. *Gaussian 16 Rev. A.03*, Wallingford, CT, **2016**.

- [4]. Boys, S. F.; Bernardi, F., The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Molecular Physics* **1970**, *19* (4), 553-566.
- [5]. Rappoport, D.; Furche, F., Property-optimized Gaussian basis sets for molecular response calculations. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *133* (13), 134105.
- [6]. Weigend, F.; Ahlrichs, R., Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7* (18), 3297-3305.
- [7]. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M., Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters* **1996**, *77* (18), 3865-3868.
- [8]. Perdew, J. P.; Ernzerhof, M.; Burke, K., Rationale for mixing exact exchange with density functional approximations. *The Journal of Chemical Physics* **1996**, *105* (22), 9982-9985.
- [9]. Grimme, S., Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *Journal of Computational Chemistry* **2006**, *27* (15), 1787-1799.
- [10]. Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H., A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *132* (15), 154104.
- [11]. Johnson, E. R.; Keinan, S.; Mori-Sánchez, P.; Contreras-García, J.; Cohen, A. J.; Yang, W., Revealing Noncovalent Interactions. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 6498-6506.
- [12]. Contreras-García, J.; Johnson, E. R.; Keinan, S.; Chaudret, R.; Piquemal, J.-P.; Beratan, D. N.; Yang, W., NCIPLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2011**, *7*, 625-632.
- [13]. AIMAll (Version 19.10.12), Todd A. Keith, TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA, 2019 (aim.tkgristmill.com)
- [14]. Jabłoński, M. On the Uselessness of Bond Paths Linking Distant Atoms and on the Violation of the Concept of Privileged Exchange Channels *ChemistryOpen*. **2019**; *8*, 497-507.

New Cocrystal of Ubiquinol with high Stability to Oxidation

Lidia Bofill[†], Dafne de Sande[†], Rafael Barbas[†] and Rafel Prohens^{*†‡}

[†] Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

[‡] Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L., 07121, Palma de Mallorca, Spain.

Electronic Supplementary Information

Table of contents:

1. Experimental methods.....	2
2. Synthesis of the cocrystal hydrate form.....	4
3. Characterization of the solids.....	5
4. CSD 3,4-Dihydroxybenzoic acid crystal forms reported.....	19
5. Stability standard conditions (PXRD analysis).....	20
6. References.....	25

1. Experimental methods

1.1. Solubility qualitative determination of Ubiquinol (CoQ₁₀-H₂)

The solvents selected to be used in the cocrystal screening are highlighted in black. CoQ₁₀-H₂ (20 mg, 0.023 mmol) was dissolved in 30 solvents in a temperature range of 25-50 °C. Ubiquinol is soluble at 25 °C in the following solvents: **ethanol** (1.5 mL), **IPA** (1.4 mL), **butanol** (0.3 mL), **MEK** (0.05 mL), **acetone** (0.15 mL), **MiBK** (0.05 mL), DMF (0.05 mL), pentane (0.05 mL), **heptane** (0.1 mL), cyclohexane (0.05 mL), toluene (0.05 mL), **xylene** (0.05 mL), **AcOEt** (0.05 mL), **diethyl ether** (0.05 mL), THF (0.05 mL), dimethyl ethylene glycol (0.05 mL), diisopropyl ether (0.05 mL), **dioxane** (0.05 mL), **dichloromethane** (0.05 mL), **chloroform** (0.05 mL) and **benzyl alcohol** (0.15 mL) and diethylamine (0.2 mL). At 40 °C it is soluble in **acetic acid** (1.3 mL). At 50 °C it is soluble in methanol (2.0 mL), **formic acid** (2.0 mL), **ACN** (2.0 mL) and DMSO (2.0 mL). It is insoluble in ethylene glycol and **water**. It decomposes in NH₃ (32%) in water and diethylamine.

2

1.2. Cocrystal screening experimental procedures

Table S1. Cocrystal screening of CoQ₁₀-H₂

Methodology	Cofomers	N° Experiments	N° Solids	Positive results ^a	Cofomers	Form obtained (according to PXRD)
Solubility Study	-	30	30	1	-	Anhydrous forms A
Net grinding at 25 °C	4	4	-	-	-	-
Liquid assisted grinding at 25 °C	11	75	67	1	6	6 new evidences
Reaction Crystallization at 25 °C	9	46	43	1 / 2	2 / 3	CoQ ₁₀ -H ₂ -3,4-DHBA-H ₂ O, CoQ ₁₀ -H ₂ -3,5-DHBA and CoQ ₁₀ -H ₂ -3-HBA
Solvent mediated transformation at 25 °C	5	17	16	1 / 2	1 / 2	CoQ ₁₀ -H ₂ -3,4-DHBA-H ₂ O and CoQ ₁₀ -H ₂ -3-HBA
Crystallizations at slow cooling rate	-	8	4	-	-	-
Preparation of the solid forms: scale up batches	5	45	49	1 / 2	2 / 3	CoQ ₁₀ -H ₂ -3,4-DHBA-H ₂ O, CoQ ₁₀ -H ₂ -3,5-DHBA and CoQ ₁₀ -H ₂ -3-HBA

^a (1) positive: CoQ₁₀-H₂ + cofomer + new peaks observed in PXRD, (2) positive: cocrystal

3

2. Synthesis of $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA-H}_2\text{O}$ cocrystal hydrate

(1:1:1)

Synthesis of a cocrystal hydrate of ubiquinol ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) and 3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA) was obtained by reaction crystallization methodology at 25 °C. Details of synthesis are as follows:

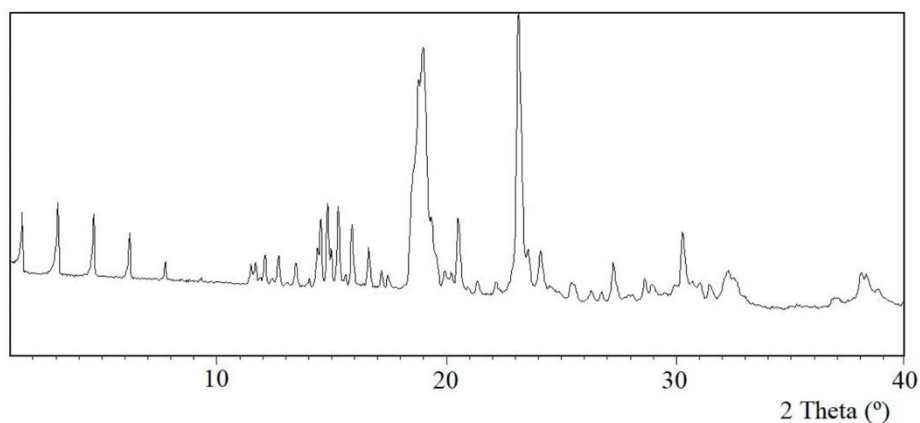
Concentrated solution of $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ in butanol was prepared (50 mg in 0.8 mL). 3,4-DHBA was added until suspension was observed. The suspension was stirred overnight at room temperature (25 °C). The solid was filtered and dried under vacuum. The same cocrystal was also obtained by reaction crystallization in AcOEt instead of butanol.

Its PXRD diagram has been indexed. Stoichiometry has been assessed based on NMR and TGA measurements and EA determination since its crystal structure has not been solved. Thus, its molar ratio [$\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$: 3,4-DHBA : H_2O] is [1:1:1].

4

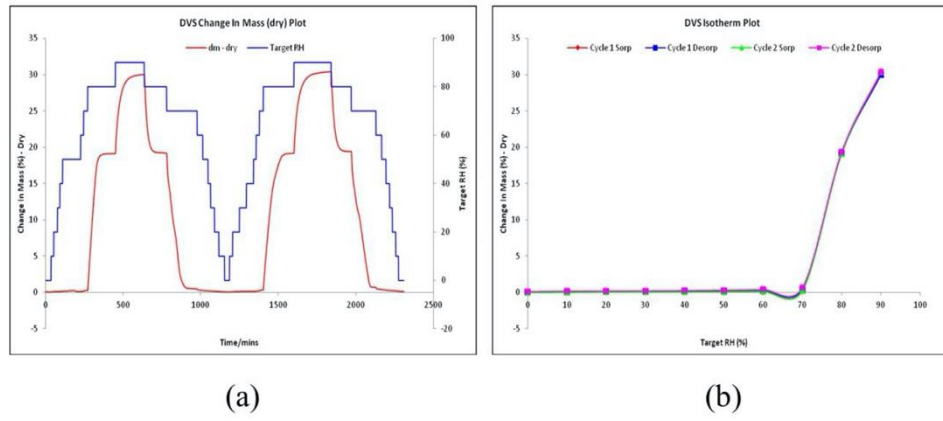
3.- Characterization of the solids

Figure S1: PXRD diffractogram of ubiquinol ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) raw material



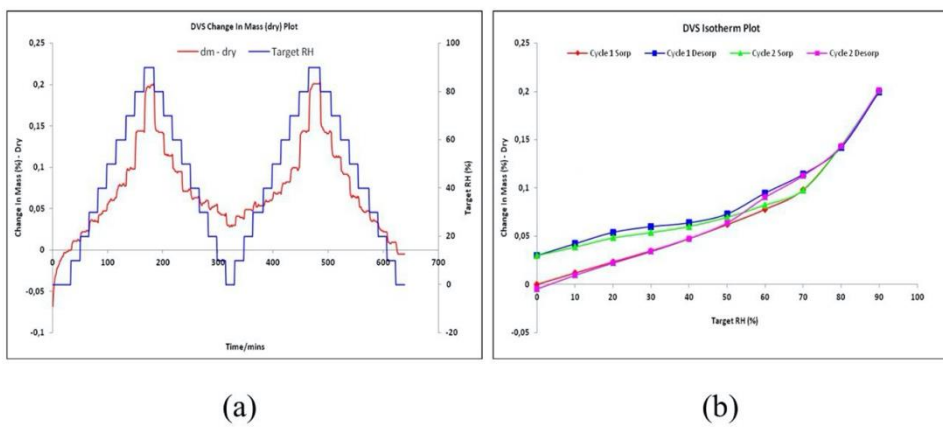
5

Figure S2: DVS (a) and DVS isotherm (b) of CoQ₁₀-H₂; T^o: 25.3 °C; Mass constancy: 0.001%; Time limit for each step: 1440 minutes



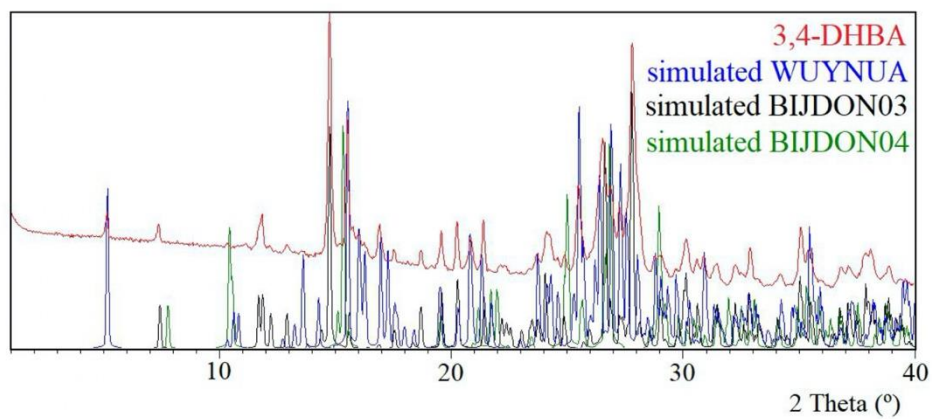
6

Figure S3: DVS (a) and DVS isotherm (b) of CoQ₁₀-H₂; T^o: 40.7 °C; Mass constancy: 0.001%; Time limit for each step: 1440 minutes



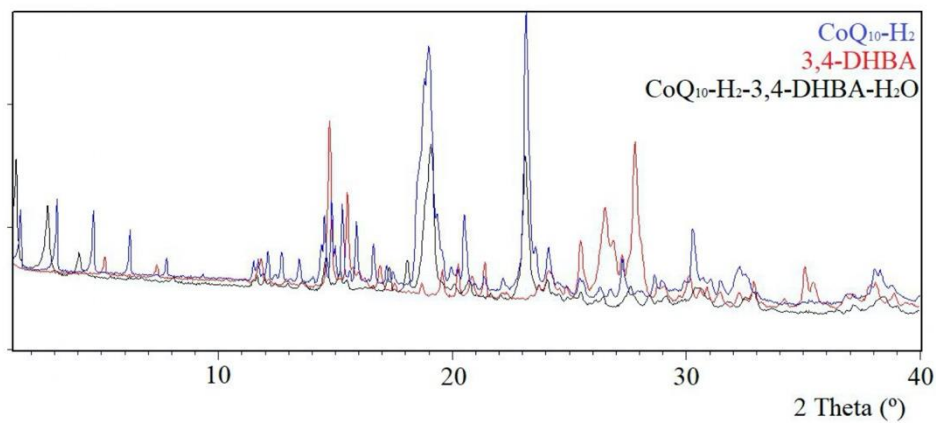
7

Figure S4: Comparative PXRD diffractograms of 3,4-dihydroxybenzoic acid (coformer) (red), simulated from the cif: anhydrous (WUYNUA) (blue) and monohydrates (BIJDON03) (black) and (BIJDON04) (green)



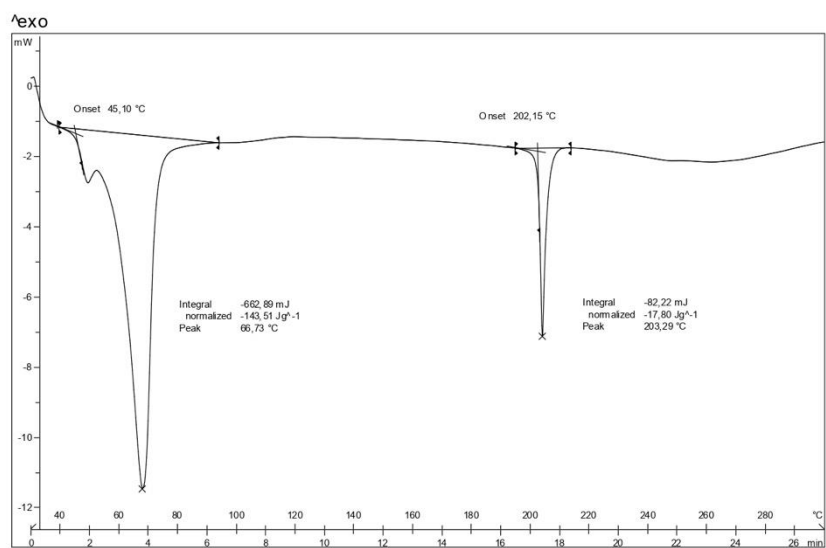
8

Figure S5: Comparative PXRD diffractograms of ubiquinol ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) (blue), 3,4-dihydroxybenzoic acid (red) and cocrystal hydrate $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA-H}_2\text{O}$ (black)



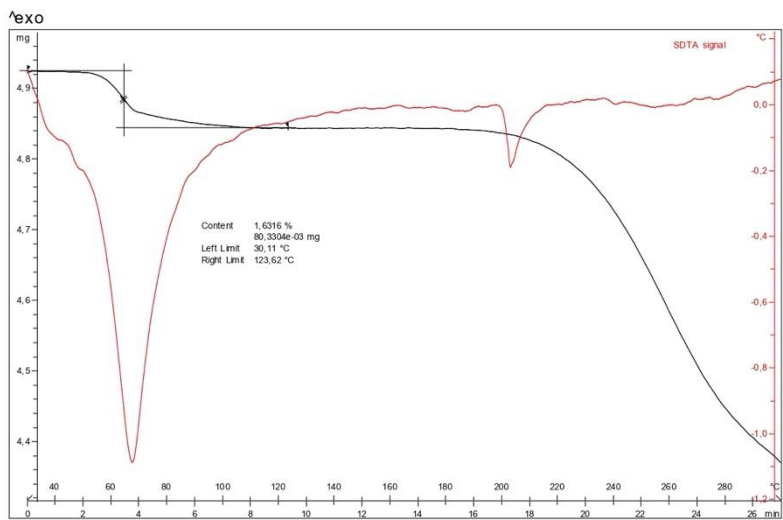
9

Figure S6: DSC of CoQ₁₀-H₂-3,4-DHBA-H₂O



10

Figure S7: TGA of CoQ₁₀-H₂-3,4-DHBA-H₂O: a weight loss of 1.6% from 30 °C to 124 °C which can be attributed to 1 molecule of water per molecule of ubiquinol and 3,4-dihydroxybenzoic acid (theoretical weight loss of 1.7%).



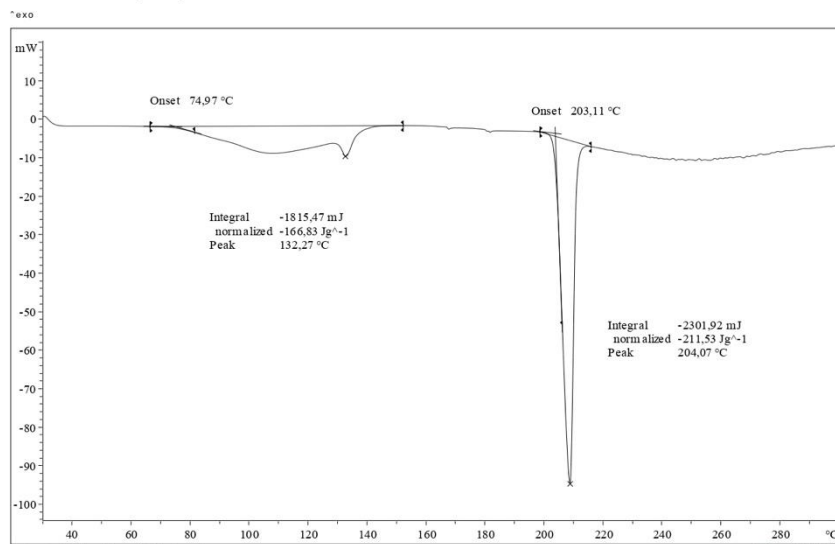
11

Figure S8: DSC of ubiquinol (CoQ₁₀-H₂) used as the raw material



12

Figure S9: DSC of 3,4-Dihydroxybenzoic acid used as raw material



13

Table S2. Comparative of pure components thermodynamic properties (melting point, m.p. in °C) and enthalpy of melting (ΔH in Jg⁻¹) respect to data reported in literature

Compound	Experimental		Literature	References
	m.p.	ΔH	m.p. ¹	
CoQ ₁₀ -H ₂	51	94.8	48 and 52	[7]
3,4-Dihydroxybenzoic acid	75 ²	166.8 ²	201 ³	[1]
	203	211.5		

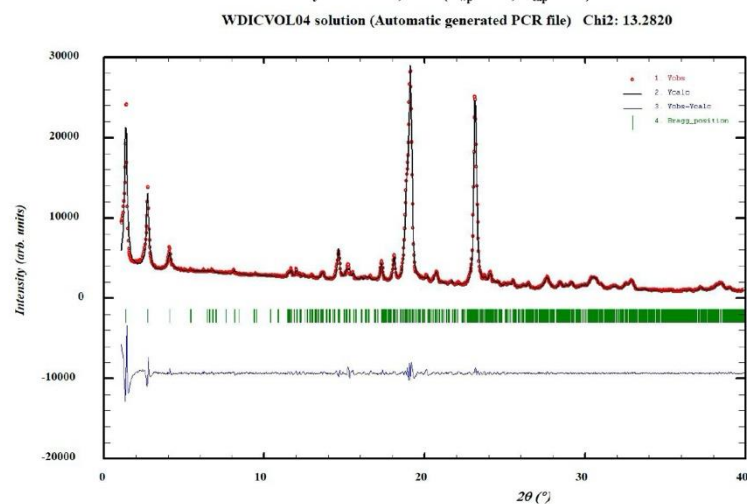
¹ ΔH values are not reported

² This phenomenon includes dehydration since the starting material is a mixture of anhydrous and monohydrate forms

³ This corresponds to the anhydrous form

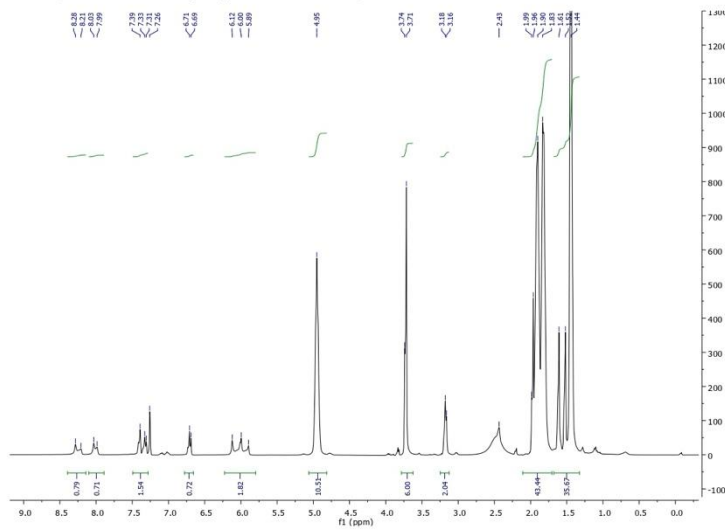
14

Figure S10: The PXRD of CoQ₁₀-H₂-3,4-DHBA-H₂O cocrystal hydrate has been indexed with the following proposed monoclinic cell: a=65.20(2) Å, b=13.672(7) Å, c=7.720(3) Å, β = 94.96(4)°, V=6856(5) Å³ (Figures of Merit: M= 10, F= 37), with a number of impurities equal to zero. A P2₁ space group is compatible with the cell and the cell volume is compatible with 1 molecule of ubiquinol, 1 molecule of 3,4-dihydroxybenzoic acid and 1 molecule of water at the asymmetric unit, Z=4. (R_{wp}: 6.62; R_{exp}: 1.82)



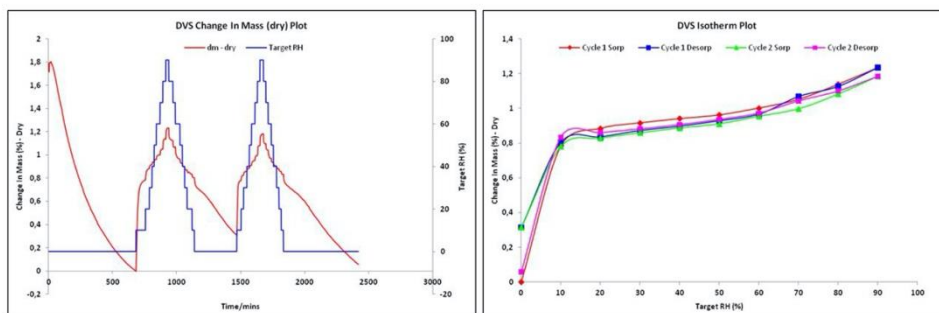
15

Figure S11: ¹H-NMR (chloroform-*d*; delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of CoQ₁₀-H₂-3,4-DHBA-H₂O



16

Figure S12: DVS (a) and DVS isotherm (b) CoQ₁₀-H₂-3,4-DHBA-H₂O; T^o: 25.3 °C; Mass constancy: 0.001%; Time limit for each step: 1440 minutes

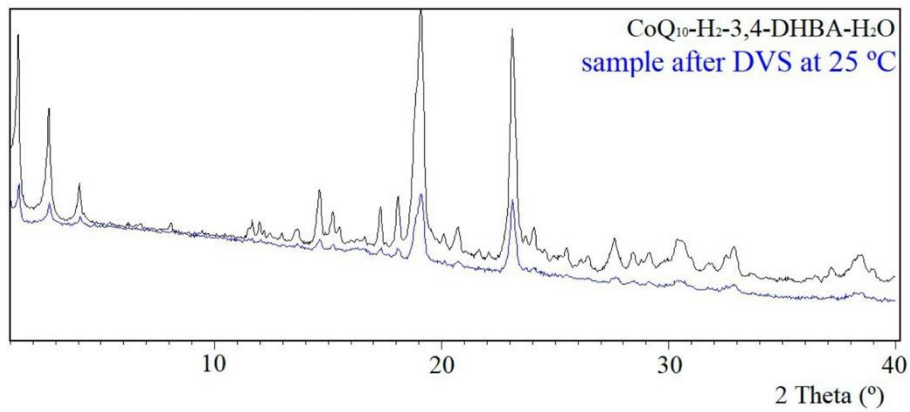


(a)

(b)

17

Figure S13: Comparative PXRD diffractograms of cocrystal hydrate $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA-H}_2\text{O}$ before (black) and after (blue) DVS analysis at 25 °C



18

Table S3. Elemental analysis determination

EA	Theoretical elemental analysis (%)		Experimental elemental analysis (%)
	Molar ratio		
	C ₁₂₅ H ₁₉₂ O ₁₃	C ₆₆ H ₁₀₀ O ₉	
Element	[2:1:1]	[1:1:1]	
C	78.90	76.41	76.07
H	10.17	9.72	10.53
O	10.93	13.88	13.40

4.- CSD 3,4-Dihydroxybenzoic acid crystal forms reported

37 different crystal forms of 3,4-dihydroxybenzoic acid have been reported in the Cambridge Structural Database (CSD). Among them, one as an anhydrous form, six as monohydrate forms and two solvates (one as an ACN solvate and one as a pyridine solvate), Table S3. Comparative PXRD diffractograms of 3,4-dihydroxybenzoic acid (coformer) and crystal structures reported in CSD are shown in Figure S8.

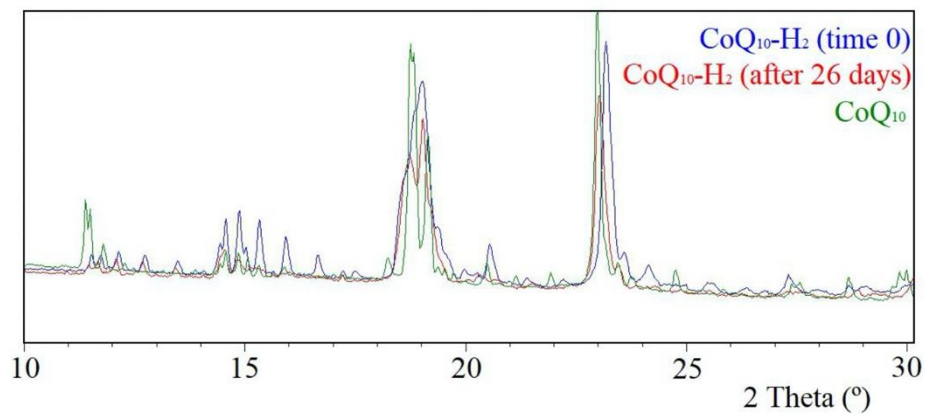
Table S4. CSD 3,4-Dihydroxybenzoic acid crystal forms

Crystal form	CSD refcode	T (K)	References
Anhydrous	WUYNUA	298	1
Monohydrate	BIJDON	295 ^a	2
	BIJDON01	295 ^a	
	BIJDON02	295 ^a	3
	BIJDON03	293	
	BIJDON04	298	
ACN solvate	BIJDON05	100	4
	EDUWUW	120	5
Pyridine solvate	WADJUI	296	6

^a No 3D coordinates available

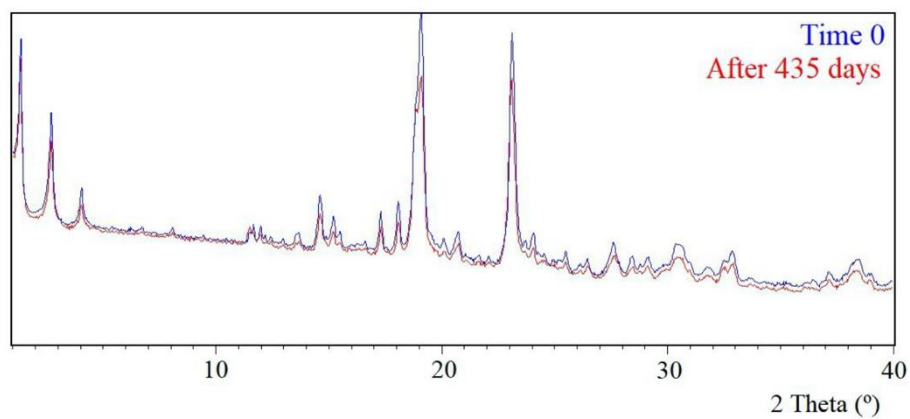
5.- Stability standard conditions (PXRD analysis)

Figure S14: Comparative PXRD diffractograms from 10 to 30 2θ of ubiquinol (CoQ₁₀-H₂) at time 0 (blue) and after 26 days (red) with ubiquinone (CoQ₁₀) (green) under standard condition: at 25 °C and 60% of relative humidity



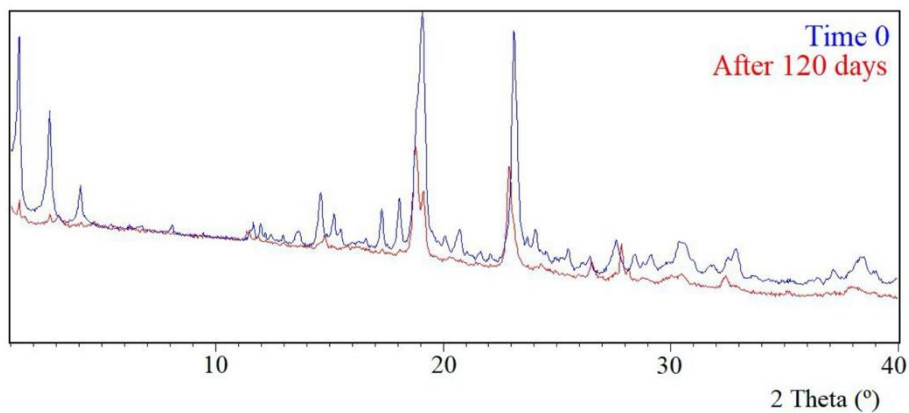
20

Figure S15: Comparative PXRD diffractograms of cocystal hydrate CoQ₁₀-H₂-3,4-DHBA-H₂O at time 0 (blue) and after 435 days (red) under standard condition: at 25 °C and 60% of relative humidity



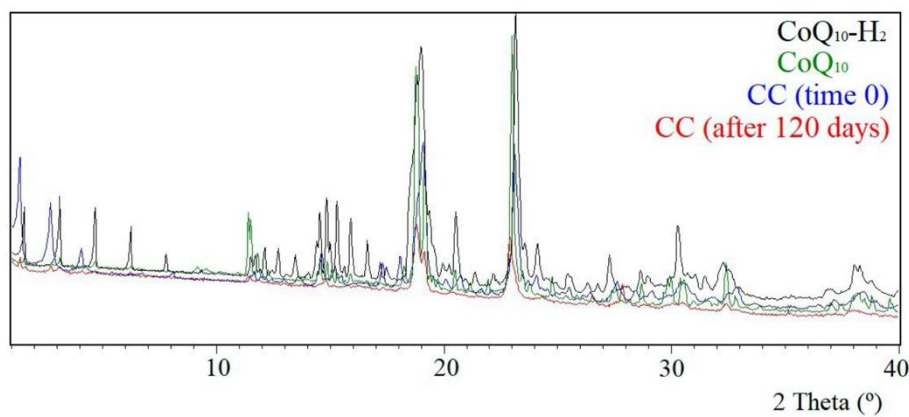
21

Figure S16: Comparative PXRD diffractograms of cocrystal hydrate $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA-H}_2\text{O}$ at time 0 (blue) and after 120 days (red) under standard condition: at 40 °C and 75% of relative humidity



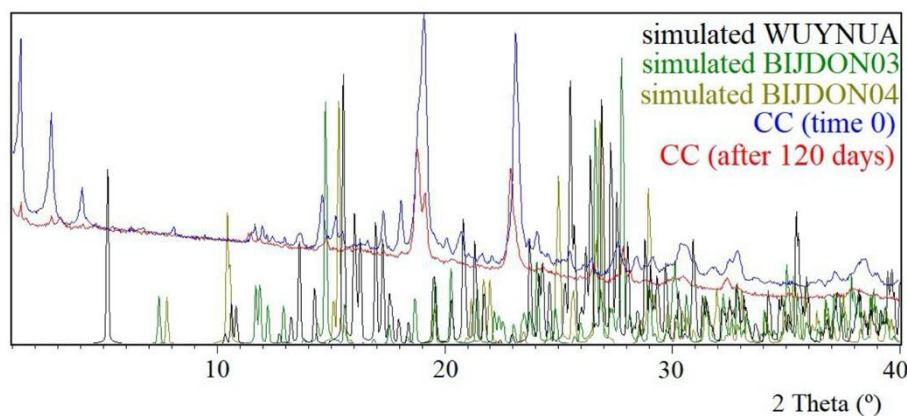
22

Figure S17: Comparative PXRD diffractograms of cocrystal hydrate $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2\text{-3,4-DHBA-H}_2\text{O}$ at time 0 (blue) and after 120 days (red) under standard condition at 40 °C and 75% of relative humidity respect to ubiquinol ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) (black) and ubiquinone (CoQ_{10}) (green)



23

Figure S18: Comparative PXRD diffractograms of cocrystal hydrate CoQ₁₀-H₂-3,4-DHBA-H₂O at time 0 (blue) and after 120 days (red) under standard condition at 40 °C and 75% of relative humidity respect to 3,4-DHBA anhydrous (WUYNUA) (black) and monohydrates (BIJDON03) (green) and (BIJDON04) (olive)



24

6.- References

- [1] Sarma, B., Sanphui, P., Nangia, A. Polymorphism in Isomeric Dihydroxybenzoic Acids, *Crystal Growth & Design*, **2010**, *10*(5), 2388-2399.
- [2] Agmon, I., Herbstein, F. H. Spontaneous deformation of protocatechuic acid monohydrate crystals: crystallographic aspects, *Proc. R. Soc. Lond.*, **1983**, *A387*, 311-330.
- [3] Horneffer, V., Dreisewerd, K., Lüdemann, H.-C., Hillenkamp, F., Läge, M., Strupat, K. Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid, *International Journal of Mass Spectrometry*, **1999**, *185/186/187*, 859-870.
- [4] Ng, S. W. A triclinic modification of 3,4-dihydroxybenzoic acid monohydrate, *Acta Cryst.* **2011**, *E67*, o2476.
- [5] Mazurek, J., Dova, E., Helmond, R. 3,4-Dihydroxybenzoic acid acetonitrile solvate at 120 K, *Acta Cryst.* **2007**, *E63*, o3289.
- [6] Zhu, L.-C. 3,4-Dihydroxybenzoic acid pyridine monosolvate *Acta Cryst.*, **2010**, *E66*, o3225.
- [7] Method for producing reduced Coenzyme Q10, US2015/0284311A1. Publication date: 8 October 2015, priority JP2012-103687 (27 April 2012).

25

A New and Highly Stable Cocrystal of Vitamin D₃ for its use in enhanced food supplements

Lidia Bofill^a, Dafne de Sande,^b Rafael Barbas,^b and Rafel Prohens^{*a,b}

^a Center for Intelligent Research in Crystal Engineering S.L. Spain

^b Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

Electronic Supplementary Information

Table of contents:

1. Crystal data and structure refinement.....	2
2. Synthesis of Vitamin D ₃ – Resorcinol cocrystals.....	4
3. Characterization of the Vitamin D ₃ – Resorcinol cocrystals.....	5
4. Evaluation of Vitamin D ₃ stability by HPLC-UV method	15
5. Stability under 25°C/57% RH and 40°C/75% RH conditions by PXRD	18
6. Dissolution rate determination.....	20
7. References.....	22

1. Crystal data and structure refinement

1.1 Resorcinol cocrystal (Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystal (form A)) (1:1)

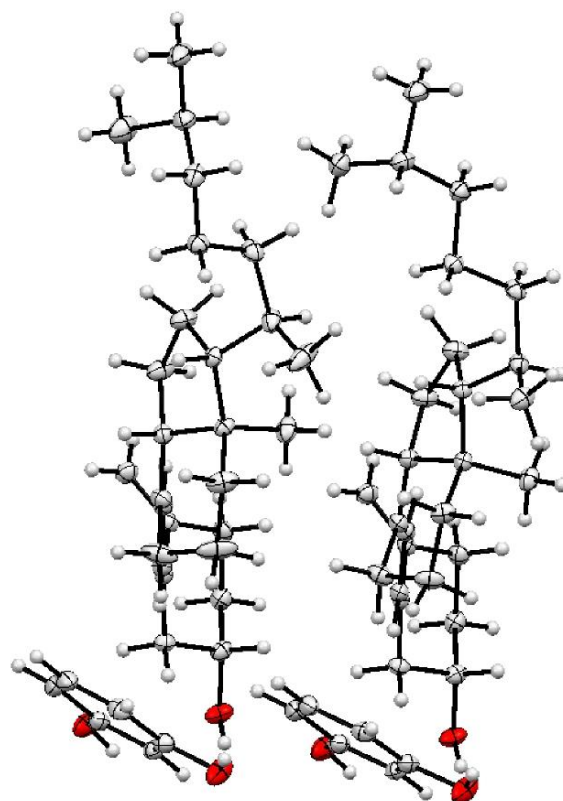
Table S1. Crystal data and structure refinement for mo_023YB63_0m_a.

Identification code	mo_023YB63_0m_a		
Empirical formula	C ₃₃ H ₅₀ O ₃		
Formula weight	494.73		
Temperature	100(2) K		
Wavelength	0.71073 Å		
Crystal system	Orthorhombic		
Space group	P 21 21 21		
Unit cell dimensions	a = 10.2434(2) Å	α = 90°.	
	b = 11.8818(3) Å	β = 90°.	
	c = 48.6215(12) Å	γ = 90°.	
Volume	5917.7(2) Å ³		
Z	8		
Density (calculated)	1.111 Mg/m ³		
Absorption coefficient	0.069 mm ⁻¹		
F(000)	2176		
Crystal size	0.633 x 0.312 x 0.248 mm ³		
Theta range for data collection	2.157 to 30.043°.		
Index ranges	-14<=h<=14, -12<=k<=16, -66<=l<=68		
Reflections collected	50751		
Independent reflections	17131 [R(int) = 0.0343]		
Completeness to theta = 25.242°	99.3 %		
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents		
Max. and min. transmission	0.7460 and 0.6524		
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²		
Data / restraints / parameters	17131 / 0 / 661		
Goodness-of-fit on F ²	1.051		
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0476, wR2 = 0.1018		
R indices (all data)	R1 = 0.0596, wR2 = 0.1090		
Extinction coefficient	n/a		
Largest diff. peak and hole	0.297 and -0.214 e.Å ⁻³		

Table S2. Hydrogen bonds for VD₃ – Resorcinol cocrystal (form A) [Å and °]

Donor --- H...Acceptor	[ARU]	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D–H...A)
O1B --H1BO ..O3B	[x,1+y,z]	0.84	2.59	3.1456(19)	124
O2B --H2BO ..O1B	[-1+x,-1+y,z]	0.84	1.87	2.6819(19)	164
O1A --H1AO .. O3B	[]	0.84	2.61	3.1552(19)	123
O3A --H3AO ..O2A	[1/2+x,3/2-y,1-z]	0.81(3)	1.99(3)	2.788(2)	165.8(5)
O3B --H3BO ..O2B	[1/2+x,1/2-y,1-z]	0.85(3)	1.93(2)	2.763(2)	164.1(5)
O2A --H2AO ..O1A	[-1+x,y,z]	0.84	1.87	2.6974(19)	168

Figure S1: ORTEP representation of the asymmetric unit of Vitamin D₃ - Resorcinol cocrystal (form A)



2. Synthesis of Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystals

Synthesis of the new anhydrous forms of Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystals were conducted by crystallization methodologies. Details of synthesis are as follows:

Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystal (form A)

Bulk powder

Vitamin D₃ (500 mg, 1.30 mmol) and resorcinol (143 mg, 1.30 mmol) were stirred in pentane (3.0 mL). Then, acetone (2.0 mL) was added until total dissolution. The clear solution was air-opened and kept at 4-6 °C. A yellow glassy oil was observed after 23 days and it was dried under vacuum until a solid crystallized.

Single crystal

Vitamin D₃ (500 mg, 1.30 mmol) and resorcinol (143 mg, 1.30 mmol) were stirred in pentane (3.0 mL). Then, acetone (2.0 mL) was added until total dissolution. The clear solution was air-opened and kept at 4-6 °C. A single crystal was observed after 6 months.

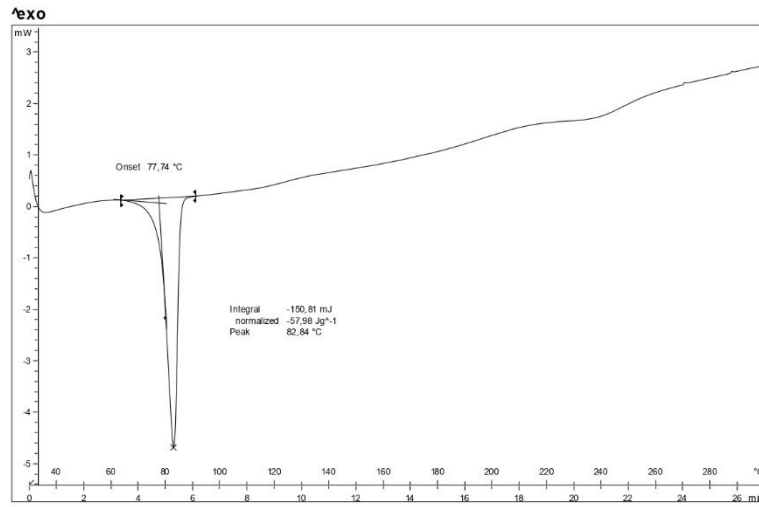
Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystal (form B)

Bulk powder

A concentrated solution of resorcinol in ACN was prepared (300 mg in 0.1 mL). A suspension was prepared by adding Vitamin D₃ (150 mg, 0.39 mmol) and it was stirred overnight at 25 °C. A clear solution was obtained the day after and it was air-opened and kept at 4-6 °C. A solid was observed after 9 days and it was filtered and dried under vacuum.

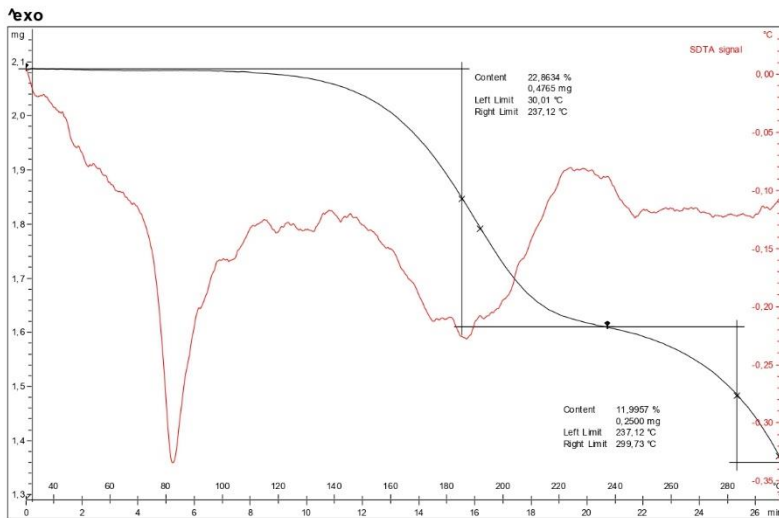
3. Characterization of the Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystals

Figure S2: DSC of Vitamin D₃- Resorcinol cocrystal (form A)



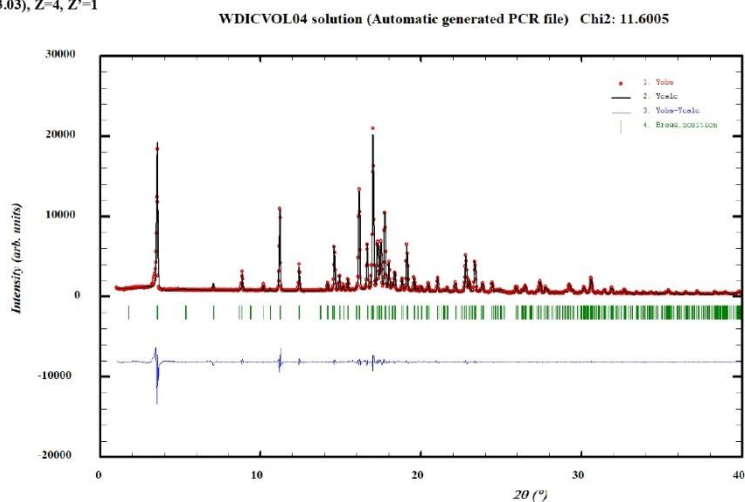
5

Figure S3: TGA of Vitamin D₃ - Resorcinol cocrystal (form A): the TGA analysis does not show a weight loss before melting



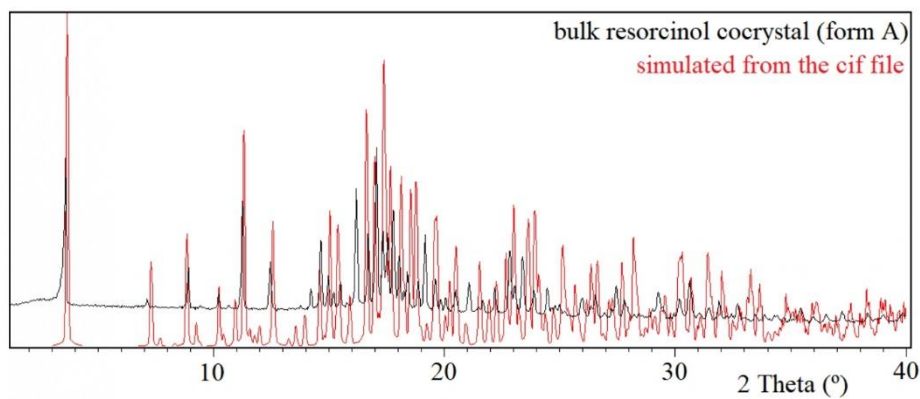
6

Figure S4: The XRPD of Vitamin D₃ – Resorcinol cocystal (form A) has been indexed at 298K with the following proposed orthorhombic cell: a=49.93(1) Å, b=10.174(2) Å, c=6.1072(8) Å, V=3102.5(9) Å³ (Figures of Merit: M= 71, F= 229), with number of impurities equal to zero. A P2₁2₁2₁ space group is compatible with the cell and the cell volume is compatible with 4 molecules of Vitamin D₃ and 4 molecules of resorcinol. (R_{wp}: 10.3; R_{exp}: 3.03), Z=4, Z'=1



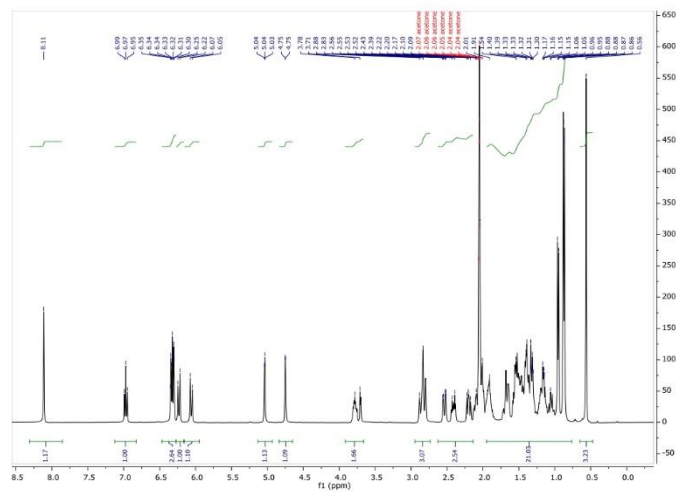
7

Figure S5: The structure of the Vitamin D₃:resorcinol cocystal was determined by single crystal X-ray diffraction at 100K showing a 1:1 molar ratio, with the following orthorhombic cell: a=10.2434(2) Å, b=11.8818(3) Å, c=48.6215(12) Å, V=5917.7(2) Å³, Z=8, Z'=2 and P2₁2₁2₁ space group. (R_{int} (%) = 3.43; R-Factor (%) = 4.76). Comparative XRPD diffractograms of bulk Vitamin D₃:resorcinol cocystal (form A) and simulated from the cif are shown



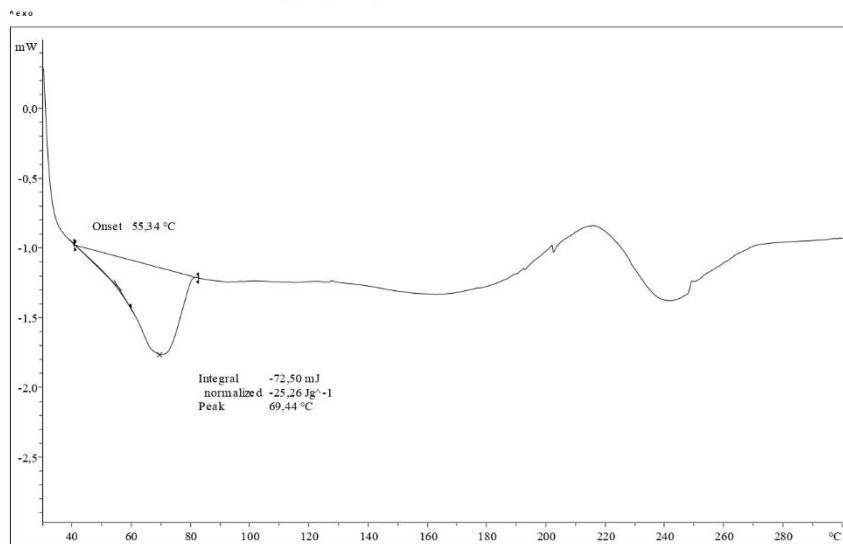
8

Figure S6: ¹H-NMR (acetone-*d*₆; delay: 1/pulse: 45°/scans: 32) of Vitamin D₃ - Resorcinol cocrystal (form A)



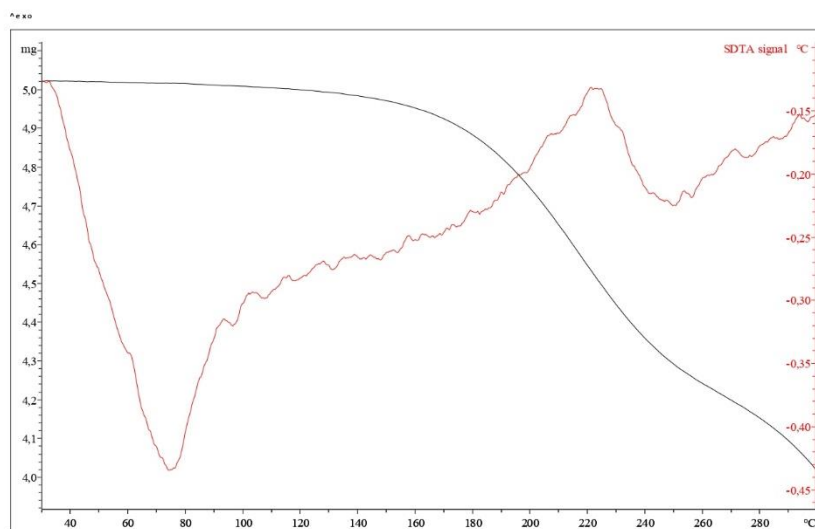
9

Figure S7: DSC of Vitamin D₃ - Resorcinol cocrystal (form B)



10

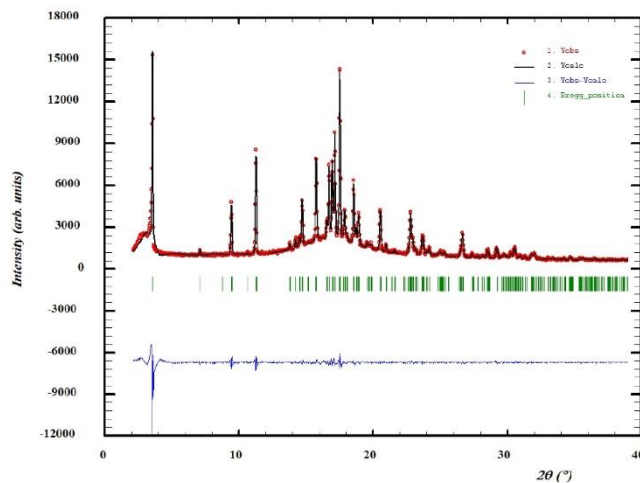
Figure S8: TGA of Vitamin D₃ - Resorcinol cocystal (form B): the TGA analysis does not show a weight loss before melting



11

Figure S9: The XRPD of the Vitamin D₃ - Resorcinol cocystal (form B) has been indexed at 298K with the following proposed monoclinic cell: $a=24.96(1) \text{ \AA}$, $b=10.117(2) \text{ \AA}$, $c=6.121(1) \text{ \AA}$, $\beta=93.53(2)^\circ$, $V=1543.0(8) \text{ \AA}^3$ (Figures of Merit: $M=89$, $F=297$), with number of impurities equal to zero. A $P2_1$ space group is compatible with the cell and the cell volume is compatible with 2 molecules of Vitamin D₃ and 2 molecules of resorcinol. (R_{wp} : 7.99; R_{exp} : 2.59), $Z=2$, $Z'=1$

WDICVOL04 solution (Automatic generated PCR file) Chi2: 9.5235



12

4. Evaluation of Vitamin D₃ stability by HPLC-UV method

Table S3. Photostability. Vitamin D₃ (Vit D₃) concentrations found in samples (mean ± standard deviation), expressed as percentage respect to the concentration at time 0

Sample	Time (days)				
	0	7	16	23	61
Vit D ₃	100.0 ± 8.3	105.8 ± 10.1	98.7 ± 21.1	66.1 ± 7.5	21.8 ± 1.1
Vit D ₃ – Resorcinol	100.0 ± 5.9	104.5 ± 2.5	91.4 ± 17.5	89.0 ± 5.4	69.0 ± 2.0

Table S4. Average of relatively humidity and temperature conditions along analysis day

Sample	Time (days)				
	0	7	16	23	61
Relative humidity (%)	60.8 ± 5.5	50.6 ± 3.6	48.4 ± 1.5	44.8 ± 1.6	48.4 ± 1.6
Temperature (°C)	23.4 ± 1.3	23.7 ± 0.3	26.1 ± 0.3	26.4 ± 0.3	25.4 ± 0.3

15

Table S5. Stability in premixes under 25 °C / 57% RH normal conditions. Vitamin D₃ (Vit D₃) concentrations found in samples (mean ± standard deviation), expressed as percentage respect to the concentration at time 0

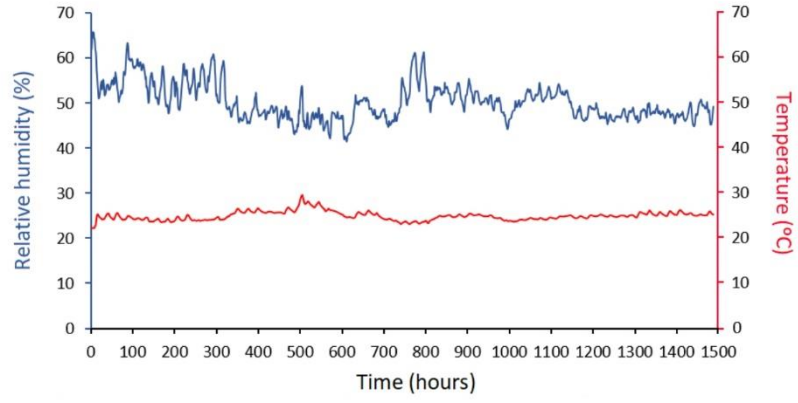
Sample	Time (days)			
	12	32	60	90
Vit D ₃	76.0 ± 12.7	68.1 ± 0.2	27.2 ± 3.3	19.0 ± 0.6
Vit D ₃ – Resorcinol	83.4 ± 0.1	63.3 ± 2.7	61.0 ± 4.8	54.6 ± 9.3

Table S6. Stability in premixes under 40 °C / 75% RH stress conditions. Vitamin D₃ (Vit D₃) concentrations found in samples (mean ± standard deviation), expressed as percentage respect to the concentration at time 0

Sample	Time (days)	
	12	32
Vit D ₃	32.5 ± 3.0	2.9 ± 0.3
Vit D ₃ – Resorcinol	33.1 ± 4.2	3.8 ± 0.3

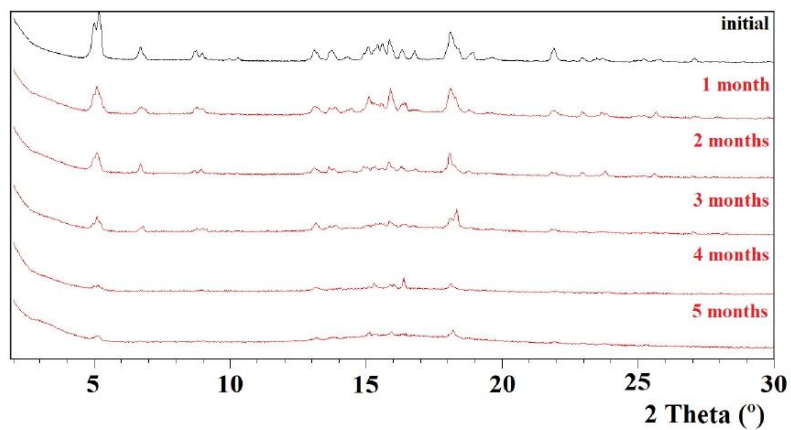
16

Figure S12: Evolution of relative humidity and temperature conditions throughout the photostability study

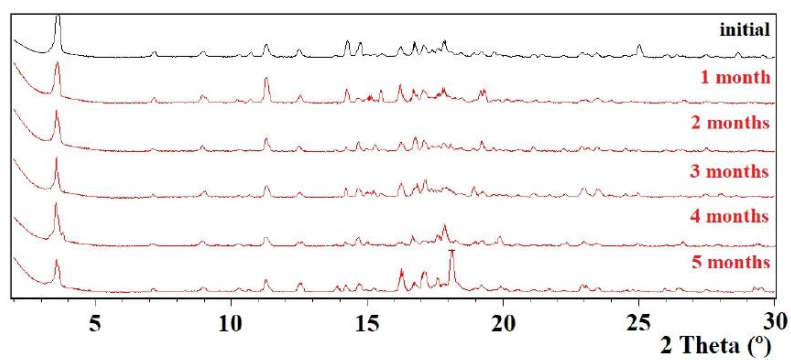


5. Stability under 25 °C / 57% RH and 40 °C / 75% RH conditions by PXRD

Figure S13: Comparative PXRD diffractograms of Vitamin D₃ (a) and Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystal (form A) (b) under 25 °C / 57% RH normal conditions

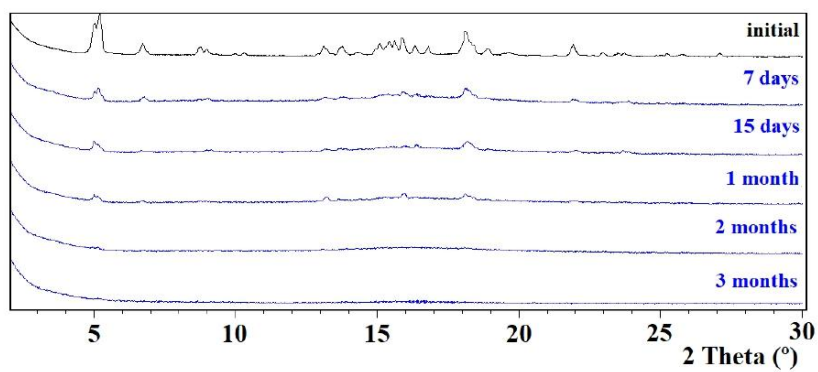


(a)

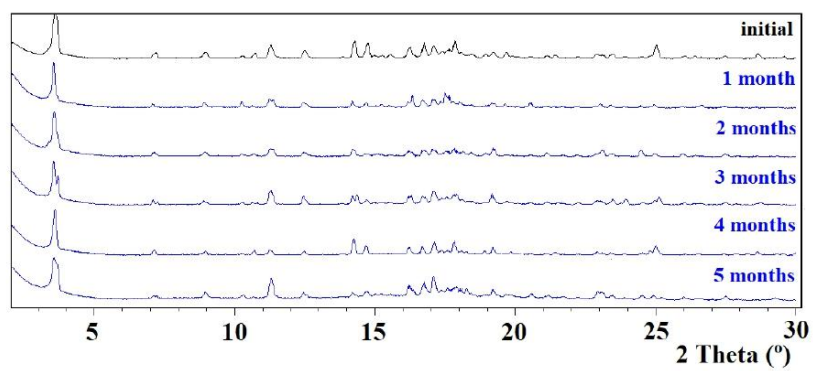


(b)

Figure S14: Comparative PXRD diffractograms of Vitamin D₃ (a) and Vitamin D₃ – Resorcinol cocrystal (form A) (b) under 40 °C / 75% RH stress conditions



(a)



(b)

6. Dissolution rate determination

Dissolution test of Vitamin D₃ (Vit D₃) was first performed for 2 hours at 25 °C. However, it was observed that after some minutes of dissolution, spectra of Vitamin D₃ changed, appearing a new absorption band at 350 nm and that the intensity of this band increases with time. Figures S15 shows the molar extinction coefficient of Vitamin D₃, which presents a maximum of absorption around 272 nm.

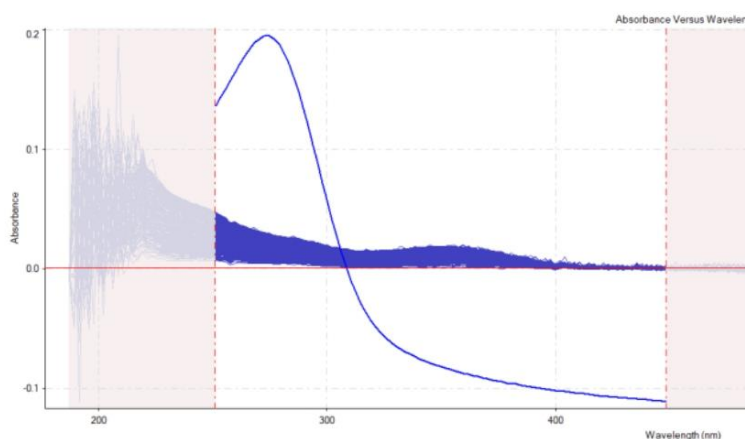


Figure S15: Vitamin D₃ MEC and dissolution rate spectra

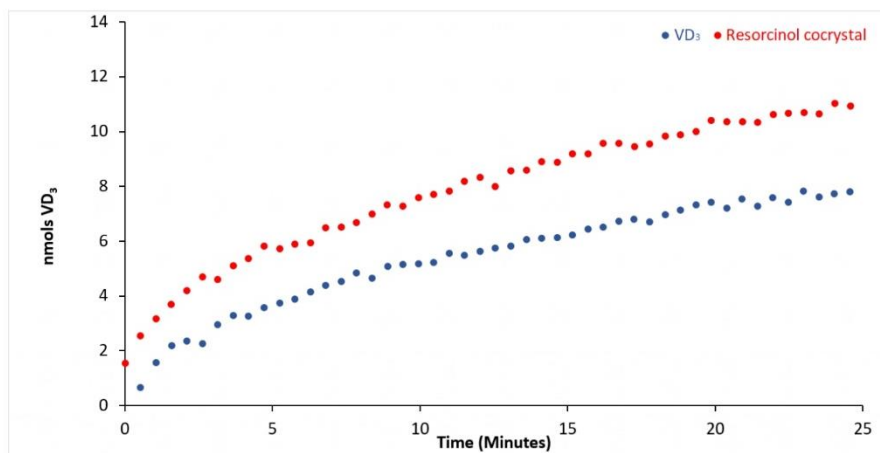
Literature reports several degradation products (mainly isomeric forms) for Vitamin D₃, which can be formed by the effect of temperature and acidic environments, among other conditions.¹ However, none of the reported degradation products show absorption maximums close to 350 nm. Although the medium in which spectra have been acquired is not the same (mixture of methanol/water in the literature and FaSSIF v2 in the present work) absorption maximums are too different to assign the band obtained in the dissolution spectra to any of the reported degradation products.

As a consequence, the duration of the dissolution rate experiments was reduced to 25 minutes, since the presence of degradation products was hardly detectable in this shorter time frame.

Table S7. Dissolution rate of Vitamin D₃ and Vit D₃ –Resorcinol cocystal (form A)

Sample	Vit D ₃ Dissolution rate (nmol/min)	Temperature (°C)	Replicates
Vitamin D ₃	0.58 ± 0.14	23.3	5
Vit D ₃ – Resorcinol	0.94 ± 0.22	23.5	4

Figure S16: Dissolution rate profiles of Vitamin D₃ (blue) and Vit D₃ - Resorcinol cocrystal (red) at 25 °C



7. References

- [1] Mahmoodani, F.; Perera, C.O.; Fedrizzi, B.; Abernethy, G.; Chen, H. Degradation studies of cholecalciferol (Vitamin D₃) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chemistry*, **2017**, *219*, 373-381.

