UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LUAN FARINELLI DINIZ

**Planejamento, obtenção e caracterização de novas formas sólidas de
fármacos tuberculostáticos**

São Carlos
2017

LUAN FARINELLI DINIZ

**Planejamento, obtenção e caracterização de novas formas sólidas de
fármacostuberculosstáticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Javier Alcides Ellena

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Diniz, Luan Farinelli

Planejamento, obtenção e caracterização de novas formas sólidas de fármacos tuberculostáticos / Luan Farinelli Diniz; orientador Javier Alcides Ellena - versão corrigida -- São Carlos, 2017.
161 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Tuberculose. 2. Engenharia de cristais. 3. Química supramolecular. 4. Difração de raios X. 5. Propriedades físico-químicas. I. Ellena, Javier Alcides, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Gessé e Sagramor, à minha avó Leninha e a minha amada noiva Tayane, por todo amor, paciência e incentivo a mim dedicados. Simplesmente amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gessé e Sagamor, pelo apoio, confiança, carinho e por terem me ensinado os valores da vida, vocês são simplesmente maravilhosos. Minha singela e humilde retribuição por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha avó Leninha, por todo carinho e amor e por sempre ter estado ao meu lado durante toda a minha vida.

À minha amada noiva Tayane, por todo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao prof. Dr. Javier Ellena, pela orientação, disposição e ajuda. Além da oportunidade oferecida para trabalhar no seu grupo de pesquisa, que contribuiu muito para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus companheiros de laboratório e convivência diária: Matheus, Paulo, Juan, Marcelo, Adilson, Gerson, Alfredo, Natália e Kátia pelos gratos momentos, comemorações e discussões. E aos nossos colaboradores que passaram pelo laboratório: Cristiane, Cecília e Richard.

Às prof. Dr. Renata Diniz da Universidade Federal de Minas Gerais e Charlane Cimini Corrêa da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela colaboração na realização das medidas de difração de raios X por monocristal.

Aos prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala da Universidade Federal do Ceará e Luiz Fernando Cappa de Oliveira da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela colaboração na aquisição dos espectros infravermelho e Raman.

Ao técnico José Augusto Lopes da Rocha do Grupo de Cristalografia do IFSC-USP, pela realização das medidas de difração de raios X por policristais.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela oportunidade e a formação recebida. Aos professores do instituto e em especial à secretaria da pós-graduação.

À FAPESP pela bolsa concedida.

A TODOS que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O que faz sernos grandes é não perder o futuro de vista.
É criar desafios, calcular riscos, avançando sempre.
É chegar a um porto, fincar a bandeira da conquista e
nesse mesmo instante começar a buscar outros portos.”*

Mário Quintana

RESUMO

DINIZ, L. F. **Planejamento, obtenção e caracterização de novas formas sólidas de fármacos tuberculostáticos**. 2017. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

As propriedades no estado sólido de um insumo farmacêutico ativo (IFA) estão diretamente relacionadas com a eficácia terapêutica de um medicamento. Entre todas as propriedades físicas e químicas, que são dependentes do arranjo cristalino do IFA, destaca-se a solubilidade e a estabilidade, que são as características mais importantes de um fármaco, na medida em que podem alterar a biodisponibilidade. Dentro dessa perspectiva, a engenharia de cristais tem cada vez mais se consolidado como uma estratégia para aperfeiçoar as propriedades no estado sólido de um IFA. Neste trabalho, oito novas formas sólidas cristalinas, entre sais e cocristais, dos fármacos com ação anti-tuberculose etionamida (ETH), etambutol (ETB) e isoniazida (INH), foram preparadas e tiveram suas estruturas cristalinas determinadas por difração de raios X por monocristal. Além disso, todas as modificações cristalinas obtidas foram caracterizadas por difração de raios X por policristais, espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e microscopia ótica térmica. Por fim, estudos de solubilidade em equilíbrio e de estabilidade em atmosfera úmida também foram realizados. A nova modificação cristalina da ETH, o sal nitrato de ETH, foi planejada visando melhorar a solubilidade aquosa deste IFA ($\sim 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$). Este é o primeiro relato de uma estrutura de ETH que cristalizou com quatro independentes pares iônicos ($\text{ETH}^+/\text{NO}_3^-$) na unidade assimétrica. A análise do empacotamento cristalino e das interações intermoleculares permitiu estabelecer os atributos estruturais que explicam a menor estabilidade térmica e a elevada solubilidade (cerca de 300 vezes maior) deste sal, em comparação com a forma neutra da ETH. A preparação dos novos sais de ETB foi feita considerando o caráter básico da molécula, o que permitiu a obtenção de três novos sais a partir da reação do ETB com os ácidos oxálico, maleico e tereftálico. O desenho dessas formas sólidas teve como principal objetivo minimizar os efeitos da elevada higroscopicidade do ETB, que é tão prejudicial para formulações farmacêuticas. Este objetivo foi alcançado, uma vez que o sal oxalato de ETB, reportado neste trabalho, mostrou ser não-higroscópico. Por fim, quatro novos cocristais da INH, sendo dois cocristais polimórficos, foram preparados por meio de reações estequiométricas deste IFA com ácidos carboxílicos aromáticos derivados do ácido benzóico. O desenho dessas novas modificações cristalinas teve como

intuito principal explorar a diversidade de síntons supramoleculares formados entre a INH e moléculas contendo o grupo COOH. A análise dos empacotamentos cristalinos das formas I e II do cocrystal INH-PABA, mostrou que este é um típico caso de polimorfismo orientacional. Portanto, os resultados desta dissertação trazem importantes contribuições científicas para a diversidade de formas sólidas, apresentando revelância para o setor farmacêutico no que se refere ao desenvolvimento de novas formulações contendo fármacos anti-tuberculose.

Palavras-chaves: Tuberculose. Engenharia de cristais. Química supramolecular. Difração de raios X. Propriedades físico-químicas.

ABSTRACT

DINIZ, L. F. **Design, production and characterization of new solid forms of tuberculostatic drugs**. 2017. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Solid state properties of an active pharmaceutical ingredients (API) are directly related to drug performance. Among all physical and chemical properties dependent on the crystal arrangement of a drug, stability and solubility are the main ones that alter its bioavailability. In this sense, crystal engineering is a strategy to improve solid state properties of drugs. In this work, eight new multicomponent solid forms (salts and cocrystals) of the tuberculostatic drugs ethionamide (ETH), ethambutol (ETB) and isoniazid (INH) were prepared and their crystal structures were elucidated by single crystal X-ray diffraction. In addition, the crystal modifications were also characterized by powder X-ray diffraction, infrared and Raman vibrational spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and Hot-stage microscopy. Finally, equilibrium solubility studies and stability experiments in humid atmosphere were also performed. The new supramolecular modification of ETH, ethionamide nitrate salt, was designed in order to improve the aqueous solubility of the API ($\sim 0.4 \text{ mg mL}^{-1}$). This salt is the first ETH structure that has been crystallized with four independent ionic pairs ($\text{ETH}^+/\text{NO}_3^-$) in the asymmetric unit. The analysis of crystal packing and intermolecular interactions allowed to establish the structural attributes that explain the lower thermal stability and high solubility (about 300 times higher) of this salt compared to the neutral ETH form. Due its high hygroscopicity, ETB is known for catalyzing the degradation of isoniazid and rifampicin pharmaceutical formulations. In order to avoid or even minimize these mutual drug-drug interactions, in this work we have focused on the development of less hygroscopic multicomponent solid forms of ETB. The preparation of the new ETB crystal modifications was carried out considering the pKa values of the molecule, which allowed the design of three new salts (namely oxalate, maleate and terephthalate). These salts were obtained from the reaction of ETB with the carboxylic acids: oxalic, maleic and terephthalic. The hygroscopic nature of these salts was evaluated and all of them were found to be hygroscopic, with exception of ETB oxalate. Finally, four novel INH cocrystals, being two polymorphic forms, with aromatic carboxylic acids derivatives were rationally prepared. The design of these crystal forms aimed to explore the diversity of supramolecular synthons

formed between INH and molecules containing COOH. The crystal packing analysis of the INH-PABA cocrystals (polymorphs I and II), showed that this is a typical case of orientational polymorphism. Therefore, the scientific contributions of this work show the diversity of the solid forms and define candidates to new anti-tuberculosis API's solid formulations.

Keywords: Tuberculosis. Crystal engineering. Supramolecular chemistry. X-ray diffraction. Physico-chemical properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Combinação das diferentes formas sólidas multicomponentes de IFA's	27
Figura 2 – Etapas envolvidas no desenho de novas formas sólidas multicomponentes de um IFA	32
Figura 3 – Estruturas químicas dos fármacos e coformadores utilizados neste trabalho	41
Figura 4 – Principais sítions supramoleculares e padrões de ligação de hidrogênio observados nas estruturas dos cocristais de INH	44
Figura 5 – Unidade assimétrica do sal nitrato de etionamida	58
Figura 6 – Estrutura da ETH mostrando os grupamentos flexíveis tioamida e etila e os ângulos de torção τ e χ	59
Figura 7 – Sobreposição dos anéis piridínicos dos quatro diferentes coformadores ETH^+	59
Figura 8 – Vista das duas cadeias independentes e simétricas I e II. As moléculas amarela, azul, vermelha e verde representam, respectivamente, os coformadores A, B, C e D	60
Figura 9 – (a) Folhas 2-D formadas pela ligação das cadeias I/II a partir das ligações de hidrogênio $N1(A)-H1(A)\cdots O3(C)$. (b) Representação parcial do empacotamento cristalino mostrando o empilhamento das cadeias ao longo da direção [100]. (c) Empacotamento cristalino 3-D do sal nitrato de etionamida	62
Figura 10 – (a) Folhas 2-D formadas pela ligação das cadeias I/I a partir do padrão de interações tipo anel com código $R_4^4(12)$. (b) Folhas 2-D formadas pela ligação das cadeias II/II a partir do padrão de interações tipo anel com código $R_4^4(14)$. As moléculas amarela, azul, vermelha e verde representam, respectivamente, os coformadores A, B, C e D. (c) As duas folhas formadas estão interpenetradas de maneira inclinada, resultado do cruzamento entre elas no arranjo supramolecular. (d) Ângulo diedral entre os planos do ânion nitrato e o anel piridíneo no par iônico A	62
Figura 11 – Comparação dos difratogramas experimental e simulado do sal nitrato de etionamida ($ETHNO3$)	63
Figura 12 – (a) Espectros no infravermelho do fármaco etionamida (azul) e do sal nitrato de etionamida (vermelho). (b) Espectros Raman do fármaco etionamida (azul) e do sal nitrato de etionamida (vermelho)	64
Figura 13 – Curvas TG e de CED do sal nitrato de etionamida ($ETHNO3$)	66
Figura 14 – Microscopia ótica e análise térmica por <i>Hot-Stage</i> de um cristal do sal nitrato de etionamida ($ETHNO3$)	67

Figura 15 – Valores de solubilidade em equilíbrio encontrados para a ETH e para o sal ETHNO ₃ nos diferentes meios de dissolução.....	68
Figura 16 – (a) Difratomogramas experimentais dos resíduos sólidos provenientes dos experimentos de solubilidade da ETH nos diferentes meios de dissolução. (b) Difratomogramas experimentais dos resíduos sólidos obtidos a partir dos experimentos de solubilidade do sal ETHNO ₃ nos diferentes meios de dissolução. Os padrões de difração calculados de cada composto foram incluídos para comparação	70
Figura 17 – Unidade assimétrica do sal oxalato de etambutol (ETBOXA).....	73
Figura 18 – (a) Empacotamento cristalino do sal ETBOXA ao longo da direção [100]. (b) Representação das ligações de hidrogênio das cadeias 1D ao longo da direção [001]. (c) Visão parcial do empacotamento mostrando as cadeias independentes formadas pelos ânions OXAH ⁻ ao longo da direção [100]	74
Figura 19 – Unidade assimétrica do sal maleato de etambutol (ETBMAL).....	75
Figura 20 – (a) Empacotamento cristalino do sal ETBMAL no plano <i>bc</i> . (b) Arranjo das cadeias 1D independentes formadas entre o cátion [ETBH ₂] ²⁺ e o ânion MALH ⁻ ao longo do eixo <i>b</i> . (c) Representação dos síntons R ₂ ² (7) de ânions maleatos que estão conectados entre si via ligações de hidrogênio do tipo C–H···O ao longo do eixo <i>a</i> (c).....	77
Figura 21 – Unidade assimétrica do sal tereftalato de etambutol (ETBTRF).....	78
Figura 22 – (a) Empacotamento cristalino do sal ETBTRF no plano <i>bc</i> mostrando que camadas dos cátions [ETBH ₂] ²⁺ e ânions TRF ²⁻ estão empilhadas de maneira alternada na estrutura. (b) O sínton supramolecular NH ⁺ ···COO ⁻ leva a formação de um padrão de interações tipo anel com código R ₄ ⁴ (12). (c) Ao longo do eixo <i>b</i> interações do tipo O–H···O e C–H···π conectam os padrões de interações tipo anel com código R ₄ ⁴ (12) adjacentes	79
Figura 23 – Sobreposição das conformações moleculares do Etambuírol (cinza) e das três unidades catiônicas, [ETBH ₂] ²⁺ , dos sais: oxalato de etambutol (azul), maleato de etambutol (vermelho) e tereftalato de etambutol (roxo). A sobreposição foi feita através do fragmento N1–C5–C6–N2 de cada molécula.....	80
Figura 24 – Difratomogramas experimentais e calculados dos sais oxalato, maleato e tereftalato de etambutol. Os padrões teóricos de DRXP do sal cloridrato de etambutol e do etambutol (base livre) foram acrescentados para comparação com os demais difratogramas	81

Figura 25 – Espectros na região do infravermelho do fármaco etambutol (ETB) e dos sais: oxalato de etambutol (ETBOXA), maleato de etambutol (ETBMAL) e tereftalato de etambutol (ETBTRF)	82
Figura 26 – Curvas TG e de CED dos compostos: (a) etambutol (base livre), (b) oxalato de etambutol, (c) maleato de etambutol e (d) tereftalato de etambutol	84
Figura 27 – Microscopia ótica e análise térmica por <i>Hot-Stage</i> de cristais dos sais: (a) oxalato de etambutol, (b) maleato de etambutol e (c) tereftalato de etambutol	85
Figura 28 – Transformação de sólido para líquido do cloridrato de etambutol motivado pela elevado caráter higroscópico deste sal	86
Figura 29 – Demonstração da natureza não higroscópica do sal oxalato de etambutol. É possível perceber que a amostra permanece sólida mesmo depois de mantida por 48 horas dentro do dessecador com água.....	87
Figura 30 – Curvas TG dos sais de etambutol mostrando as perdas de massa relativa após uma hora (a), seis horas (b) e doze horas (c) em atmosfera úmida (~100% de umidade relativa)	88
Figura 31 – Representação do empacotamento cristalino do sal cloridrato de etambutol nos planos <i>ab</i> (a) e <i>ac</i> (b). As letras (c) e (d) mostram o empacotamento cristalino do sal oxalato de etambutol nos planos <i>ab</i> e <i>ac</i>	89
Figura 32 – Unidade assimétrica dos cocristais: (a) INH-PNBA e (b) INH-PCNBA.....	94
Figura 33 – Visão do empacotamento do cocrystal INH-PNBA na unidade assimétrica. (b) A estrutura em camadas do cocrystal é estabilizada por interações $\pi \cdots \pi$ ($\pi \cdots \pi$). (c) Representação dos heterosíntons $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$ (em azul), formados entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e dos homosíntons formados através de interações entre os grupos hidrazinas da INH que geram dois padrões de interações tipo anel com códigos $R_2^2(6)$ e $R_2^2(10)$, que se estendem ao longo da direção [100].....	95
Figura 34 – Empacotamento do cocrystal INH-PCNBA na unidade assimétrica. (b) Visão do arranjo em camadas do cocrystal. (c) Representação dos síntons supramoleculares: $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$ (em azul), formado entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e dos homosíntons formados através de interações entre os grupos hidrazinas da INH que geram dois padrões de interações tipo anel com códigos $R_2^2(6)$ e $R_2^2(10)$. Além disso, interações do tipo $\pi \cdots \pi$ (em verde) são mostradas	96
Figura 35 – Unidade assimétrica dos cocristais (polimorfos): (a) INH-PABA-I e (b) INH-PABA-II.....	97

Figura 36 – Visão parcial do empacotamento do cocrystal INH-PABA-I ao longo dos eixos <i>a</i> e <i>c</i> . (b) Orientação das moléculas na unidade assimétrica mostrando que o ângulo formado pelos planos das moléculas de PABA-A e PABA-B é de 80,08. (c) Representação dos sítios supramoleculares: COOH...N _{arom} (em azul), formado entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e COOH...N _{hidrazina} (em marrom), formado entre a hidrazina e a carboxila. Além disso, ligações de hidrogênio do tipo N–H...O entre as moléculas de INH e entre as moléculas de PABA levam a formação de cadeias que se estendem infinitamente longo da estrutura	100
Figura 37 – Visão parcial do empacotamento do cocrystal INH-PABA-II ao longo dos eixos <i>a</i> e <i>c</i> . (b) Orientação das moléculas na unidade assimétrica mostrando que o ângulo formado pelos planos das moléculas de PABA-A e PABA-B é de 3,12°. Representação dos heterosítios: COOH...N _{arom} (em azul), formado entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e COOH...N _{hidrazina} (em marrom), formado entre a hidrazina e a carboxila. Cadeias de moléculas de INH e de moléculas de PABA são formadas e estendidas infinitamente ao longo da estrutura através de ligações de hidrogênio do tipo N–H...O	101
Figura 38 – Sobreposição das conformações moleculares da INH provenientes das duas formas polimórficas do cocrystal INH-PABA. A sobreposição foi feita através do anel piridínico de cada molécula e mostra que não há diferença conformacional entre as moléculas de INH em ambos polimorfos	99
Figura 39 – Representação das cadeias de moléculas de PABA mostrando que: (a) no cocrystal INH-PABA-I (polimorfo I) os planos de duas moléculas de INH adjacentes na estrutura formam um ângulo de 73,37° entre si, enquanto que (b) no cocrystal INH-PABA-II (polimorfo II) os planos das moléculas de INH adjacentes na estrutura são praticamente paralelos entre si	102
Figura 40 – Difractogramas experimentais e calculados dos cocristais de INH	103
Figura 41 – Espectros na região do infravermelho do fármaco INH (preto) e dos cocristais: INH-PNBA (verde), INH-PCNBA (roxo), INH-PABA-I (azul) e INH-PABA-II (vermelho)	104
Figura 42 – Curvas TG e de CED da Isoniazida (INH)	107
Figura 43 – Curvas TG e de CED dos cocristais: (a) INH-PNBA, (b) INH-PCNBA, (c) INH-PABA-I (polimorfo I) e (d) INH-PABA-II (polimorfo II)	107
Figura 44 – Microscopia ótica e análise térmica por <i>Hot-Stage</i> dos cocristais: (a) INH-PNBA, (b) INH-PCNBA, (c) INH-PABA-I (polimorfo I) e (d) INH-PABA-II (polimorfo II)	109

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Atual classificação das formas sólidas de IFA's	26
Esquema 2 - Procedimentos envolvidos durante o preparo do sal nitrato de etioanamida	46
Esquema 3 - Procedimentos envolvidos durante o preparo dos novos sais de ETB	48
Esquema 4 - Procedimentos envolvidos durante o preparo dos novos cocristais de INH.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações do ETB com os ácidos dicarboxílicos usados como coformadores.....	43
Tabela 2 - Valores de pKa e de ΔpK_a da INH e dos ácidos carboxílicos usados como coformadores	45
Tabela 3 - Dados cristalográficos e do refinamento do sal nitrato de etionamida.	58
Tabela 4 - Análise do ângulo interno C2-N3-C4 da piridina da ETH e das moléculas A-D do sal ETHNO ₃	59
Tabela 5 - Ângulos de torção (τ and χ) para os diferentes coformadores do cátion ETH ⁺	60
Tabela 6 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal nitrato de etionamida (ETHNO ₃).	60
Tabela 7 - Valores de solubilidade em equilíbrio (em mg/mL) encontrados para a ETH e para o sal ETHNO ₃ nos diferentes meios de dissolução.	68
Tabela 8 - Valores de pH medidos nos meios de dissolução antes e depois dos experimentos de solubilidade.	69
Tabela 9 - Dados cristalográficos e dos refinamentos dos sais de ETB: oxalato, maleato e tereftalato.....	72
Tabela 10 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal oxalato de etambutol (ETBOXA)	73
Tabela 11 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal maleato de etambutol (ETBMAL)	76
Tabela 12 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal tereftalato de etambutol (ETBTRF)	78
Tabela 13 - Ângulos de torção específicos envolvendo as ligações com maiores liberdades conformacionais para a molécula de ETB e para as unidades catiônicas dos sais ETBOXA, ETBMAL e ETBTRF.	80
Tabela 14 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos cocristais de INH.....	93
Tabela 15 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para os cocristais INH-PNBA e INH-PCNBA.....	94
Tabela 16 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para os cocristais INH-PABA-I e INH-PABA-II.....	98
Tabela 17 - Principais atribuições espectroscópicas (em cm ⁻¹) para a INH e os cocristais de INH.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CED	Calorimetria exploratória diferencial
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
DFC	Dose fixa combinada
DN	Doenças negligenciadas
DRX	Difração de raios X
DRXM	Difração de raios X por monocristal
DRXP	Difração de raios X por policristais
ETB	Etambutol
[ETBH ₂] ²⁺	Unidade catiônica do etambutol
ETBMAL	Maleato de etambutol
ETBOXA	Oxalato de etambutol
ETBTRF	Tereftalato de etambutol
ETH	Etionamida
ETH ⁺	Unidade catiônica da etionamida
ETHNO3	Nitrato de etionamida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INH	Isoniazida
INH-PABA-I	Polimorfo I do cocrystal de isoniazida com o ácido <i>p</i> -aminobenzóico
INH-PABA-II	Polimorfo II do cocrystal de isoniazida com o ácido <i>p</i> -aminobenzóico
INH-PCNBA	Cocrystal de isoniazida com o ácido <i>p</i> -cianobenzóico
INH-PNBA	Cocrystal de isoniazida com o ácido <i>p</i> -nitrobenzóico
IV	Infravermelho
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Ministério da saúde
OMS	Organização mundial da saúde
RMN	Ressonância magnética nuclear
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutico
TB	Tuberculose
TG	Termogravimetria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Formas sólidas de insumos farmacêuticos ativos	25
1.1.1	Sais e cocristais farmacêuticos	29
1.1.2	Polimorfismo em sólidos farmacêuticos.....	30
1.2	Engenharia de cristais e química supramolecular.....	31
1.3	Tuberculose e fármacos anti-tuberculose.....	33
1.4	Técnicas de caracterização no estado sólido	36
1.5	Objetivos e organização da dissertação.....	38
2	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1	Reagentes e fármacos	41
2.2	Síntese e seleção dos coformadores	42
2.3	Protocolos de cristalização	45
2.4	Caracterização no estado sólido	49
2.4.1	Difração de raios X por monocristal (DRXM)	50
2.4.2	Difração de raios X por policristais (DRXP)	52
2.4.3	Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) e Raman	52
2.4.4	Análises térmicas	52
2.4.5	Medidas de solubilidade em equilíbrio.....	53
3	ETIONAMIDA	57
3.1	Análise conformacional e interações intermoleculares	57
3.2	Caracterização por DRXP.....	63
3.3	Espectros vibracionais no infravermelho e Raman	64
3.4	Análises térmicas: curvas de TG e de CED e microscopia ótica térmica	65
3.5	Solubilidade em equilíbrio	67
4	ETAMBUTOL	71
4.1	Análise supramolecular e empacotamento cristalino	71
4.1.1	Oxalato de etambutol	73
4.1.2	Maleato de etambutol	75
4.1.3	Tereftalato de etambutol	77
4.1.4	Análise conformacional	79
4.2	Caracterização por DRXP	80

4.3	Espectros vibracionais no infravermelho	82
4.4	Análises térmicas: curvas de TG e de CED e microscopia ótica térmica.....	83
4.5	Estudos de estabilidade.....	86
5	ISONIAZIDA	91
5.1	Análise cristalográfica e interações intermoleculares	92
5.1.1	Cocristais de isoniazida com os ácidos <i>p</i> -nitrobenzóico e <i>p</i> -cianobenzóico	93
5.1.2	Cocristais dos polimorfos de isoniazida com o ácido <i>p</i> -aminobenzóico.....	97
5.2	Caracterização por DRXP	102
5.3	Espectros vibracionais no infravermelho	104
5.4	Análises térmicas: curvas de TG e de CED e microscopia ótica térmica.....	106
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	112
	REFERÊNCIAS.....	115
	APÊNDICE A – Development of a salt drug with improved solubility: Ethionamide nitrate.....	127
	APÊNDICE B – Reducing the hygroscopicity of the anti-tuberculosis drug (<i>S,S</i>)-ethambutol using multicomponent crystal forms	137
	APÊNDICE C – Novel Isoniazid cocrystals with aromatic carboxylic acids: crystal engineering, spectroscopy and thermochemical investigations	149

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fórmulas sólidas de insumos farmacêuticos ativos

Os insumos farmacêuticos ativos (IFA), ou simplesmente fármacos, são compostos químicos responsáveis pela ação farmacológica, sendo o constituinte principal de um medicamento. Os IFA's são utilizados, na sua grande maioria, por meio de formas farmacêuticas sólidas de uso oral, tais como comprimidos e cápsulas, principalmente por apresentarem uma administração mais cômoda para o paciente, aumentando as chances de adesão aos tratamentos.¹ Os baixos custos de produção associado à elevada estabilidade e manufaturabilidade de IFA's no estado sólido também são fatores que contribuem bastante para produção e comercialização de medicamentos sólidos.¹ Apesar dessas inúmeras vantagens, os IFA's podem exibir propriedades físico-químicas indesejáveis que podem inclusive afetar seu desempenho, qualidade e segurança terapêutica. Dentre essas propriedades, destacam-se a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade que são as três características mais importantes que modulam a ação de um fármaco.²⁻⁵ Tais características estão diretamente relacionadas com o arranjo das moléculas dos IFA's em sólidos cristalinos, já que essa organização pode influenciar na taxa com que essas moléculas se tornam disponíveis nos fluidos corporais para atravessar as membranas biológicas e chegar no seu alvo terapêutico.⁶⁻⁷

Os IFA's, por sua vez, podem se apresentar de diferentes maneiras no estado sólido. Estas formas englobam os sais, os cocristais, solvatos, hidratos, polimorfos, sólidos amorfos, entre outros. O Esquema 1 ilustra esquematicamente a classificação sugerida pelo *Food and Drug Administration (FDA)*⁸, agência de regulamentação e fiscalização na área de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos, que categoriza as diferentes formas sólidas existentes para um IFA, levando em consideração aspectos científicos, industriais e, obviamente, químicos/estruturais. De maneira geral, as formas sólidas são divididas com base em dois critérios principais: o primeiro deles refere-se ao ordenamento das moléculas, existindo sólidos cristalinos (ordenados) e sólidos amorfos (desordenados ou não-cristalinos) e o segundo está relacionado com o número de componentes que formam o sólido, havendo sistemas monocomponentes e multicomponentes.

Esquema 1- Atual classificação das formas sólidas de IFA's.

Fonte: Elaborado pelo autor

Quando a forma sólida é composta unicamente por moléculas do IFA, tem-se um sistema dito monocomponente que pode, por sua vez, ser constituído por um ou mais polimorfos, caso as moléculas do IFA no cristal apresentem diferentes conformações e/ou orientações, levando a formação de distintos empacotamentos cristalinos. Nesse caso, os diferentes compostos formados são considerados polimorfos verdadeiros. Por outro lado, quando o IFA realiza uma interação com outra espécie química dentro da estrutura cristalina, um sistema multicomponente é formado e, dependendo da natureza química, da composição e da forma como essas espécies interagem entre si dentro do cristal, têm-se três grandes subdivisões: os hidratos/solvatos, os sais e os cocristais.⁸⁻⁹ Vale salientar, que essas três últimas formas cristalinas multicomponentes podem ser combinadas entre si, levando a formação de sistemas ainda mais complexos (Figura 1)¹⁰, cuja formação pode envolver três ou até quatro componentes, dependendo do caso.

Figura 1- Combinação das diferentes formas sólidas multicomponentes de IFA's.
Fonte: Elaborada pelo autor

Além das formas cristalinas que se caracterizam por apresentar organização estrutural de longo alcance, cabe destacar a impotência dos IFA's amorfos. Em muitos, os sólidos amorfos apresentam solubilidade e biodisponibilidade maiores quando comparados com formas sólidas cristalinas. Isso acontece, uma vez que tais compostos possuem estados de alta energia que é associado ao desordenamento estrutural, sendo termodinamicamente menos estáveis. Tais características favorecem a conversão espontânea dos sólidos amorfos em formas cristalinas que são mais estáveis, o que as tornam mais vantajosas em comparação com os amorfos.¹¹⁻¹²

A formação de hidratos e solvatos está relacionada com a inclusão de moléculas de água ou de solvente, respectivamente, na rede cristalina junto com o IFA, podendo esta inclusão ocorrer em proporções estequiométricas ou não-estequiométricas. A presença de solvente no arranjo cristalino, muitas vezes, tem um papel decisivo na estabilização da estrutura, sobretudo quando estas moléculas realizam interações intermoleculares com o IFA (como comumente acontece em hidratos onde as moléculas de água realizam ligações de hidrogênio com os IFA's). Por outro lado, os solventes podem estar de forma livre na rede cristalina, ficando retidos em cavidades durante a cristalização.¹³⁻¹⁴

Devido à grande importância e ocorrência de sais, cocristais e principalmente polimorfos em sólidos farmacêuticos ativos, essas formas serão abordadas com maiores detalhes nas duas próximas seções (1.2.1 e 1.2.2). Além disso, as novas formas sólidas de fármacos tuberculostáticos que serão apresentadas neste trabalho, se enquadram nessas três categorias.

1.1.1 Sais e cocristais farmacêuticos

Sais farmacêuticos, sem dúvida, representam dentro do universo de formas sólidas, o mais recorrente modo de apresentação de um IFA. Estima-se que 50% de todas as moléculas de fármacos usadas na terapêutica são administradas na forma de sais.^{5,15} Tal fato indica que a formação de sais, a partir de um composto farmacêutico neutro, configura uma etapa crítica e fundamental no processo de desenvolvimento de um fármaco. Por definição, sais são compostos formados quando a molécula do IFA encontra-se carregada positiva ou negativamente e ácidos e bases (contra-íons) são adicionados a fim de neutralizá-las. Nesse sentido, diferentes formas salinas, partindo de uma mesma molécula do fármaco, podem ser obtidas, sendo consideradas como diferentes IFA's, na medida em que o contra-íon pode nem sempre ser o mesmo.¹⁶

A maioria dos fármacos possui grupos ionizáveis na estrutura, sendo, portanto, capazes de formar sais. No entanto, o sucesso e a estabilidade na preparação de um sal dependem das constantes ácidas ou básicas (expressas em função do pKa) das espécies envolvidas, sendo estas constantes uma medida da capacidade de doação ou recepção de prótons.¹⁷ Assim, a análise dos pKa's do fármaco e do contra-íon configura-se como um importante parâmetro durante a preparação de um sal, sendo requerido uma diferença de pelo menos 2 unidades entre os pKa's da base e do ácido para a formação de um sal.¹⁸⁻¹⁹

Nesse sentido, as mudanças químicas e estruturais que ocorrem em virtude da formação de um composto salino permitem melhorar significativamente algumas propriedades físico-químicas do IFA, sobretudo a solubilidade aquosa.^{5,20-21} Essa melhora ocorre devido ao processo de formação de cargas das espécies envolvidas que leva a um aumento da polaridade do composto. Tal efeito pode inclusive aumentar a biodisponibilidade do fármaco.^{7,17,19} Além disso, os sais geralmente aumentam a estabilidade da forma sólida, por formarem empacotamentos cristalinos mais compactos e coesivos, evitando problemas de higroscopicidade e aumentando os pontos de fusão e degradação dos compostos.²²⁻²³ Em processos de síntese química, a formação de sais desempenha um importante papel nas etapas de purificação dos produtos finais, além de melhorar a manufaturabilidade de IFA's durante sua manipulação.^{3,15}

Já os cocristais farmacêuticos são formas cristalinas multicomponentes constituídas de dois ou mais compostos moleculares e/ou iônicos diferentes, sendo um deles o IFA, geralmente numa proporção estequiométrica, e que não se enquadram na classificação de sais ou solvatos.^{10,24,25} A principal diferença entre sais e cocristais reside no fato de que em formas

salinas há necessariamente a transferência de prótons do ácido para a base, enquanto que nos cocristais nenhuma transferência de carga ocorre, sendo o composto resultante estabilizado por ligações de hidrogênio e outras interações direcionais não-covalentes de curto alcance. Apesar desta clara e sucinta definição de cocristais, que permire diferenciá-los das demais formas multicomponentes, ainda prevalece uma discussão de pesquisadores da área de engenharia de cristais sobre tais compostos. Isto ocorre devido à grande versatilidade química com a qual alguns IFA's conseguem se associar com outros componentes durante ensaios de cristalização, podendo extrapolar em alguns casos a definição de cocristais.² Existe ainda outro embate envolvendo os cocristais, já que alguns autores defendem que esses compostos são apenas formas intermediárias entre o IFA e os excipientes em formulações farmacêuticas, ou seja, complexos moleculares.²⁶ Entretanto, na maioria das vezes, os excipientes são substâncias inertes que são adicionadas com propósitos específicos, não interagindo diretamente com o IFA. Portanto, essa afirmação está na contramão da definição clássica de cocristais, que prevê que o IFA e o agente cocrystalizante realizam interações intermoleculares, formando sítions dentro da rede cristalina.²⁷

Nós últimos anos, o número de cocristais de fármacos reportados na literatura cresceu consideravelmente, representando um avanço no contexto das ciências farmacêuticas. O interesse por esses compostos advém da possibilidade de se diversificar o número de formas sólidas cristalinas existentes para um determinado IFA, sem a necessidade de mudanças nos grupos farmacofóricos das moléculas.⁶ A possibilidade de cristalizar dois IFA's numa única forma sólida vem despertando interesse da indústria farmacêutica e de pesquisadores que trabalham com engenharia de cristais. Além disso, por se tratarem de compostos com novas propriedades no estado sólido, os cocristais são candidatos a patenteabilidade e proteção intelectual.²⁸⁻²⁹

Em relação às vantagens, a cocrystalização de IFA's pode implicar em melhora significativa da solubilidade, dissolução, estabilidade e outras propriedades físico-químicas. O planejamento e síntese de cocristais, em geral, são feitos para fármacos que não possuem grupos ionizáveis na estrutura, sendo por isso impossibilitados de formarem sais. Ademais, dependendo das características do agente cocrystalizante, a polaridade do composto final pode ser aumentada e, conseqüentemente, a solubilidade aquosa do fármaco tende a ser melhorada. A formação de cocristais também tem sido utilizada para melhorar estabilidade física de IFA's. Dessa forma, o desenho racional de cocristais com base nos princípios da engenharia de cristais, já se configura como uma eficiente estratégia para o aprimoramento de propriedades físico-químicas de fármacos.³⁰⁻³⁵

1.1.2 Polimorfismo em sólidos farmacêuticos

Sólidos farmacêuticos podem apresentar polimorfismo, que consiste na habilidade de um composto existir em duas ou mais estruturas no estado sólido.³⁶⁻³⁸ Em outras palavras, polimorfos são fases sólidas de uma mesma substância caracterizadas por apresentarem diferentes arranjos em suas estruturas cristalinas. Esse fenômeno, que possui uma ocorrência até certo ponto comum em IFA's, possui um destaque no cenário farmacêutico, na medida em que pode influenciar na produção, qualidade e eficácia de medicamentos.^{9,39} Isso ocorre porque diferentes arranjos cristalinos de um mesmo IFA apresentam diferentes padrões de interações intra e intermoleculares e consequentemente diferentes energias de rede. Tal fato resulta em variações das propriedades físicas e químicas, que podem ir desde a solubilidade e biodisponibilidade até a estabilidade do IFA no medicamento.⁴⁰⁻⁴¹

Existem pelo menos dois mecanismos principais pelos quais moléculas orgânicas podem se empacotar em redes cristalinas.³⁷ O primeiro deles ocorre quando moléculas rígidas conformacionalmente são arranjadas de formas diferentes dentro da estrutura cristalina, como consequência dos variados padrões de interações intermoleculares que podem ser formados, originando estruturas tridimensionais diferentes.⁴² Em outras palavras, quando mudanças no ordenamento das moléculas são responsáveis pelas diferenças encontradas na estrutura, tem-se o chamado polimorfismo orientacional ou de empacotamento.⁴²⁻⁴⁴ Por outro lado, quando moléculas conformacionalmente flexíveis podem se contorcer em formas capazes de se empacotarem de maneiras distintas na rede cristalina, configura-se o chamado polimorfismo conformacional.⁴⁵ Neste caso, as torções nos esqueletos moleculares é que são as responsáveis pelas alterações no ordenamento das moléculas no cristal, sendo comumente observado em estruturas de moléculas pouco rígidas.⁴⁵⁻⁴⁷ Na maioria dos casos, mudanças conformacionais também levam a alterações nos padrões de interações intermoleculares.⁴⁸⁻⁴⁹

Além dos polimorfos ditos verdadeiros, em que a constituição química de estruturas diferentes de um mesmo composto é idêntica, em alguns casos também podem ser obtidos polimorfos de formas sólidas multicomponentes, tais como solvatos, sais e cocristais. Da mesma forma que ocorre em sistemas monocomponentes, as diferenças na orientação ou empacotamento das moléculas ou a flexibilidade conformacional dos componentes dos sais, cocristais e solvatos podem levar, essencialmente, à formação dos dois tipos de polimorfismo mencionados no parágrafo anterior (o orientacional e o conformacional).^{10,50}

1.2 Engenharia de cristais e química supramolecular

A pesquisa das diferentes formas sólidas cristalinas que podem ser formadas para um dado IFA, tem cada vez mais se tornado parte integral das rotinas em ciências farmacêuticas, sendo direcionada pelos princípios da engenharia de cristais.⁵¹⁻⁵³ Como as diferentes formas cristalinas de um fármaco podem apresentar distintas propriedades físico-químicas, é essencial descobrir a forma mais apropriada, que irá apresentar as características desejadas, para aplicação em produtos farmacêuticos.⁵⁴⁻⁵⁵ Por este motivo, o entendimento acerca da diversidade de formas sólidas que podem ser criadas a partir de uma molécula e a preparação de protocolos que direcionem para a produção de uma forma sólida desejável possuem um estimado interesse científico e comercial.⁵⁶⁻⁵⁷

Dentro deste cenário, a engenharia de cristais que é definida como o entendimento das interações intermoleculares no contexto do empacotamento cristalino e a utilização deste entendimento no desenho de novos sólidos cristalinos com propriedades físicas e químicas melhoradas⁵⁸, dispõe de valiosas ferramentas que permitem a realização de modificações cristalinas em compostos orgânicos, sobretudo os de interesse farmacêutico.⁵⁶⁻⁵⁹ Tal conceito, determina que as propriedades de um composto dependem do arranjo estrutural de suas moléculas no cristal, de modo que modificações feitas na estrutura cristalina, pelo controle das suas interações intermoleculares, permitem o desenho racional de novos compostos cristalinos com características específicas. Esta abordagem, sem dúvidas, expande a fronteira do conhecimento acerca do desenho e desenvolvimento de novos materiais. Vale ressaltar que, o empacotamento de moléculas (neutras ou carregadas) em um cristal é fruto de um delicado equilíbrio entre interações químicas e conformações moleculares, de modo que a energia do sistema tende a ser a menor possível, termodinamicamente falando.⁶⁰

As interações intermoleculares, dentre elas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, contatos hidrofóbicos, interações eletrostáticas e interações $\pi \cdots \pi$ constituem a base da química supramolecular e exerce um papel fundamental no processo de reconhecimento molecular e auto-montagem de moléculas em sistemas cristalinos.^{56,61-62} A aplicação dos conceitos da engenharia de cristais e da química supramolecular na otimização do desempenho de fármacos ganhou destaque na década passada, como parte dos interesses da indústria farmacêutica e de centros de pesquisa na cocristalização de compostos de interesse farmacêutico visando à produção de novas formas sólidas cristalinas, tais como: polimorfos, hidratos, sais e cocristais. Particularmente, para a síntese de sais e cocristais, um esforço considerável tem sido direcionado para a compreensão da relação entre as interações

intermoleculares envolvidas na formação desses compostos, levando a novas abordagens para a engenharia de cristais. Dentre estas, destaca-se a valiosa abordagem utilizada para projetar novas modificações cristalinas de um IFA que se baseia na identificação dos grupos funcionais e atributos estruturais complementares da molécula responsáveis pela criação de entidades químicas supramoleculares ou sítions que irão gerar, posteriormente, padrões de interações intermoleculares no cristal.^{28,30,40,63}

A Figura 2 mostra, de maneira resumida, as etapas geralmente adotadas na pesquisa desses sítions supramoleculares, sobretudo para o planejamento sintético de sais e cocrystalis: (1) identificar na molécula do IFA os principais grupos funcionais; (2) desenhar esses grupos funcionais separadamente; (3) inserir esses grupos funcionais em pesquisas sistemáticas na base de dados de estruturas cristalinas de pequenas moléculas *Cambridge Structural Database – CSD*⁶⁴ na tentativa de selecionar os coformadores mais prováveis; (4) determinar quais coformadores são realmente capazes de interagir com a molécula do IFA; (5) realizar os experimentos de cristalização, visando obter as novas modificações cristalinas.^{15,51,64} Embora esta abordagem tenha proporcionado resultados satisfatórios neste trabalho, o grande desafio neste campo ainda continua sendo a compreensão dos parâmetros envolvidos nos processos de auto-montagem molecular e cinética de cristalização que levam a formação dos novos materiais.

Figura 2 – Etapas envolvidas no desenho de novas formas sólidas multicomponentes de um IFA.

Fonte: Elaborada pelo autor

1.3 Tuberculose e fármacos anti-tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa com altas taxas de mortalidade, sobretudo em países pobres e em desenvolvimento.⁶⁵⁻⁶⁸ A bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da doença, foi isolada pela primeira vez em 1882 pelo cientista alemão Robert Koch, sendo batizada posteriormente de bacilo de Koch. A transmissão da doença ocorre basicamente pelo ar, a partir da eliminação de bacilos por um indivíduo infectado.⁶⁹ A OMS aponta que no mundo 10,4 milhões de pessoas tiveram tuberculose em 2015, com 1,4 milhões de mortes em consequência da doença neste mesmo ano.⁷⁰ A tuberculose é a terceira causa de morte por doenças infecciosas na população e a primeira entre pessoas vivendo com HIV/AIDS.⁷⁰ O Brasil é um dos 30 países que detêm 87% da carga mundial de tuberculose e por isso maior atenção deve ser dada a esta questão. Em 2015, o Brasil notificou 69 mil novos casos de tuberculose, com 4,5 mil mortes registradas neste período.⁷¹

O tratamento da tuberculose consiste na utilização combinada de alguns agentes antimicrobianos por um período prolongado, atingindo na maioria das vezes de 6 a 9 meses de antibioticoterapia.⁷¹⁻⁷² No Brasil, o esquema de tratamento é padronizado e segue os protocolos da OMS sendo os medicamentos distribuídos de forma gratuita pelo Ministério da Saúde (MS).⁷²⁻⁷³ Os antibióticos usados para tratar a tuberculose são divididos entre: fármacos de primeira escolha ou de primeira linha e os de segunda linha. Os fármacos que compõem a primeira linha são: a isoniazida (INH), a pirazinamida (PZA), a rifampicina (RMP) e o etambutol (ETB). Esses quatro fármacos compõem a dose fixa combinada (DFC) que consiste na utilização de todos eles em um único comprimido nos primeiros meses de tratamento, sendo então chamado de comprimido 4 em 1.⁷⁴ Os fármacos de segunda escolha são normalmente utilizados em caso de falta de eficácia dos fármacos de primeira escolha, que tem acontecido muito em virtude no aparecimento de linhagens multirresistentes do bacilo causador da tuberculose. Dentre eles, a etionamida está entre os antibióticos de segunda linha mais utilizados atualmente.⁷⁵ Diante deste panorama do tratamento medicamentoso da tuberculose, os fármacos que serão estudados neste trabalho são: a etionamida, o etambutol e a isoniazida.

A etionamida (ETH) é utilizada no tratamento da tuberculose desde 1956 como fármaco de segunda linha. É um pró-fármaco inativo com estrutura análoga à isoniazida, porém sem resistência cruzada com a mesma, e necessita ser ativada pela enzima bacteriana EthA, uma flavina monoxigenase dependente de NADPH. Atua nos bacilos intra e

extracelulares. Embora o mecanismo de inibição seja diferente da isoniazida, o resultado é o mesmo: inibição da síntese proteica, impedindo a biossíntese do ácido micólico com o comprometimento da membrana celular bacteriana. A resistência à ETH ocorre devido a alterações genéticas na EthA. A ETH é rapidamente absorvida por via oral, com biodisponibilidade de 80%.⁷⁵

Em uma busca no banco de dados de estruturas cristalinas de pequenas moléculas CSD⁶⁴, mostrou a existência de 11 estruturas de formas sólidas da ETH reportadas até o presente momento, sendo 4 sais e 3 cocristais, a forma neutra, e os sais de cloridrato e bromidrato de etionamida. A estrutura cristalográfica destes dois últimos sais, elucidada em 1968, mostrou que ambos cristalizaram no grupo espacial monoclinico $P2_1/c$ ⁷⁶⁻⁷⁷, ao contrário da forma neutra, cuja estrutura só foi determinada cinco anos depois, sendo resolvida no grupo espacial monoclinico Cc .⁷⁸

O (S,S)-etambutol (ETB), sintetizado pela primeira vez em 1961, é utilizado no tratamento da tuberculose desde 1966. Atua sobre os bacilos intra e extracelulares, principalmente os de multiplicação rápida. O mecanismo de ação do ETB está relacionado com a capacidade do composto em interferir na biossíntese de arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular da micobactéria. Dessa forma, ele age inibindo a enzima arabinosil transferase, codificada pelo gene *embB*, que media a polimerização de arabinose para arabinogalactano. A resistência ao ETB *in vitro* desenvolve-se de maneira lenta e provavelmente acontece por mutação do gene *embB*.⁷⁴ É importante ressaltar que o isômero (R,R)-etambutol não é utilizado na terapêutica devido sua elevada toxicidade, podendo até mesmo causar cegueira com o seu uso prolongado.⁷²

A pesquisa no CSD⁶⁴ pela busca de estruturas de ETB revelou que existem 13 depósitos, sendo um deles referente à elucidação estrutural do ETB na sua forma neutra, realizada por Bai e colaboradores em 2006.⁷⁹ As demais estruturas cristalinas são todas de formas sólidas salinas: bromidrato, nitrato, oxalato pentaidratado, mesilato e fumarato monoidratado.⁸⁰⁻⁸⁴ A forma comercial deste IFA é o sal cloridrato de etambutol, na qual existem quatro formas polimórficas conhecidas, sendo a forma II a mais comumente encontrada em preparações farmacêuticas.⁸⁵

A isoniazida (INH) é um pró-fármaco (bioprecursor), que necessita ser ativado pela enzima KatG, uma catalase-peroxidase do *M. tuberculosis*, para produzir radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato) e radicais orgânicos e, dessa forma, inibir a formação de ácido micólico da parede celular bacteriana, causando dano ao DNA e subsequente morte do bacilo. O mecanismo mais comum de resistência a isoniazida

consiste em mutações na KatG, que diminuem sua atividade, impedindo a conversão do pró-fármaco em seu metabolito ativo.⁷⁴

A INH teve sua estrutura cristalina resolvida pela primeira vez por Jensen em 1954.⁸⁶ Este IFA cristaliza no grupo espacial ortorrômbico $P2_12_12_1$, e até o presente momento, não há relatos de polimorfos e solvatos para este fármaco. Desde a sua determinação estrutural, uma série de modificações cristalinas da INH vem sendo investigada. Em uma busca feita na literatura e no *CSD*⁶⁴, foi verificada a existência de 96 estruturas, das mais diversas naturezas, indo desde compostos organometálicos até formas sólidas multicomponentes como sais e cocristais.⁸⁷⁻⁹⁴ Recentemente, nosso grupo de pesquisa reportou quatro novos sais de INH com contra-íons inorgânicos (nitrato, bromidrato e sulfato).⁹⁵

Apesar da dificuldade do tratamento e da comprovada eficácia de todas as drogas com ação antituberculose, praticamente todas elas apresentam pelo menos alguma característica física e/ou química ou até farmacocinética indesejável e que, portanto, precisa ser aprimorada.⁷³ Vale a pena destacar, três dessas drogas que são objeto de estudo do presente trabalho: a etionamida, o etambutol e a isoniazida. A ETH é um fármaco classe II do sistema de classificação biofarmacêutico (SCB) sendo considerado de baixa solubilidade ($\sim 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$).⁹⁶⁻⁹⁷ Essa limitada solubilidade pode comprometer a sua biodisponibilidade no organismo e isso tem motivado o desenho de novas formas sólidas deste fármaco com o objetivo de solucionar tal problemática.⁹⁸ O ETB por outro lado é utilizado na forma de um sal de cloridrato e possui alta solubilidade.⁹⁹ Entretanto, este composto assim como todos os sais de etambutol reportados até hoje são altamente higroscópicos. Essa indesejável característica pode comprometer o desempenho dos outros fármacos da formulação da DFC¹⁰⁰⁻¹⁰³, pois a isoniazida e a pirazinamida sofrem hidrólise em ambientes que contém água.¹⁰² Nesse sentido, o desenho de novas formas sólidas menos higroscópicas do etambutol motivou a execução deste trabalho. Por fim, a isoniazida é um agente antibacteriano que apresenta uma longa estabilidade tanto em condições ambientais quanto em condições mais estressantes, tais como à 40°C e 75% de umidade relativa.^{100,104} Contudo, na presença de outros fármacos tuberculostáticos, como no caso da formulação 4 em 1 usada para tratar a tuberculose, a INH sofre reações cruzadas, levando a degradação da molécula e acarretando perdas significativas da concentração dos princípios ativos nos comprimidos. Uma das principais reações de degradação verificada na formulação é desencadeada pela alta higroscopicidade do ETB que acelera a degradação da isoniazida e da rifampicina, mediante a formação de metabólitos inativos, podendo levar até mesmo a uma diminuição da biodisponibilidade desses dois fármacos no organismo.¹⁰⁵ A INH pode ainda sofrer reações de

oxidação, de degradação pela luz e interações com excipientes como a lactose.¹⁰⁶ Diante desse panorama, a estratégia de cocristalização da INH com coformadores orgânicos reconhecidos como seguros¹⁰⁷ têm sido amplamente utilizada para evitar essas indesejadas interações da INH com outros fármacos e excipientes nas formulações farmacêuticas.⁹²⁻⁹⁴

1.4 Técnicas de caracterização no estado sólido

A utilização combinada de técnicas de caracterização no estado sólido tem sido cada vez mais frequente na pesquisa, identificação e elucidação estrutural de compostos farmacêuticos.^{36,108} Dentre as mais utilizadas destacam-se a difração de raios X (DRX) por mono (DRXM)¹⁰⁹ e policristais (DRXP)¹¹⁰, as técnicas termoanalíticas de termogravimetria (TG)¹¹¹ e calorimetria exploratória diferencial (CED)¹¹², análises por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) e de espalhamento Raman¹¹³⁻¹¹⁴, a ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido¹¹⁵ e a microscopia eletrônica de varredura (MEV).¹¹⁶

Uma das técnicas mais apropriadas para diferenciar formas sólidas cristalinas é a DRX, seja a DRXM ou DRXP.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ A análise dos padrões de difração obtidos nos experimentos de DRX permite distinguir os diferentes arranjos dos átomos nos sólidos cristalinos. Através da DRXM é possível determinar a estrutura de moléculas dentro da rede cristalina, o que fornece informações valiosas e essenciais sobre a forma sólida, permitindo classificá-la em sistemas monocomponentes (no caso de polimorfos verdadeiros) ou multicomponentes (no caso de sais, cocristais e solvatos). Além disso, informações a nível atômico das interações intra e intermoleculares, do empacotamento cristalino e conformação das moléculas são obtidas a partir dos dados de DRXM mediante a resolução e refinamento estrutural.¹¹⁷⁻¹¹⁸ Entretanto, um fator limitante desta técnica é a necessidade de amostra estar na forma monocristalina. Desta forma, torna-se conveniente utilizar a DRXP sempre que não é possível se obter um monocristal perfeito.

A DRXP é outra poderosa técnica apropriada para distinguir fases cristalinas de compostos dos mais variados tipos, sobretudo os de interesse farmacêutico. Diferente da DRXM, a amostra pode estar na forma de policristais ou pó, o qual é constituído de cristalitos de pequenas dimensões (de 1 e 10 µm). A partir dos dados de DRXP é possível determinar o grau de cristalinidade da amostra, realizar análises qualitativas e quantitativas das fases em sólidos polimórficos e estudar a cinética de reações no estado sólido, por exemplo.¹¹⁹ Além disso, em alguns casos, é possível determinar aspectos cristalográficos importantes, tais como:

parâmetros de cela unitária e grupo espacial, bem como a determinação da estrutura cristalina.¹²⁰

A espectroscopia vibracional (absorção no IV e espalhamento Raman) vem sendo largamente utilizada na caracterização de sólidos farmacêuticos. Os espectros de absorção na região do IV e espalhamento Raman fornecem informações sobre os modos vibracionais das moléculas.¹¹³ As bandas que aparecem nos espectros IV e Raman são atribuídas a grupos funcionais e à conformação das moléculas, sendo, portanto, úteis na caracterização estrutural de modificações cristalinas de fármacos.¹¹⁴ Nesse sentido, os espectros vibracionais de absorção no IV e espalhamento Raman são tidos como impressões digitais das formas sólidas, permitindo a caracterização e distinção dos compostos de interesse. Além disso, por meio de análises espectroscópicas é possível caracterizar solvatos (hidratos) e, principalmente, polimorfos, uma vez que as informações relativas aos modos de vibração na rede cristalina, que são geradas por diferentes empacotamentos cristalinos (no caso de polimorfos), podem ser obtidas através de bandas que aparecem na região de baixa frequência (1000-200 cm^{-1}) dos espectros IV e Raman.^{114,121}

As técnicas de análises térmicas são aquelas nas quais as propriedades físicas e químicas dos compostos são determinadas em função de uma variação programada de temperatura que é aplicada ao sistema, permitindo distinguir as modificações cristalinas com base não só em eventos de transições de fase que ocorrem nas amostras durante a alteração da temperatura, como também considerando o ponto de fusão e processos de dessolvatação, desidratação, cristalização, entre outros.¹²² A técnica de CED permite a quantificação da energia absorvida ou liberada pela amostra, em virtude de eventos endo e exotérmicos que acontecem durante as medidas, quando esta é aquecida, resfriada ou mantida em temperatura constante.¹¹² A técnica de TG permite mensurar a perda de massa em função da temperatura, sendo importante na determinação da estabilidade térmica das amostras.¹¹¹ Além disso, as curvas de CED e TG podem ser correlacionadas, auxiliando na correta interpretação dos resultados e permitindo estabelecer o comportamento térmico de modificações cristalinas, sendo úteis para estabelecimento de relações estruturais e energéticas, assim como para a diferenciação e identificação de modificações cristalinas de fármacos.¹²²⁻¹²³

As técnicas térmicas também podem ser empregadas para determinar a estabilidade relativa entre polimorfos e diferenciar sistemas enantiotrópicos e monotrópicos.^{37,118} Quando uma forma cristalina sofre uma transição de fase reversível, tem-se uma relação enantiotrópica. No caso de uma transição irreversível, a relação é dita monotrópica.^{37,118}

1.5 Objetivos e organização da dissertação

O objetivo principal deste trabalho foi preparar novas modificações cristalinas dos fármacos tuberculostáticos etionamida, etambutol e isoniazida e determinar suas estruturas por DRXM. A escolha destes fármacos centra-se na importância clínica dos mesmos e na tentativa de melhoria de suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, tais como a baixa solubilidade da etionamida e a elevada higroscopicidade do etambutol. De maneira específica o presente trabalho tem como objetivos: (a) Analisar estatisticamente os possíveis sítios supramoleculares formados pelos grupos funcionais dos IFA's que permitam reconhecer os coformadores preferenciais; (b) Elaborar planos de sínteses e protocolos de cristalização visando à obtenção de novas formas sólidas, sobretudo sais e cocrists; (c) Identificar aspectos químicos, conformacionais e supramoleculares importantes das novas modificações cristalinas; (d) Comparar as estruturas e os arranjos cristalinos das diferentes formas sólidas obtidas relacionando-as com possíveis propriedades físico-químicas; (e) Realizar uma completa caracterização no estado sólido por meio da técnica de difração de raios X por policristais, análises térmicas (TG, CED e termomicroscopia *Hot-stage*) e espectroscópicas (na região do infravermelho e Raman); (f) Determinar a solubilidade do sal nitrato de etionamida e a higroscopicidade dos sais de etambutol e comparar esses resultados com os dos respectivos fármacos de referência e demais formas sólidas reportadas na literatura.

O presente documento encontra-se dividido em seis capítulos, nos quais são abordados desde conceitos básicos e fundamentação teórica que embasaram o trabalho até uma detalhada discussão dos resultados obtidos durante a execução do mesmo. No capítulo 1, uma introdução acerca da tuberculose e dos principais fármacos usados no seu tratamento foi realizada. Também foi apresentada uma breve revisão sobre formas sólidas farmacêuticas e alguns conceitos básicos sobre engenharia de cristais e química supramolecular. Por fim, uma sucinta descrição das técnicas utilizadas para a caracterização de compostos no estado sólido foi realizada.

No capítulo 2, apresenta-se, em detalhes, tanto os procedimentos experimentais que foram executados nos processos de síntese quanto uma descrição dos equipamentos e técnicas utilizados na caracterização estrutural das novas modificações cristalinas obtidas.

No capítulo 3, encontra-se uma discussão cristalográfica de um novo sal do fármaco etionamida: o nitrato de etionamida. A análise supramolecular deste sal mostrou inéditos e interessantes atributos estruturais que permitiram explicar em parte, a elevada solubilidade deste sal e a menor estabilidade térmica em comparação com a etionamida.

No Capítulo 4, são apresentados os resultados das modificações cristalinas do fármaco etambutol. Trata-se de três novos sais (oxalato, maleato e tereftalato), cujas análises das estruturas e empacotamentos cristalinos forneceram indícios importantes sobre o comportamento higroscópico e estabilidade térmica destes compostos.

No capítulo 5, encontram-se descritos a caracterização no estado sólido de quatro novos cocristais da isoniazida que foram obtidos a partir de reações deste IFA com ácidos carboxílicos aromáticos. Das quatro modificações cristalinas, duas são de cocristais que são polimorfos orientacionais. A análise das estruturas cristalinas revelou uma variedade de síntons supramoleculares, pelos quais os cocristais são formados.

No sexto e último capítulo são apresentadas as conclusões gerais extraídas deste trabalho juntamente com suas respectivas projeções futuras. Por fim, a produção científica relevante relacionada a esta dissertação é listada nos apêndices, onde três artigos publicados referentes à parte dos resultados descritos nos capítulos 3, 4 e 5 estão também presentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e fármacos

Na síntese das modificações cristalinas aqui apresentadas, os solventes utilizados foram: água deionizada (sistema de purificação Milli-Q, Millipore Corp.), metanol, etanol e acetonitrila, sendo estes três últimos adquiridos comercialmente (todos grau analítico P.A., Qhemis[®]). Os compostos usados como coformadores para a formação dos sais e cocrists foram: ácido nítrico (HNO₃) concentrado, ácido tereftálico e ácido *p*-aminobenzóico (grau analítico P.A., Sigma-Aldrich[®]); ácido oxálico, ácido maleico, ácido *p*-nitrobenzóico e ácido *p*-cianobenzóico (grau analítico P.A., Vetec[®]). Os fármacos etionamida, cloridrato de etambutol e isoniazida, usados como reagentes de partida, foram adquiridos de fontes comerciais (grau analítico, Sigma-Aldrich[®]) e usados como recebido sem purificação adicional. Na Figura 3 são mostradas as estruturas químicas dos fármacos e dos coformadores ou agentes formadores de sal utilizados neste trabalho. A pureza das novas formas sólidas obtidas a partir destes reagentes foi confirmada via difração de raios X por policristais.

Figura 3 – Estruturas químicas dos fármacos e coformadores utilizados neste trabalho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.2 Síntese e seleção dos coformadores

O planejamento das sínteses das modificações cristalinas descritas neste trabalho foi baseado nas características químicas e estruturais dos fármacos ETH, ETB e INH e em relatos recentes documentados pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais obtiveram outras formas cristalinas de fármacos tuberculostáticos.⁹⁵⁻⁹⁶ Por se tratar de fármacos com caráter básico, informação esta obtida a partir da análise dos pKa's das moléculas, procedeu-se a busca por coformadores com caráter ácido visando a obtenção de sais ou cocristais como produto das reações, tendo como base a “regra do pKa”.^{18,124} É bem estabelecido na literatura que, quando a diferença de unidades de pKa (ΔpK_a) entre uma base e um ácido, numa reação química, for maior que três unidades, existe uma forte evidência que aponta para a formação de um sal. Por outro lado, quando o ΔpK_a assumir valores menores ou iguais a zero, um cocrystal será formado como produto da reação. Entretanto, quando o ΔpK_a cair num intervalo de 0 a 3, tanto sais quanto cocristais podem ser formados, sendo necessário a utilização de outras análises para confirmar a natureza química do produto formado.^{18,23} Essas previsões baseadas nos pKa's das moléculas são bastante úteis no planejamento de novas formas sólidas.

A preparação do sal nitrato de etionamida seguiu esse raciocínio e foi baseada considerando o pKa do nitrogênio do anel piridínico da ETH (pKa= 4,49).⁵¹ Dessa forma, o cálculo do ΔpK_a da reação da ETH com ácido nítrico (pKa = -1,39)¹²⁵ forneceu um valor de 5,88, indicando que um sal de nitrato seria o produto da reação. Além disso, em reações da ETH com ácidos inorgânicos fortes, a formação do sinton supramolecular piridinium $\cdots$ ânion entre o cátion ETH⁺ e o correspondente ânion inorgânico é bastante comum e esperado, sendo verificado em outras formas salinas da ETH reportadas na literatura.^{96,98,126}

O desenho racional dos sais de ETB e a seleção dos coformadores foi feita levando em consideração o pKa dos dois nitrogênios das aminas secundárias da molécula de ETB (pKa₁ = 9,35 e pKa₂ = 6,35)⁹⁹ que são passíveis de serem protonadas em reações com ácidos. Nesse sentido, foram selecionados apenas ácidos dicarboxílicos que concordassem com a “regra do pKa” para a formação de sais ($\Delta pK_a > 3$) na tentativa de reproduzir o sinton supramolecular NH⁺ $\cdots$ COO⁻. Assim, os ácidos dicarboxílicos que foram selecionados para os experimentos de cristalização são: ácido oxálico, ácido maleico e ácido tereftálico. Na Tabela 1 estão representados o pKa₁ e pKa₂ dos compostos bem como os valores de ΔpK_a , calculados a partir da reação do ETB com os respectivos ácidos. Mesmo considerando o pKa₂ das moléculas, o ΔpK_a resultante das reações estão todos acima dos valores exigidos para a formação de sais ($\Delta pK_a > 3$). A única exceção ocorreu para o ácido tereftálico, no qual um

dos valores de ΔpK_a (2,80) encontra-se na região de 0 a 3, não sendo possível apenas por esta análise confirmar se houve transferência de prótons do ácido para o ETB. Entretanto, com os dados de DRXM foi possível confirmar que, de fato, três novas formas salinas do ETB foram obtidas e em todas elas verificou-se a formação do sinton supramolecular $NH^+ \cdots COO^-$.

Tabela 1 - Valores de pK_a e de ΔpK_a calculados para as reações do ETB com os ácidos dicarboxílicos usados como coformadores.¹²⁵

Composto	pK_{a1}/pK_{a2}	$\Delta pK_a =$ $pK_a(ETB) - pK_a(\text{ácido})$	Estequiometria
Etambutol	6,35/9,35	-	-
Ácido oxálico	1,25/4,27	5,10/5,08	1:2 sal
Ácido maleico	1,83/6,07	4,52/3,28	1:2 sal
Ácido tereftálico	3,55/4,46	2,80/4,89	1:1 sal

Fonte: Elaborada pelo autor

O planejamento das sínteses dos cocristais de INH foi realizado com base nas características químicas e estruturais da molécula. A INH é uma base fraca que contém três grupos funcionais principais na estrutura: a hidrazina, a amida e o anel piridínico. Os átomos de nitrogênio e oxigênio desses grupos atuam como excelentes aceitadores quando estão envolvidos em ligações de hidrogênio. Em cocristais moleculares com ácidos carboxílicos, esses grupos da INH, na maioria das vezes, formam síntons supramoleculares, através de ligações de hidrogênio, do tipo ácido $\cdots$ piridina ($COOH \cdots N_{\text{piridina}}$) e ácido $\cdots$ hidrazina ($COOH \cdots N_{\text{hidrazina}}$). Além disso, em estruturas de INH os nitrogênios do grupo hidrazina podem atuar tanto como aceitadores quanto doadores, permitindo a formação de homosíntons do tipo hidrazina $\cdots$ hidrazina ($N_{\text{hidrazina}} \cdots N_{\text{hidrazina}}$). A Figura 4 mostra os principais síntons supramoleculares (homo e heterosíntons) e os diferentes padrões de ligação de hidrogênio encontrados nas estruturas dos cocristais de INH descritos neste trabalho.

Figura 4 - Principais sítios supramoleculares e padrões de ligação de hidrogênio observados nas estruturas dos cocristais de INH.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em uma busca no banco de dados de estruturas cristalinas de pequenas moléculas *CSD*⁶⁴, 39 estruturas de cocristais moleculares de INH com coformadores contendo o grupo COOH foram encontrados, mostrando que este tipo de sistema multicomponente representa 40% de todas as estruturas cristalinas de INH depositadas no *CSD*. Dentre as entidades supramoleculares representadas na Figura 4, o número I (ácido...piridina) é o mais recorrente, estando presente em aproximadamente 87% das estruturas depositadas. Já os homosítios II, III e IV aparecem com uma frequência de 18%, 36% e 18% cada um. Por fim, os heterosítios V e VI foram observados em 8% e 31%, respectivamente, em cocristais de INH com ácidos carboxílicos reportados até o momento. Nesse sentido, visando reproduzir os sítios supramoleculares ácido...piridina ($\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{piridina}}$) e ácido...hidrazina ($\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{hidrazina}}$) e os padrões de ligação de hidrogênio observados nestes heterosítios e baseado no pKa do nitrogênio do anel piridínico da INH ($\text{pK}_a = 3,50$)¹²⁷, apenas ácidos carboxílicos aromáticos foram selecionados para os experimentos de cristalização com a INH. Os coformadores escolhidos foram: ácido *p*-nitrobenzóico ($\text{pK}_a = 3,43$)¹²⁵, ácido *p*-cianobenzóico ($\text{pK}_a = 3,55$)¹²⁵ e ácido *p*-aminobenzóico ($\text{pK}_a = 2,38$)¹²⁵. De acordo com a “regra do pKa” para formação de cocristais ($\Delta\text{pK}_a > 0$), apenas uma das reações resultaria num cocrystal ao final do processo, conforme descrito na Tabela 2 que mostra os valores de ΔpK_a para as reações. Nas outras duas reações, tanto um sal ou um cocrystal poderia ter sido

formado. Entretanto, com a resolução das estruturas por DRXM e dados de espectroscopia vibracional no IV, verificou-se a que todas as reações resultaram na formação de novos cocristais de INH.

Tabela 2 – Valores de pKa e de ΔpK_a da INH e dos ácidos carboxílicos usados como coformadores.

Composto	pKa	$\Delta pK_a =$ $pK_a(\text{INH}) - pK_a(\text{ácido})$	Estequiometria
Isoniazida	3,50	-	-
Ácido <i>p</i> -nitrobenzóico	3,43	0,07	1:1 cocristal
Ácido <i>p</i> -cianobenzóico	3,55	-0,05	1:1 cocristal
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	2,38	1,12	1:2 cocristal (polimorfos)

Fonte: Elaborada pelo autor

2.3 Protocolos de Cristalização

Após a adequada escolha dos coformadores, foram elaborados planos de sínteses e protocolos de cristalização visando a obtenção de monocristais de novas formas sólidas ao final do processo. Com exceção da síntese do composto nitrato de etionamida em que um excesso de ácido nítrico foi utilizado durante a preparação, todas as demais reações foram desenhadas a partir de proporções estequiométricas bem definidas entre o fármaco e o coformador. A escolha dos solventes utilizados foi feita com base em outros trabalhos encontrados na literatura que reportaram a obtenção de formas sólidas dos fármacos em questão.

A massa dos fármacos e dos coformadores foram devidamente pesadas em balanças analíticas, assim como os volumes dos solventes e das soluções foram aferidos com o auxílio de pipetas graduadas. Quando os volumes utilizados foram inferiores a 1 mL, utilizou-se nesses casos micropipetas automáticas de 50µL a 1000µL. As soluções de cristalização foram acondicionadas em recipientes cilíndricos (béqueres) de vidro de volume de 10 mL e não foram vedados durante o período de repouso. Os cristais obtidos foram filtrados da solução de cristalização, secos e depois analisados.

A preparação dos cristais do sal nitrato de etionamida encontra-se resumido no Esquema 2 e envolveu os seguintes passos:

- 1) Pesagem de 20 mg de etionamida (0,04 mmol) que foi em seguida transferida para um almofariz;
- 2) Adição de 2 gotas de ácido nítrico concentrado (HNO₃ conc.) à massa de ETH previamente pesada;

- 3) Reação mecânica (maceração) por 10 minutos até a obtenção de um resíduo sólido alaranjado bem homogêneo;
- 4) Solubilização do resíduo sólido resultante em etanol 70%;
- 5) Aquecimento desta mistura a 100°C sob agitação constante por 15 minutos até uma completa homogeneização do sistema;
- 6) Repouso da solução final em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente;
- 7) Formação de monocristais de boa qualidade, que foram filtrados e secos, 2 dias após o início da evaporação do solvente

Esquema 2 - Procedimentos envolvidos durante o preparo do sal nitrato de etioanamida.

Fonte: Elaborado pelo autor

Antes da preparação dos novos sais de etambutol propriamente ditos, foi necessário extrair a base livre do fármaco primeiro, ou seja, obter sua forma desprotonada. Isso foi feito na medida em que o material de partida utilizado nas reações foi a forma comercial cloridrato de etambutol. Essa etapa foi feita com base nos procedimentos experimentais descritos por Bhutani e colaboradores¹⁰² e envolveu os seguintes passos:

- 1) Dissolução de 2g (7,214mmol) de cloridrato de etambutol em 15 mL de água, sendo adicionado a essa solução mais 5 mL de solução de NaOH de concentração 5 mol L^{-1} ;
- 2) Agitação desta mistura por 10 minutos até a completa precipitação da base livre de ETB;
- 3) Extração da base livre com diclorometano (CH_2Cl_2), sendo realizada três extrações usando 20 mL de solvente cada;
- 4) Separação das fases, com adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) à fase orgânica para eliminar traços de moléculas de água;
- 5) Evaporação completa do solvente (CH_2Cl_2), em temperatura ambiente, para a obtenção de cristais da base livre do ETB.

Uma vez obtido o ETB na forma de base livre, procedeu-se as sínteses das novas formas sólidas do ETB. No Esquema 3, encontram-se descritos todas as etapas que culminaram na formação destes novos compostos, cuja preparação envolveu os seguintes passos:

- 1) Pesagem de 20 mg (0,098 mmol) de ETB (base livre) em três béqueres diferentes;
- 2) Adição de 17,6 mg de ácido oxálico (0,195 mmol), 22,7 mg de ácido maleico (0,196 mmol) e 16,27 mg de ácido tereftálico (0,097 mmol) a cada um dos três béqueres contendo o ETB previamente pesados;
- 3) Adição de 3 mL de uma mistura de metanol/etanol (1:1) a cada um dos béqueres contendo o ETB mais o coformador e aquecimento das misturas até 80°C ;
- 4) Agitação constante na temperatura de 80°C por 15 minutos até a completa solubilização e homogeneização das misturas;
- 6) Repouso das soluções finais em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente;
- 7) Formação de monocristais de boa qualidade dos sais de ETB, que foram filtrados e secos, sendo obtidos num intervalo de 2 a 3 dias após o início da evaporação do solvente.

Esquema 3 - Procedimentos envolvidos durante o preparo dos novos sais de ETB.

Fonte: Elaborado pelo autor

Por fim, os cocristais de isoniazida foram obtidos a partir de reações estequiométricas da INH com ácidos carboxílicos aromáticos derivados do ácido benzóico. Durante os experimentos de cristalização, foi verificado que a reação da INH com o ácido *p*-aminobenzóico levou a formação de duas formas polimórficas, que foram separadas mediante a cristalização em temperaturas diferentes. A preparação dos cocristais de INH encontra-se resumido no Esquema 4 envolveu os seguintes passos:

1) Preparação de soluções de INH (40 mg, 0,292 mmol) em etanol e mistura de etanol/acetonitrila (2:1) que foram aquecidas até 70°C e mantidas sob agitação constante até a completa solubilização da INH;

- 2) Adição de quantidades estequiométricas dos coformadores às soluções de INH preparadas anteriormente;
- 3) Aquecimento das misturas (a 100° ou a 120°C dependendo do caso) sob agitação constante por 20 minutos até a completa solubilização e homogeneização das soluções;
- 4) Repouso das soluções finais em temperatura ambiente para a evaporação do solvente e a obtenção de monocristais. Uma das soluções proveniente da reação da INH com o ácido *p*-aminobenzóico foi mantida à -5°C durante a etapa da cristalização, para que a forma II do cocrystal INH-PABA pudesse ser formada;
- 5) Filtração e secagem dos monocristais das formas sólidas da INH que foram obtidos num intervalo de 3 a 4 dias após o início da evaporação do solvente.

Esquema 4 - Procedimentos envolvidos durante o preparo dos novos cocrists de INH.

Fonte: Elaborado pelo autor

2.4 Caracterização no estado sólido

Uma vez obtidos, os cristais das formas sólidas de ETH, ETB e INH foram caracterizados pelos seguintes técnicas: difração de raios X por monocristal (DRXM) e por

material policristalino (DRXP), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) e de espalhamento Raman, calorimetria exploratória diferencial (CED) e análise termogravimétrica (TG), microscopia ótica térmica (*Hot-stage*) e espectrofotometria UV-vis (estudos de solubilidade no equilíbrio).

2.4.1 Difração de raios X por monocristal (DRXM)

Com a realização das sínteses das novas modificações cristalinas e após as etapas de cristalização, materiais monocristalinos foram obtidos no final do processo. Assim, foi possível selecionar apenas um cristal, de dimensões adequadas e composição homogênea, de cada uma das novas formas sólidas para os experimentos de DRXM. A fim de verificar a qualidade dos cristais, os mesmos foram observados em um microscópio com luz polarizada de modo a selecionar apenas os cristais que se apresentaram brilhantes ao serem expostos a luz, sendo esta uma propriedade de materiais cristalinos. Em seguida, buscou-se separar os cristais com tamanhos adequados, com dimensões médias variando de 0,05 a 0,35 mm. Após a seleção dos monocristais, procedeu-se a montagem das amostras para a realização da coleta de dados.

Os dados de difração de raios X por monocristal dos compostos deste trabalho foram obtidos num difratômetro Agilent Super Nova equipado com detector CCD e pertencente ao grupo de cristalografia de pequenas moléculas (GCPMol), localizado no departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Utilizou-se para as medidas radiação de $K\alpha\text{Mo}$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) em temperatura ambiente (298K). Para a coleta e integração dos dados, redução e refinamento das células unitárias, bem como eventuais correções por absorção, efeitos Lorentz e polarização foram realizadas por meio do software CrysAlisPro.¹²⁸

Com a determinação das células unitárias, procedeu-se à resolução e refinamento das estruturas. Estes procedimentos foram realizados utilizando os pacotes de programas cristalográficos Olex2¹²⁹ e WINGX.¹³⁰ A resolução das estruturas foi realizada através de métodos diretos. A fim de encontrar as fases dos fatores de estrutura para cada uma das estruturas dos compostos descritos neste trabalho, o programa SHELXS-2013¹³¹ foi utilizado. A resolução das estruturas forneceu, num primeiro momento os esqueletos moleculares das modificações cristalinas aqui descritas. Assim, foram obtidos os correspondentes mapas de densidade eletrônica (mapas de Fourier), nos quais foram encontradas em princípio as posições dos átomos não hidrogênicos. As posições destes átomos foram inicialmente refinadas de forma isotrópica pelo método dos mínimos quadrados de matriz completa, tratando em cada ciclo de refinamento, minimizar a diferença entre os fatores de estrutura

observados F_o e calculados F_c , utilizando para isto o programa SHELXL-2013.¹³¹⁻¹³² Posteriormente, foi realizado o refinamento anisotrópico dos átomos, deixando em liberdade os parâmetros de vibração térmica, consolidando mais ainda o modelo estrutural.

A próxima etapa do refinamento foi à localização dos átomos hidrogenóides, os quais foram observados a partir dos mapas da diferença de Fourier. Todos os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono foram fixados, dependendo da natureza química e hibridação do carbono. Para átomos de hidrogênio ligados a carbonos aromáticos, as distâncias foram fixadas em 0,93 Å com um parâmetro isotrópico 20% maior do que o parâmetro de deslocamento isotrópico equivalente para o átomo de carbono ($U_{iso}(H) = 1.2 U_{eq}(C_{sp^2})$). Para os átomos de carbono primários e secundários com hibridação, C_{sp^3} , presentes nos grupamentos etilas das moléculas de ETH e ETB tiveram as distâncias idealizadas das ligações com os átomos de hidrogênio, em torno de 0,97 Å ($C_{sp^3}-H$ dos grupos metilenos) e de 0,96 Å ($C_{sp^3}-H$ dos grupos metilas) e com iguais percentagens de incremento em relação aos parâmetros de vibração equivalentes. Já os átomos de hidrogênio ligados a átomos de oxigênio (O—H grupo hidroxila e carboxila) e nitrogênio (N—H grupos aminas e hidrazina e N^+-H amina secundária e piridina protonadas) foram localizados através dos mapas de densidade eletrônica, sendo suas posições refinadas livremente conforme as densidades observadas e com os parâmetros térmicos isotrópicos fixos definidos como: ($U_{iso}(H) = 1.2 U_{eq}(N)$ e $1.5 U_{eq}(O)$).

As validações dos modelos cristalográficos, após serem concluídos os respectivos refinamentos, foram realizadas por intermédio do programa PLATON.¹³³ As informações dos refinamentos, das coletas e outros parâmetros associados nas determinações estruturais, encontram-se condensadas nos arquivos com extensão *.cif* (*Crystallography Information File*), os quais foram validados utilizando a rotina CheckCIF¹³⁴, disponibilizada pela União Internacional de Cristalografia. Dessa forma, foi possível se certificar sobre a qualidade dos refinamentos e a coerência dos modelos estruturais propostos para cada modificação cristalina. As análises supramoleculares e determinação das interações intermoleculares foram realizadas com a ajuda dos programas Mercury 3.9¹³⁵ e PARST¹³⁶, este último incluído no pacote de programas WINGX.¹³⁰ Para visualizar as conformações estruturais e os empacotamentos cristalinos, utilizaram-se os programas Mercury 3.9¹³⁵ e Olex2.¹²⁹ Estes programas também foram empregados para a elaboração do material gráfico das estruturas cristalinas.

2.4.2 Difração de raios X por policristais (DRXP)

Os dados de difração de raios X por policristais dos compostos reportados neste trabalho foram obtidos no difratômetro Rigaku Ultima IV de geometria Bragg-Brentano, equipado com detector de cintilação, um ânodo rotatório de cobre (radiação $\text{CuK}\alpha = 1,5418\text{\AA}$) e filtro de Ni. Uma tensão de 40 kV foi aplicada gerando uma corrente de 30 mA. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, com um intervalo de detecção compreendido entre 5° a 50° em 2θ e passo de amostragem de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 5s por passo. As amostras foram trituradas em almofariz de ágata e pulverizadas em lâminas de vidro sulcadas, usadas como porta-amostra. Os difratogramas experimentais foram comparados com os padrões teóricos de DRXP simulados através do programa Mercury 3.9.¹³⁵ As simulações foram realizadas sob as mesmas condições dos padrões experimentais (radiação $\text{CuK}\alpha$ e faixa angular de varredura em 2θ) utilizando os arquivos *.cif* validados para as estruturas cristalinas determinadas previamente.

2.4.3 Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) e Raman

Os espectros vibracionais na região do infravermelho dos sais de etionamida e etambutol foram registrados em um espectrômetro Alpha Bruker FT-IR na região de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ com uma média de 256 acumulações e 2 cm^{-1} de resolução espectral utilizando como suporte pastilhas de KBr. Já os espectros IV dos cocristais de INH foram obtidos por meio de um espectrômetro Bruker Vertex 70v, utilizando módulo ATR e um intervalo espectral de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ com 256 acumulações e 2 cm^{-1} de resolução espectral. Os dados de espectroscopia Raman foram adquiridos utilizando um instrumento Bruker RFS 100 equipado com um laser $\text{Nd}^{3+}/\text{YAG}$ operando em 1064 nm, no infravermelho próximo, e um detector de Ge resfriado com nitrogênio líquido, com uma média de 512 acumulações e 4 cm^{-1} de resolução espectral.

2.4.4 Análises térmicas

Os sais de etionamida e etambutol e os cocristais de isoniazida foram caracterizados pelas técnicas térmicas de calorimetria exploratória diferencial (CED), termogravimetria (TG) e microscopia ótica térmica com sistema *Hot-stage*. As análises por CED foram realizadas num calorímetro Shimadzu® modelo DSC-60. Durante as medidas de CED as amostras foram

aquecidas através de um termopar, sob um fluxo de nitrogênio (N_2) com vazão de 50 mL min^{-1} . As amostras foram pesadas (cerca de $2,5 \pm 0,5 \text{ mg}$) em cadinhos de alumínio (usados como porta-amostras e referências) e selados por uma prensa. Posteriormente as amostras foram conduzidas a uma taxa de aquecimento de $10^\circ \text{ min}^{-1}$, desde a temperatura ambiente até as correspondentes temperaturas de decomposição, conforme o avanço do perfil da curva. As análises termogravimétricas (TG) foram realizadas em uma termobalança Shimadzu® modelo TGA-60. Aproximadamente $5,0 \pm 0,5 \text{ mg}$ das amostras foram colocadas em cadinhos de alumina, os quais foram previamente lavados com acetona a fim de remover possíveis impurezas. As medidas foram realizadas utilizando uma taxa de aquecimento de $10^\circ \text{ min}^{-1}$, dentro de uma faixa de temperatura de 25°C a 600°C , sob uma atmosfera de nitrogênio (N_2) com uma vazão de 50 mL min^{-1} . Os dados obtidos de ambas as curvas foram processados usando o software de análise de dados térmicos TA-60. As energias e as perdas de massa envolvidas nos eventos térmicos bem como as temperaturas nas quais ocorreram cada evento foram também determinadas com auxílio deste mesmo software.

Os cristais das novas formas sólidas obtidas também foram analisados utilizando um microscópio de luz polarizada Leica®, modelo DM2500P, conectado ao sistema Linkam T95-PE. Este microscópio é equipado com objetivas capazes de ampliar de 40x até 630x, além de uma câmera digital acoplada e um software de captação de imagens em tempo real (Linksys 32) que permitem adquirir, analisar e processar imagens de altíssima qualidade dos cristais. Acoplado a este equipamento, há também uma placa de aquecimento *Hot-Stage* controlada pelo software Linksys 32 que permite ajustar a temperatura da amostra. Dessa forma, cristais de cada uma das novas modificações cristalinas foram colocados numa lamínula de vidro de 13 mm e, posteriormente, dentro de um bloco de aquecimento de prata de 22 mm de diâmetro que faz parte do sistema Linkam T95-PE. As amostras foram aquecidas a uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, em atmosfera de ar, de 25°C até uma temperatura final que fosse possível verificar a fusão e/ou a degradação das amostras. As imagens de microscopia *Hot-stage* complementaram os resultados observados nas curvas de CED e TG das amostras, apresentando uma boa concordância.

2.4.5 Medidas de solubilidade em equilíbrio

A solubilidade em equilíbrio do sal nitrato de etionamida (ETHNO3) e do fármaco etionamida (ETH) foi determinada através do método miniaturizado de agitação em frasco.¹³⁷ Para isso, três meios de dissolução foram utilizados, sendo um deles água e os outros dois

sistemas tampão, que manteve o pH em 7,0 e em 4,0 durante os experimentos. A temperatura do laboratório durante os experimentos foi mantida a 25°C. Inicialmente, soluções saturadas das amostras foram preparadas seguindo o método da saturação descrito por Higuchi e colaboradores.¹³⁸ A formação de uma solução saturada é verificada pela presença de material sólido não dissolvido após agitação, a uma determinada temperatura, indicando que a quantidade máxima do sólido que pode ser dissolvida em um volume determinado de solvente já fora alcançada. Neste ponto, as velocidades de dissolução e agregação molecular à fase sólida se equivalem, configurando, portanto, um estado de equilíbrio termodinâmico.¹³⁷

Dessa forma, cerca de 200 mg de nitrato de etionamida e 100 mg de etionamida foram transferidos para recipientes apropriados já contendo 500 µL de cada um dos respectivos meios de dissolução. Em seguida, cada mistura foi agitada sob 450 rpm, durante 24 horas permitindo atingir o equilíbrio termodinâmico. Posteriormente, essas misturas foram filtradas através de um filtro (Millipore®) de 0,45 mm. Deste filtrado, uma alíquota de 100 µL foi retirada e diluída em 10 mL de água ou dos meios tamponados. A solução resultante foi diluída novamente até que uma concentração adequada fosse alcançada para as leituras das absorbâncias. As absorbâncias foram determinadas utilizando as alíquotas finais devidamente diluídas em um espectrofotômetro UV-vis Uv-1800 (Shimadzu®). O comprimento de onda selecionado foi 284 nm que representa o máximo de absorbância para a etionamida. A concentração da etionamida nas soluções foi determinada interpolando os resultados de absorbância obtidos para as soluções de etionamida e de seu respectivo sal de nitrato em uma curva de calibração gerada com uma amostra padrão de etionamida. A curva de calibração foi gerada com valores de concentração de 0,002, 0,004, 0,007, 0,009, 0,012, 0,016 mg mL⁻¹, os quais forneceram valores médios de absorbância de 0,019±0,004, 0,121±0,003, 0,208±0,004, 0,318±0,003, 0,375±0,002 e 0,724±0,003, respectivamente. Os valores de absorbância para cada solução de calibração foram aferidos em triplicata. As soluções de calibração foram preparadas através de diluições da solução da amostra padrão de etionamida (solução de etionamida a 0,10 mg mL⁻¹). Um coeficiente médio de correlação linear entre as concentrações das soluções de calibração e os seus valores de absorbância de 0,9997 ± 0,0002 validou a aplicação da curva gerada para interpolação dos valores de absorbância mensurados com as soluções da etionamida e de seu sal de nitrato.

A solubilidade no equilíbrio da etionamida também foi avaliada visando compará-la com a solubilidade do sal nitrato de etionamida. Nesse sentido, foi aplicada a mesma configuração experimental nos ensaios de solubilidade de ambas as formas sólidas. Além disso, os estudos de solubilidade envolvendo a etionamida também foram conduzidos com o

objetivo de gerar uma curva de calibração através de medidas espectrofotométricas de soluções de etionamida com concentrações conhecidas. Com essa curva, foi possível interpolar os resultados de absorvância obtidos experimentalmente e com isso, estimar a solubilidade dos compostos. Por se tratar de uma base fraca, a etionamida, estando na sua forma protonada (ETH^+) no caso dos sais deste fármaco, é sujeita a sofrer reações de hidrólise em meios aquosos, se convertendo em sua forma neutra (ETH) e liberando íons H_3O^+ para o meio. Com isso, o pH do meio fica sujeito a sofrer alterações, influenciando na concentração da etionamida cuja solubilidade é dependente do pH. Por este motivo, os ensaios de solubilidade foram conduzidos em sistemas tampão, sendo que os pH dos meios de dissolução foram aferidos, com auxílio de pHmetro, antes e depois dos experimentos.

3 ETIONAMIDA

Este capítulo é dedicado a apresentação dos resultados de um novo sal do fármaco etionamida (ETH). Trata-se de um sal de nitrato, denominado aqui como ETHNO3. O planejamento racional desta nova modificação cristalina foi realizado com base nos princípios da engenharia de cristais e teve como objetivo a síntese de uma nova forma sólida multicomponente que tenha propriedades farmacocinéticas melhoradas. Trabalhos recentes reportados na literatura envolvendo o fármaco etionamida demonstraram que a síntese de novos sais, dentre eles o maleato⁹⁶ e o oxalato de etionamida⁹⁸, levaram a um aumento significativo da solubilidade aquosa. Com base nesta eficiente estratégia para a melhoria da solubilidade aquosa, foi realizado o planejamento de um novo sal, a partir da reação do fármaco etionamida com ácido nítrico, visando a formação do respectivo sal de nitrato.

A maior vantagem da síntese de sais farmacêuticos é que, na maioria das vezes, essas novas formas sólidas apresentam solubilidade aquosa melhorada, o que pode significar uma maior biodisponibilidade. No caso do sal de oxalato de etionamida, por exemplo, essa correlação foi verificada com sucesso, pois este sal apresentou uma biodisponibilidade cerca de 2 vezes maior quando comparado com forma neutra.⁹⁸ Tendo isso em mente, foi analisado o comportamento supramolecular do novo salnitrato de etionamida (ETHNO3) anteriormente mencionado, a fim de correlacionar suas características estruturais com as suas propriedades farmacocinéticas.

3.1 Análise conformacional e interações intermoleculares

Monocristais com boa qualidade do sal nitrato de etionamida apresentando morfologia de placas foram selecionados para o experimento de DRXM. Este sal cristalizou no grupo espacial triclínico centrossimétrico $P\bar{1}$ com quatro unidades catiônicas ETH^+ (denominadas de coformadores A, B, C e D) e, consequentemente, quatro pares iônicos $\text{ETH}^+\text{NO}_3^-$ por unidade assimétrica, além dos quatro ânions nitrato. A unidade assimétrica do sal nitrato de etionamida está representada na Figura 5. Detalhes do refinamento e dados cristalográficos do sal nitrato de etionamida estão relacionados na Tabela 3.

Figura 5 - Unidade assimétrica do sal nitrato de etionamida.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Dados cristalográficos e do refinamento do sal nitrato de etionamida.

Identificação do cristal	ETHNO3
Fórmula molecular	C ₃₂ H ₄₄ N ₁₂ O ₁₂ S ₄
Peso molecular	917,03
Temperatura (K)	293(1)
Sistema Cristalino	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>a</i> (Å)	7,7527(11)
<i>b</i> (Å)	15,994(2)
<i>c</i> (Å)	17,9278(17)
α (°)	75,511(10)
β (°)	85,936(10)
γ (°)	85,022(12)
Volume (Å ³)	2141,4(5)
<i>Z</i> / <i>Z'</i>	2/4
ρ_{calc} (g cm ³)	1,422
μ (mm ⁻¹)	0,294
Reflexões coletadas	17090
Reflexões independentes	7833
<i>R</i> ₁ [<i>I</i> ≥ 2σ (<i>I</i>)]	0,0869
<i>wR</i> ₂ [<i>all data</i>]	0,2444
<i>S</i>	1,008

Fonte: Elaborada pelo autor

Na estrutura do sal cada cátion ETH⁺ está conectado ao seu respectivo ânion NO₃⁻ por uma ligação de hidrogênio assistida por carga, do tipo N⁺–H···O⁻, envolvendo o nitrogênio do anel piridínico e um átomo de oxigênio do nitrato. A protonação do anel piridínico foi confirmada pela localização do próton no mapa de Fourier e pela análise do ângulo C4–N2–C5 no anel de piridínico. Esse ângulo, que assume o valor de 118° na ETH neutra⁷⁸, aparece nas quatro moléculas independentes ampliadas, na faixa de 122-124° (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise do ângulo interno C2-N3-C4 da piridina da ETH e das moléculas A-D do sal ETHNO3.

Composto	Ângulo C4-N2-C5 / °
ETH (forma neutra)	118,3(2)
ETHNO3 (molécula A)	122,8(6)
ETHNO3 (molécula B)	123,1(6)
ETHNO3 (molécula C)	124,3(6)
ETHNO3 (molécula D)	122,0(7)

Fonte: Elaborada pelo autor

Estruturalmente, a ETH é um derivado piridinico com substituintes flexíveis, como mostrado na Figura 6, o que explica o elevado número de coformadores ETH^+ encontrados na unidade assimétrica ($Z' = 4$). A Figura 7 mostra a sobreposição a partir dos anéis piridínicos dos quatro coformadores. É possível perceber que o coformador A difere significativamente dos outros (ver valores de torção τ e χ na Tabela 5). Os coformadores B e C são praticamente equivalentes, apresentando valores de τ e χ muito semelhantes. O coformador D, por sua vez, difere dos demais pelo valor de χ .

Figura 6 - Estrutura da ETH mostrando os grupamentos flexíveis tioamida e etila e os ângulos de torção τ e χ .

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 7 - Sobreposição dos anéis piridínicos dos quatro diferentes coformadores ETH^+ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Ângulos de torção (τ e χ) para os diferentes coformadores do cátion ETH^+ .

C3A–C2A–C1A–N1A	26,7(9)	C3C–C2C–C1C–N1C	-30,7(9)
C6A–C2A–C1A–S1A	25,0(9)	C5C–C2C–C1C–S1C	-30,4(9)
N2A–C5A–C7A–C8A	-64,0(1)	N2C–C6C–C7C–C8C	64,5(9)
C6A–C5A–C7A–C8A	122,4(9)	C5C–C6C–C7C–C8C	-115,7(8)
C3B–C2B–C1B–N1B	-29,7(9)	C3D–C2D–C1D–N1D	-29,3(9)
C5B–C2B–C1B–S1B	-31,4(8)	C5D–C2D–C1D–S1D	-30,2(9)
N2B–C5B–C7B–C8B	62,0(1)	N2D–C6D–C7D–C8D	-72,0(2)
C5B–C6B–C7B–C8B	-115,9(9)	C5D–C6D–C7D–C8D	146,0(1)

Fonte: Elaborada pelo autor

No empacotamento cristalino do sal ETHNO_3 , cada anion NO_3^- está ligado por uma ligação de hidrogênio do tipo $\text{N}_2^+ \cdots \text{H}_2 \cdots \text{O}_1^-$ a um coformador ETH^+ para formar um sínton clássico entre o anion e o anel piridínico. Isto resulta em quatro pares iônicos independentes (A, B, C e D) com distâncias entre os átomos $\text{N}_2^+ \cdots \text{O}_1^-$ variando entre 2,793 a 2,857 Å (Tabela 6, Figura 8).

Figura 8 - Vista das duas cadeias independentes e simétricas I e II. As moléculas amarela, azul, vermelha e verde representam, respectivamente, os coformadores A, B, C e D.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal nitrato de etionamida (ETHNO_3).

Interação	$d(\text{D} \cdots \text{A})(\text{\AA})$	$d(\text{H} \cdots \text{A})(\text{\AA})$	$\angle \text{D}-\text{H} \cdots \text{A}(^\circ)$	código de simetria
N1A–H1AB $\cdots$ O1D	3,059(7)	2,217(5)	166,44(41)	x, +y+1, +z
N2A–H2A $\cdots$ O1A	2,793(7)	1,944(5)	169,06(39)	x, +y, +z+1
C4C–H4C $\cdots$ O3D	3,140(9)	2,459(5)	130,07(47)	-x+1, -y+1, -z+1
C4D–H4D $\cdots$ O2D	3,124(10)	2,474(6)	127,06(44)	-x+1, -y+1, -z+1
N1C–H1CB $\cdots$ O1B	3,138(6)	2,295(4)	166,78(36)	-x+2, -y+1, -z+1
N2B–H2B $\cdots$ O1B	2,843(7)	1,988(4)	173,71(37)	x-1, +y, +z
N1D–H1DA $\cdots$ O3B	3,025(8)	2,193(5)	162,86(39)	x-1, +y, +z
C4B–H4B $\cdots$ O3B	3,092(8)	2,464(5)	124,87(45)	x-1, +y, +z
N1B–H1BB $\cdots$ O1C	3,144(6)	2,298(2)	167,82(35)	-x+1, -y+2, -z

continua

continuação

C4B–H4B...O3A	3,219(10)	2,574(6)	126,87(44)	x, y, z
C4C–H4C...O3C	3,061(9)	2,417(5)	126,35(49)	x, y, z
C4D–H4D...O2D	3,055(9)	2,550(6)	114,45(43)	x, y, z
N2D–H2D...O1D	2,832(7)	1,986(4)	167,84(37)	x, y, z
N1C–H1CA...O2B	3,011(8)	2,174(6)	164,45(41)	x, y, z
N2C–H2C...O1C	2,857(7)	1,971(4)	166,48(37)	x, y, z
N1D–H1DB...O1A	3,016(7)	2,182(5)	163,28(39)	x, y, z
N1B–H1BA...O2C	3,016(8)	2,176(5)	165,55(42)	x, y, z

Fonte: Elaborada pelo autor

Os ânions NO_3^- também estão envolvidos em ligações de hidrogênio com os grupos amida das moléculas ETH^+ . De fato, os anions atuam como pontes conectando dois pares iônicos diferentes (A a D e B a C) criando duas cadeias simétricas e independentes ao longo da direção [011], como pode ser observado nas Figuras 8 e 9a. Estas cadeias estão alternadamente empilhadas ao longo do eixo *a* (Figura 9b). Na cadeia I, os ânions são praticamente coplanares com o anel de piridínico, o que justifica a existência da ligação de hidrogênio do tipo C–H...O e a formação de um padrão de interações tipo anel com código $R_2^2(7)$ (Figura 9a). Esta interação, no entanto, não é observada na cadeia II, uma vez que o ângulo diedral entre o plano do anion nitrato e do anel piridínico é $44,04^\circ$ para o par iônico A e $34,91^\circ$ para o par iônico D (Figura 10d). As cadeias I e II são conectadas por ligações de hidrogênio recíprocas (N1(A)-H1(A)...O3(C)/N1(C)-H1(C)...O3(A)) dando origem a folhas paralelas ao plano *bc* (Figura 9a). Estas folhas são também empilhadas ao longo do eixo *a* por uma combinação de ligações de hidrogênio reticuladas envolvendo as mesmas cadeias (isto é, cadeias I/I e cadeias II/II) como pode ser observado nas Figuras 10a e 10b. Conforme ilustrado na Figura 9c, o arranjo 3-D do sal nitrato de etionamida é sustentado tanto por ligações de hidrogênio clássicas (N–H...O) e não-clássicas (C–H...O) quanto por contatos de van der Waals, levando a formação de canais hidrofílicos e hidrofóbicos na estrutura.

Figura 9 - (a) Folhas 2-D formadas pela ligação das cadeias I/II a partir das ligações de hidrogênio N1(A)-H1(A)...O3(C). (b) Representação parcial do empacotamento cristalino mostrando o empilhamento das cadeias ao longo da direção [100]. (c) Empacotamento cristalino 3-D do sal nitrato de etonamida.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 - (a) Folhas 2-D formadas pela ligação das cadeias I/I a partir do padrão de interações tipo anel com código $R_4^4(12)$. (b) Folhas 2-D formadas pela ligação das cadeias II/II a partir do padrão de interações tipo anel com código $R_4^4(14)$. As moléculas amarela, azul, vermelha e verde representam, respectivamente, os coformadores A, B, C e D. (c) As duas folhas formadas estão interpenetradas de maneira inclinada, resultado do cruzamento entre elas no arranjo supramolecular. (d) Ângulo diedral entre os planos do ânion nitrato e o anel piridíneo no par iônico A.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Caracterização por DRXP

O difratograma experimental do sal ETHNO3 é apresentado na Figura 11. O padrão de difração experimental foi comparado com o padrão teórico que foi calculado mediante os resultados obtidos a partir dos dados de DRX por monocristal. A técnica de DRXP foi utilizada neste caso para duas finalidades: confirmar se o monocristal escolhido para o experimento de DRXM era representativo de toda a mostra e avaliar se houve a formação de uma nova fase cristalina durante o processo sintético. Caso isso tivesse ocorrido, essas novas fases poderiam ser facilmente detectadas no difratograma experimental através da identificação dos picos adicionais que eventualmente apareceriam. Dessa forma, a técnica de DRXP foi utilizada para garantir a pureza da nova forma sólida sintetizada.

Figura 11 - Comparação dos difratogramas simulado (em azul) e experimental (em vermelho) do sal nitrato de etionamida (ETHNO3).

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível observar na Figura 11 que existe uma boa concordância entre o padrão de difração experimental (em vermelho) e o simulado do sal ETHNO3 (em azul). Entretanto, os valores de intensidade calculados e observados de certos picos em 2θ apresentam algumas diferenças. Isto se deve a um possível problema de orientação preferencial dos cristalitos, que pode ter ocorrido durante o preparo da amostra para o experimento. Além disso, vale a pena destacar a ausência no difratograma experimental de halos amorfos referentes a regiões de espalhamento difuso dos raios X, usualmente associados à presença de material amorfo. Portanto, pela caracterização realizada a partir da técnica de DRXP foi possível inferir que a

síntese do sal nitrato de etionamida apresentou um alto rendimento e o material final encontra-se com elevada pureza.

3.3 Espectros vibracionais no infravermelho e Raman

As análises espectroscópicas foram realizadas levando em consideração as características supramoleculares do sal nitrato de etionamida. Os espectros na região do infravermelho e de espalhamento Raman do sal ETHNO3 e do fármaco ETH estão apresentados na Figura 12. As atribuições de bandas foram feitas utilizando os dados espectroscópicos de sais de nitrato e compostos relacionados ao fármaco etionamida encontrados na literatura.^{126,139-141}

Figura 12 - (a) Espectros no infravermelho do fármaco etionamida (azul) e do sal nitrato de etionamida (vermelho). (b) Espectros Raman do fármaco etionamida (azul) e do sal nitrato de etionamida (vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a comparação de ambos os espectros, é possível perceber claramente que as principais bandas da ETH estão também presentes no espectro do sal. Dentre elas, destacam-se as bandas referentes aos estiramentos das ligações N–H e C–H e as bandas referentes à deformação angular da amina primária da ETH. Por outro lado, os espectros infravermelho e Raman da ETH e do sal ETHNO₃ também apresentam claras diferenças que foram atribuídas à protonação do anel piridínico e à presença dos modos vibracionais referentes aos ânions nitratos. Uma banda de absorção foi observada em 1396 cm⁻¹ no espectro infravermelho da ETH e em 1398 cm⁻¹ no espectro Raman e foram atribuídas ao estiramento da ligação C–N do anel piridínico. Nos espectros do sal, devido à protonação, estas bandas aparecem deslocadas para menores números de onda, sendo observada em 1383 cm⁻¹ no espectro infravermelho e em 1388 cm⁻¹ no espectro Raman.

Além disso, nos espectros do sal, foi observado o aparecimento de novas bandas associadas às vibrações dos anions nitrato. O espectro infravermelho apresenta duas bandas em 1355 cm⁻¹ e 1321 cm⁻¹ que foram atribuídas ao modo de estiramento antissimétrico da ligação N–O. O mesmo achado é observado no espectro Raman, onde este modo aparece na forma de duas bandas em 1330 cm⁻¹ e 1298 cm⁻¹. Como esperado, o modo de estiramento simétrico da ligação N–O também foi observado em ambos os espectros do sal, aparecendo em 1064 cm⁻¹ no espectro infravermelho e em 1048 cm⁻¹ no espectro Raman, na forma de uma banda intensa.

3.4 Análises térmicas: curvas de TG e de CED e microscopia ótica térmica

Uma análise do comportamento térmico do sal nitrato de etionamida foi realizada com o intuito de avaliar a sua estabilidade e, conseqüentemente, a energia da rede cristalina que este sal possui em relação a ETH. Para isto, o perfil térmico do composto ETHNO₃ foi avaliado por meio da combinação de três técnicas: termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (CED) e microscopia térmica ótica. As curvas TG e CED do sal ETHNO₃ estão ilustradas na Figura 13. A amostra é estável entre 25 e 140 °C, uma vez que nenhum evento térmico foi observado em ambas às curvas neste intervalo de temperatura. A curva CED apresenta um pico endotérmico atribuído ao processo de fusão em 150,6 °C com uma temperatura inicial (*on-set*) em 145,7 °C. Nenhum outro evento térmico foi observado na curva CED antes da fusão, o que descarta a ocorrência de fenômenos de transição de fase na amostra. O processo de fusão da amostra é seguido por uma única etapa de termodecomposição. A curva TG do sal ETHNO₃ mostrou que há uma perda significativa de

massa, de aproximadamente 90%, entre 180 e 300 °C. A decomposição da amostra é acompanhada por evento exotérmico, que aparece na forma de um pico em 195,2 °C na curva CED. Assim, a decomposição térmica deste sal é um processo exotérmico e ocorre basicamente em uma única etapa.

Figura 13 - Curvas TG e de CED do sal nitrato de etionamida (ETHNO₃).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, o cristal do sal ETHNO₃ foi avaliado por microscopia ótica térmica. Esta técnica permite o acompanhamento em tempo real das transformações que acontecem no cristal quando varia-se a temperatura usando um sistema de *Hot-stage* acoplado a um microscópio óptico contendo uma câmara de vídeo. Vale ressaltar que, embora os experimentos de microscopia ótica térmica e os de CED/TG tenham sido realizados sob diferentes atmosferas, os resultados finais tiveram uma boa concordância. Uma primeira análise mostrou que o cristal da amostra apresenta a morfologia de placas alongadas, conforme observado no experimento de DRXM. As imagens de termomicroscopia ótica (Figura 14) mostram que o cristal de ETHNO₃ começa a fundir em aproximadamente 145 °C, conforme demonstrado na curva de CED. Além disso, foi possível observar que após a fusão do cristal, um resíduo líquido homogêneo foi formado, e este se manteve estável até aproximadamente 180 °C. Somente após essa temperatura é que se observou uma gradual evaporação do material até uma temperatura aproximada de 260 °C. Esses resultados concordam com os que foram observados na curva TG.

Figura 14 - Microscopia ótica e análise térmica por *Hot-Stage* de um cristal do sal ETHNO3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O ponto de fusão é uma propriedade física que pode ser relacionada com a energia da rede cristalina (E_{rede}) e, portanto, com a força das interações entre as espécies químicas dentro de um determinado sistema químico, como um cristal por exemplo. A energia de rede para um sólido cristalino é definida como a energia necessária para separar os íons ou moléculas a uma distância suficiente um do outro, de modo que não exista mais interação entre eles.^{36,118} Uma vez que existe uma demanda energética necessária para fazer isso, quanto maior a energia da rede cristalina maior será o ponto de fusão do composto. O ponto de fusão da ETH é de 160,2 °C⁹⁶, superior ao ponto de fusão do seu sal de nitrato correspondente que é de 150,6 °C. Dessa forma, apesar da natureza não-iônica, as moléculas de ETH parecem estar mais ligadas do que as entidades iônicas do sal ETHNO3, ou seja, o arranjo cristalino da ETH é mais coeso, indicando que: $E_{rede} (ETH) > E_{rede} (ETHNO3)$.

3.5 Solubilidade em equilíbrio

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes de um IFA, porque está intrinsecamente relacionada ao processo de absorção e, consequentemente, à eficácia terapêutica.⁵⁹ Considerando o contexto farmacêutico, a solubilidade em equilíbrio pode ser definida como a quantidade máxima de fármaco dissolvida num meio a uma temperatura e pH específicos.¹⁴² A solubilidade em equilíbrio do sal ETHNO3 e do fármaco ETH foi determinada a 25 °C e em dois sistemas tampões diferentes que mantiveram o pH em 4,0 e 7,0 bem como em água purificada. A solubilidade da forma neutra da ETH foi determinada, pois em formulações farmacêuticas a ETH é encontrada nessa forma. A solubilidade em equilíbrio do sal ETHNO3 foi consideravelmente maior que a solubilidade da ETH em todos os meios considerados no experimento, como pode ser observado na Tabela 7 e na Figura 15.

Figura 15 - Valores de solubilidade em equilíbrio encontrados para a ETH e para o sal ETHNO3 nos diferentes meios de dissolução
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Valores de solubilidade em equilíbrio (em mg/mL) encontrados para a ETH e para o sal ETHNO3 nos diferentes meios de dissolução.

Composto	Solubilidade em água	Solubilidade em tampão pH 4,0	Solubilidade em tampão pH 7,0
ETH	0,42	0,68	0,38
ETHNO3	95,52	139,01	122,92

Fonte: Elaborada pelo autor

A ETH, segundo o SCB, é um fármaco classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade). A solubilidade aquosa em equilíbrio a 25 °C encontrada para este fármaco foi de 0,42 mg/mL, valor muito próximo com o descrito na literatura (0,40 mg/mL).⁹⁶ Geralmente, modificações cristalinas formadas por entidades iônicas são mais solúveis que as correspondentes formas cristalinas neutras.^{5,20} Desta forma, as altas solubilidades do nitrato de etionamida estão de acordo com o caráter iônico desta modificação cristalina. Vale ressaltar, que a solubilidade deste sal foi aumentada de 204 a 323 vezes em relação a ETH, se levarmos em consideração os diferentes meios de dissolução utilizados (ver Tabela 7), o que deve ser encarado com otimismo por se tratar de um fármaco de baixa solubilidade (classe II). Além disso, trabalhos recentes de engenharia de cristais envolvendo a ETH mostraram que a dissolução e a biodisponibilidade deste IFA podem ser aumentadas com a formação de sais farmacêuticos.^{98,143}

Para ambos compostos, a solubilidade máxima foi alcançada quando o pH do meio de dissolução era 4,0. A solubilidade da ETH e do ETHNO3 em tampão pH 4,0 foi de 0,68 mg/mL e 139,01 mg/mL, respectivamente. É importante mencionar que os difratogramas dos

resíduos sólidos gerados no final do experimento de solubilidade (Figura 16), tiveram uma boa concordância com os padrões teóricos simulados a partir das respectivas estruturas cristalinas. Além disso, os valores de pH medidos ao final do experimento não apresentaram variação significativa (Tabela 8), excluindo a possibilidade de ocorrência de fenômenos de transição de fase na amostra durante os experimentos.

Em comparação com a solubilidade do ETHNO_3 em meio ácido (pH 4,0), o valor encontrado em água foi menor (95,52 mg/mL). Mesmo assim, a solubilidade aquosa do ETHNO_3 continua sendo cerca de 230 vezes maior que a da ETH (0,42 mg/mL). A razão para isso é que, em meios aquosos, o sal ETHNO_3 sofre uma hidrólise parcial, na qual a unidade catiônica ETH^+ reage com moléculas de água do meio, sendo convertida em sua forma neutra (ETH) que é menos solúvel. Em consequência dessa reação, íons H_3O^+ são liberados para o meio, o que leva a uma diminuição do pH conforme demonstrado na Tabela 8 (de 5,90 para 3,05). Com o pH do meio diminuído, as moléculas neutras de ETH formadas permanecem em solução, já que a solubilidade da ETH em meios ácidos é consideravelmente maior que em meios neutros.⁹⁶ Dessa forma, não foi possível detectar a presença da fase cristalina da ETH nos difratogramas dos resíduos do ETHNO_3 (Figura 16).

A solubilidade da ETH, quando o pH do meio de dissolução era 7,0 (neutro), foi praticamente a mesma em água (0,38 mg/mL). Para o sal ETHNO_3 , em pH 7,0, foi encontrado um valor de solubilidade maior que o encontrado em água (122,92 mg/mL), porém menor do que o obtido em pH 4,0. Uma vez que não houve variação nos valores finais de pH nos meios tamponados, a ocorrência de possíveis fenômenos de transição de fase foi descartada.

Tabela 8 - Valores de pH medidos nos meios de dissolução antes e depois dos experimentos de solubilidade.

Meio de dissolução	pH 4,0	pH 7,0	H ₂ O
pH inicial (meio de dissolução)	4,00	7,00	5,90
pH final (solução de ETH)	4,08	6,95	6,10
pH final (solução de ETHNO_3)	3,86	6,88	3,05

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 16 - (a) Difrátogramas experimentais dos resíduos sólidos provenientes dos experimentos de solubilidade da ETH nos diferentes meios de dissolução. (b) Difrátogramas experimentais dos resíduos sólidos obtidos a partir dos experimentos de solubilidade do sal ETHNO₃ nos diferentes meios de dissolução. Os padrões de difração calculados de cada composto foram incluídos para comparação. Fonte: Elaborada pelo autor.

4 ETAMBUTOL

Neste capítulo são apresentados os resultados de três novas modificações cristalinas do fármaco antituberculose etambutol. Trata-se de três novos sais farmacêuticos, que foram obtidos a partir da reação do ETB, na forma de base livre, com os seguintes ácidos carboxílicos: oxálico, maleico e tereftálico. Isso permitiu a obtenção com sucesso dos seguintes sais: oxalato de etambutol (ETBOXA), maleato de etambutol (ETBMAL) e tereftalato de etambutol (ETBTRF). Por se tratar de uma base forte com valores de pKa de 9,35 e 6,35⁹⁹, a molécula de ETB é facilmente protonada por ácidos orgânicos e inorgânicos, e essa eficiente estratégia tem sido amplamente utilizada para a formação de novos sais de ETB. A grande vantagem disso é que os compostos resultantes apresentam maior estabilidade e, sobretudo, maior solubilidade aquosa. Entretanto, a característica mais indesejável do ETB, que inclusive compromete a qualidade de formulações farmacêuticas, é a alta higroscopicidade deste IFA.

Nos últimos anos, uma série de modificações cristalinas do ETB foram reportadas na literatura com o intuito de resolver o problema da higroscopicidade deste fármaco.^{80-83,144} Recentemente, Nangia e colaboradores⁸⁴ reportaram cinco novos sais e dois líquidos iônicos do ETB, e todas essas novas modificações cristalinas mostraram ser higroscópicas. Apesar destes inúmeros esforços, o problema da higroscopicidade do ETB ainda segue em aberto, o que compromete a qualidade das formulações farmacêuticas do tipo DFC, que se baseiam no uso combinado, num único comprimido, de fármacos antituberculose. Diante disso, três novas modificações cristalinas foram realizadas e suas propriedades no estado sólido foram avaliadas. A análise supramolecular e do empacotamento cristalino dos sais de oxalato, maleato e tereftalato de etambutol foi feita visando correlacionar as características estruturais destes compostos com propriedades importantes no estado sólido, dentre elas, a estabilidade e a higroscopicidade.

4.1 Análise supramolecular e empacotamento cristalino

As reações entre o fármaco ETB e os ácidos carboxílicos levaram a formação de novos sais que apresentaram diferentes proporções estequiométricas em suas respectivas unidades assimétricas. Inicialmente, era esperado que todos os sais apresentassem uma estequiometria ETB/coformador (cátion/ânion) de 1:1, uma vez o ETB possui dois átomos de nitrogênio passíveis de protonação e os todos coformadores são ácidos dicarboxílicos. Entretanto, os

ácidos maleico e oxálico desprotonaram parcialmente, liberando apenas um de seus prótons para o meio. Esse comportamento pode ser explicado devido a uma grande diferença ($>$ que 3 unidades) entre os valores de pKa dos grupos carboxílicos desses dois ácidos (Tabela 1). Por outro lado, para o ácido tereftálico, os valores de pKa₁ e pKa₂ são bem próximos, indicando que há uma probabilidade muito maior que ambos os grupos carboxílicos desprotonem simultaneamente.

Além da análise dos valores de pKa dos ácidos carboxílicos, para todas as estruturas cristalinas de ETB reportadas neste trabalho, a identificação da forma cristalina foi também suportada medindo a diferença do comprimento das ligações C–O (ΔD_{C-O}) nas moléculas dos ácidos (coformadores). Quando o comprimento dessas ligações são próximos, isto é, a diferença ΔD_{C-O} for menor que 0,03 Å, existe um forte indicativo da ocorrência de um fenômeno ressonante motivado pela perda de um próton.¹⁸ Com isso, o grupo carboxílico torna-se carregado na forma de um ânion carboxilato. Levando em consideração todas essas informações e partir dos dados de DRXM, uma descrição cristalográfica da estrutura e empacotamento cristalino de cada sal de ETB será feita a seguir. Na Tabela 9 estão descritos os dados cristalográficos e os detalhes de cada refinamento dessas novas modificações cristalinas.

Tabela 9 -Dados cristalográficos e dos refinamentos dos sais de ETB: oxalato, maleato e tereftalato.

Identificação do cristal	ETBOXA	ETBMAL	ETBTRF
Fórmula molecular	C ₇ H ₁₄ NO ₅	C ₁₈ H ₃₂ N ₂ O ₁₀	C ₁₈ H ₃₀ N ₂ O ₆
Peso molecular	192,19	174,18	185,22
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Sistema cristalino	Ortorrômbico	Ortorrômbico	Triclínico
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P1
<i>a</i> (Å)	5,5391(4)	5,7004(6)	5,7153(2)
<i>b</i> (Å)	21,3637(19)	19,2444(19)	8,3805(4)
<i>c</i> (Å)	7,9772(5)	20,694(4)	10,7486(5)
α (°)	90	90	70,141(4)
β (°)	90	90	85,652(3)
γ (°)	90	90	88,231(4)
Volume (Å ³)	943,99(12)	2270,1(5)	482,81(4)
<i>Z</i> / <i>Z'</i>	2 / ½	4 / 1	1 / 1
ρ_{calc} (g cm ³)	1,352	1,274	1,274
μ (mm ⁻¹)	0,115	0,104	0,095
F(000)	412,0	932,0	200,0
Reflexões coletadas	5775	10447	9861
Reflexões independentes	1875	3904	3897
R ₁ [<i>I</i> ≥ 2σ(<i>I</i>)]	0,0468	0,0589	0,0460

continua

wR ₂ [all data]	0,1125	0,1507	0,1231
S	1,086	1,088	1,054
Parâmetro de Flack	0,0(10)	0,1(9)	-0,3(5)

Fonte: Elaborada pelo autor

4.1.1 Oxalato de etambutol

O sal oxalato de etambutol (ETBOXA) cristalizou no grupo espacial ortorrômbico não-centrossimétrico $P2_12_12$. A unidade assimétrica deste sal, representada na Figura 17, é constituída por um ânion oxalato parcialmente desprotonado (OXAH⁻) e metade de um cátion de etambutol ([ETBH₂]²⁺). O cátion [ETBH₂]²⁺ encontra-se num eixo de ordem 2, o que gera uma estequiometria de 0,5: 1 ([ETBH₂]²⁺/OXAH⁻) na unidade assimétrica ($Z' = \frac{1}{2}$). A Tabela 10 mostra os parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio deste sal.

Figura 17 - Unidade assimétrica do sal oxalato de etambutol (ETBOXA).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 10 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal oxalato de etambutol (ETBOXA).

Interação	$d(D \cdots A)(\text{\AA})$	$d(H \cdots A)(\text{\AA})$	$\angle D-H \cdots A(^{\circ})$	código de simetria
O1-H1 $\cdots$ O1A ⁻	2,787(3)	1,996(2)	161,72(12)	x,y,z
O3A-H3AA $\cdots$ O1A ⁻	2,465(2)	1,647(1)	175,56(14)	x,y,z
N1 ⁺ -H1A $\cdots$ O4A ⁻	2,956(3)	2,217(2)	140,13(15)	x+1,+y,+z
N1 ⁺ -H1B $\cdots$ O2A ⁻	2,859(3)	1,980(1)	169,12(14)	x+1,+y,+z+1

Fonte: Elaborada pelo autor

A desprotonação parcial do ácido não pôde ser comprovada pela análise dos valores de ΔD_{C-O} , uma vez que os resultados encontrados para a molécula do oxalato foram de 0,049 e 0,086 Å. O sal ETBOXA possui uma estrutura 2D em camadas sustentada pela formação dos seguintes síntons supramoleculares: NH⁺ $\cdots$ COO⁻, OH $\cdots$ COO⁻ e COOH $\cdots$ COO⁻. No empacotamento cristalino (Figura 18a), os cátions [ETBH₂]²⁺ estão associados aos ânions OXAH⁻ através de ligações de hidrogênio do tipo N-H $\cdots$ O (N1⁺-H1A $\cdots$ O4A, 2,956 Å, 140,1° e N1⁺-H1B $\cdots$ O2A, 2,859 Å, 169,1°) para formar cadeias 1D ao longo da direção

[001] (Figura 18b). Além dessas interações, os ânions OXAH^- também estão conectados ao grupo hidroxila do cátion $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ através da ligação de hidrogênio $\text{O1-H1}\cdots\text{O1A}^-$ (2,787 Å, 161,7°). Adicionalmente, os ânions OXAH^- também estão interagindo entre si por ligações de hidrogênio do tipo $\text{O-H}\cdots\text{O}$ ($\text{O3A-H3AA}\cdots\text{O1A}$, 2,465 Å, 175,5°), para formar duas cadeias 1D independentes que se propagam em sentidos opostos ao longo da direção [100] (Figura 18c). Nessas cadeias, os átomos de hidrogênio dos grupos carboxílicos que permanecem protonados estão sendo compartilhados, ou até mesmo podem estar localizados no centro dos dois átomos de oxigênio da ligação $\text{O3A-H3AA}\cdots\text{O1A}$. Este atributo estrutural, explica a diferença dos valores de $\Delta D_{\text{C-O}}$ encontrados para o ânion oxalato. A formação dessas cadeias de ânions dentro do cristal só foi possível em virtude da desprotonação parcial do ácido oxálico. Este fenômeno acontece com uma certa frequência para o ácido oxálico, sendo verificado em diversas estruturas que contém essa molécula. Estas cadeias 1D de oxalato estão perpendicularmente empilhadas ao longo da direção [010], como mostrado no empacotamento cristalino do sal, representado na Figura 18a.

Figura 18 - (a) Empacotamento cristalino do sal ETBOXA ao longo da direção [100]. (b) Representação das ligações de hidrogênio das cadeias 1D ao longo da direção [001]. (c) Visão parcial do empacotamento mostrando as cadeias independentes formadas pelos ânions OXAH^- ao longo da direção [100].

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Maleato de etambutol

O sal maleato de etambutol (ETBMAL, 1:2) cristalizou no grupo espacial ortorrômbico não-centrossimétrico $P2_12_12_1$ com a presença de um cátion $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ e dois ânions MALH^- na unidade assimétrica, na proporção estequiométrica de 1: 2. A transferência de um próton de cada molécula de ácido maleico para uma única molécula ETB confirma a formação do sal com a protonação de ambos os nitrogênios dos grupos amina do ETB. Esta evidência concorda com os valores de $\Delta D_{\text{C-O}}$ calculados para somente um dos ânions de maleato (0,024 Å e 0,058 Å). O outro ânion maleato apresenta distâncias de ligação C–O muito desiguais (1,273/1,215 Å e 1,281/1,225 Å), o que fornece valores de $\Delta D_{\text{C-O}}$ de 0,058 Å e 0,056 Å, acima do limite definido ($\Delta D_{\text{C-O}} < 0,03$ Å). Conforme esperado, os ânions maleato exibem uma configuração planar estabilizada pela ligação de hidrogênio intramolecular O–H $\cdots$ O (O2A–H4AA $\cdots$ O4A, 2,418 Å, 172,7° e O2B–H4BA $\cdots$ O4B, 2,416 Å, 173,56°). Este fenômeno, característico de ânions maleato⁹⁶, faz com que a molécula do ácido libere apenas um próton, já que outro quase sempre está envolvido na ligação de hidrogênio intramolecular. Essa característica se assemelha muito com o que foi observado para o ânion oxalato na estrutura do sal ETBOXA. A Figura 19 mostra a unidade assimétrica do sal ETBMAL e na Tabela 11 estão representados os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio.

Figura 19 - Unidade assimétrica do sal maleato de etambutol (ETBMAL).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 11 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal maleato de etambutol (ETBMAL).

Interação	$d(D\cdots A)(\text{\AA})$	$d(H\cdots A)(\text{\AA})$	$\angle D-H\cdots A(^{\circ})$	código de simetria
O2-H2C $\cdots$ O1 $^{-}$	2,765(2)	1,948(1)	174,37(13)	-x+1/2+2,-y+1, +z-1/2
O1-H1 $\cdots$ O2B $^{-}$	2,763(2)	1,954(1)	168,91(16)	-x+1/2+2,-y+1,+z+1/2
N1 $^{+}$ -H1A $\cdots$ O1B $^{-}$	2,735(2)	1,891(1)	157,65(17)	-x+1/2+1,-y+1,+z+1/2
N1 $^{+}$ -H1B $\cdots$ O3A $^{-}$	2,748(2)	1,858(1)	178,19(11)	-x+1,+y+1/2,-z+1/2+1
N2 $^{+}$ -H2B $\cdots$ O3B $^{-}$	2,783(2)	1,913(2)	165,08(15)	x+1/2,-y+1/2+1,-z+1
N2 $^{+}$ -H2A $\cdots$ O1A $^{-}$	2,785(2)	1,944(1)	156,96(16)	x+1,+y,+z
C2A-H2AA $\cdots$ O2A $^{-}$	3,384(3)	2,532(2)	152,47(19)	x+1, +y, +z
C3A-H3AA $\cdots$ O4A $^{-}$	3,479(3)	2,576(2)	163,62(18)	x+1, +y, +z
C2B-H2BA $\cdots$ O2B $^{-}$	3,541(3)	2,676(2)	155,15(17)	x-1,+y,+z
C3B-H3BA $\cdots$ O4B $^{-}$	3,412(3)	2,591(2)	147,54(19)	x-1,+y,+z

Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar das diferenças nas celas unitárias (conforme descrito na Tabela 9), o sal de maleato apresenta algumas semelhanças supramoleculares com o sal de oxalato (ver Figuras 18a e 20a). As interações do tipo OH $\cdots$ COO $^{-}$ são verificadas em ambos os sais, bem como o sinton principal NH $^{+}$ $\cdots$ COO $^{-}$. No empacotamento cristalino, os ânions MALH $^{-}$ atuam como pontes conectando os cátions [ETBH $_2$] $^{2+}$ através de interações do tipo N $^{+}$ -H $\cdots$ O $^{-}$ (ver Tabela 11) para formar cadeias 1D ao longo da direção [010] (Figura 20b). Essas cadeias 1D estão ainda conectadas entre si por meio de ligações de hidrogênio do tipo O-H $\cdots$ O (O2-H2C $\cdots$ O1, 2,765 Å, 174,3 $^{\circ}$) envolvendo os grupos OH de moléculas de ETB adjacentes (Figura 20a). Como resultado, é possível observar a formação de camadas 2D, paralelas ao plano (001), na estrutura. Adicionalmente, os ânions MALH $^{-}$ também formam uma infinita e independente cadeia 1D ao longo da direção [100] através de ligações de hidrogênio não-clássicas do tipo C-H $\cdots$ O, dando origem a um padrão de interações tipo anel com código $R_2^2(7)$ (Figura 20c). De maneira semelhante ao que foi observado na estrutura do sal ETBOXA, essas cadeias se propagam em sentidos opostos ao longo da direção [100], sendo empilhadas perpendicularmente ao longo da direção [001] (Figura 20a).

Figura 20 - (a) Empacotamento cristalino do sal ETBMAL no plano *bc*. (b) Arranjo das cadeias 1D independentes formadas entre o cátion [ETBH₂]²⁺ e o ânion MALH⁻ ao longo do eixo *b*. (c) Representação dos sínons *R*₂²(7) de ânions maleatos que estão conectados entre si via ligações de hidrogênio do tipo C-H...O ao longo do eixo *a* (c).
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Tereftalato de etambutol

O sal tereftalato de etambutol (ETBTRF) cristalizou no sistema cristalino triclinico com o grupo espacial não-centrossimétrico *P1* e a sua unidade assimétrica é constituída por um cátion [ETBH₂]²⁺ e um ânion tereftalato (TRF²⁻) totalmente desprotonado, satisfazendo a proporção estequiométrica de 1:1. A unidade assimétrica deste sal está representada na Figura 21 e os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio podem ser vistos na Tabela 12.

Figura 21 - Unidade assimétrica do sal tereftalato de etambutol (ETBTRF).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 12 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para o sal tereftalato de etambutol (ETBTRF).

Interação	$d(D\cdots A)(\text{\AA})$	$d(H\cdots A)(\text{\AA})$	$\angle D-H\cdots A(^{\circ})$	código de simetria
O1-H1 $\cdots$ O3 $^{-}$	2,826(2)	2,109(2)	145,95(16)	x,y,z
O2-H2C $\cdots$ O5 $^{-}$	2,751(2)	1,957(1)	162,44(13)	x,+y+1,+z+1
N1 $^{+}$ -H1A $\cdots$ O5 $^{-}$	2,744(2)	1,868(1)	167,58(12)	x,+y,+z+1
N2 $^{+}$ -H2A $\cdots$ O6 $^{-}$	2,777(2)	1,926(1)	159,46(15)	x-1,+y,+z+1
N2 $^{+}$ -H2B $\cdots$ O3 $^{-}$	2,735(2)	1,854(1)	170,19(10)	x-1,+y+1,+z
N1 $^{+}$ -H1B $\cdots$ O4 $^{-}$	2,761(2)	1,916(1)	157,92(16)	x,+y,+z+1
C4-H4C $\cdots$ C $_{g}^{*}$	3,647(3)	2,802(2)	147,35(18)	x,y,z

*C $_g$: C12 $\rightarrow$ C17

Fonte: Elaborada pelo autor

A protonação dos nitrogênios das duas aminas secundárias da molécula de ETB pelo ácido tereftálico foi confirmada por valores de ΔD_{C-O} (0,024 e 0,030 Å). A presença do principal sinton supramolecular $NH^{+}\cdots COO^{-}$ na estrutura, recorrente em todos os sais de etambutol descritos anteriormente, levou à formação de um padrão de interações tipo anel com código $R_4^4(12)$ na estrutura cristalina do sal, sendo definido por quatro ligações de hidrogênio do tipo $N^{+}-H\cdots O^{-}$ (ver Tabela 12 e Figura 22b). Os padrões de interações tipo anel com código $R_4^4(12)$ estão ordenados de tal forma que um arranjo 3D é criado a partir das ligações de hidrogênio O1-H1 $\cdots$ O3 $^{-}$ (2,826 Å, 145,9°) e O2-H2C $\cdots$ O5 $^{-}$ (2,751 Å, 162,4°) (Figura 22a). Além destas interações, os cátions $[ETBH_2]^{2+}$ e ânions TRF^{2-} também estão ligados ao longo da direção [010] por meio de ligações de hidrogênio não-clássicas do tipo

$C-H\cdots\pi$ ($C4-H4C\cdots Cg$, 3,647 Å, 147,3°) que auxiliam na estabilização da estrutura (Figura 22c).

Figura 22 - (a) Empacotamento cristalino do sal ETBTRF no plano *bc* mostrando que camadas dos cátions [ETBH₂]²⁺ e ânions TRF²⁻ estão empilhadas de maneira alternada na estrutura. (b) O sínton supramolecular NH⁺...COO⁻ leva a formação de um padrão de interações tipo anel com código *R*₄⁴(12). (c) Ao longo do eixo *b* interações do tipo O-H...O e C-H... π conectam os padrões de interações tipo anel com código *R*₄⁴(12) adjacentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.4 Análise conformacional

As unidades estruturais catiônicas do etambutol, [ETBH₂]²⁺, apresentam certa liberdade conformacional (rotacional) em torno de algumas ligações específicas. Essa importante característica define a orientação espacial de certos grupos funcionais da molécula e, portanto, a orientação dos síntons supramoleculares que posteriormente serão responsáveis pelas interações intermoleculares. Nesse sentido, as ligações mais passíveis de rotação nas moléculas de ETB, referem-se às ligações C-C e C-N. No caso do ETB, a liberdade rotacional dessas ligações tornam-se ainda mais evidentes, por se tratar de uma molécula alifática e com poucos efeitos de impedimento estérico entre esses fragmentos. A Figura 23

mostra a sobreposição da molécula do ETB (forma neutra) com as três unidades catiônicas dos sais obtidos neste trabalho. A sobreposição das quatro moléculas foi realizada a partir do fragmento central de cada estrutura que contém os átomos N1, C5, C6 e N2. Diante da sobreposição das moléculas, é possível perceber claramente que os grupamentos terminais, hidroxila $-OH$ e etila $-CH_2CH_3$, diferem significativamente em suas respectivas conformações de um composto para o outro. Essa observação é corroborada pelos diferentes valores encontrados para os ângulos de torção N1–C2–C1–O1 e N1–C2–C3–C4, conforme mostrado na Tabela 13.

Figura 23 - Sobreposição das conformações moleculares do Etambutol (cinza) e das três unidades catiônicas, $[ETBH_2]^{2+}$, dos sais: oxalato de etambutol (azul), maleato de etambutol (vermelho) e tereftalato de etambutol (roxo). A sobreposição foi feita através do fragmento N1–C5–C6–N2 de cada molécula. Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 13 - Ângulos de torção específicos envolvendo as ligações com maiores liberdades conformacionais para a molécula de ETB e para as unidades catiônicas dos sais ETBOXA, ETBMAL e ETBTRF.

Ângulo de torção	ETB	ETBOXA ^{1,2}	ETBMAL	ETBTRF
N1–C2–C1–O1	-61,4(3)	76,0(3)	-61,7(4)	-70,2(4)
N1–C2–C3–C4	-162,1(2)	-163,9(3)	-170,4(5)	-178,0(4)
N2–C8–C7–O2	57,3(3)	76,0(3)	-56,9(6)	-80,1(4)
N2–C8–C9–C10	-167,9(3)	-163,9(3)	-168,4(5)	-170,9(3)

¹N1–C2–C1–O1 = N2–C8–C7–O2 e ²N1–C2–C3–C4 = N2–C8–C9–C10.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Caracterização por DRXP

Os padrões de DRXP dos sais oxalato, maleato e tereftalato de ETB, sintetizados neste trabalho, estão apresentados na Figura 24. Os difratogramas experimentais de cada modificação cristalina foram comparados com os padrões teóricos simulados a partir das respectivas estruturas cristalinas determinadas por DRXM. Uma vez que esses novos sais foram preparados partindo do sal cloridrato de ETB e, posteriormente, da base livre de ETB, picos dessas fases cristalinas poderiam ser observados nos difratogramas experimentais caso esses materiais de partida tivessem cristalizado junto com os sais de ETB. Dessa forma, a

técnica de DRXP foi utilizada não só para confirmar se os monocristais escolhidos para o experimentos de DRXM eram representativos das amostras sintetizadas, como também no sentido de confirmar se houve a formação de uma fase cristalina inesperada durante o processo sintético. Caso isso tivesse ocorrido, essas novas fases poderiam ser facilmente detectadas no difratograma experimental através da identificação dos picos adicionais em 2θ que eventualmente apareceriam.

Figura 24 - Difrátogramas experimentais e calculados dos sais oxalato, maleato e tereftalato de etambutol. Os padrões teóricos de DRXP do sal cloridrato de etambutol e do etambutol (base livre) foram acrescentados para comparação com os demais difratogramas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise de todos os difratogramas experimentais e simulados tiveram uma boa concordância, inexistindo picos em posições 2θ que não foram esperados para as respectivas fases cristalinas. Desta vez, a orientação aleatória dos cristalitos durante o preparo da amostra fez com os efeitos de orientação preferencial fossem minimizados, uma vez que as intensidades observadas e calculadas apresentaram poucas diferenças. Nesse sentido, os resultados de DRXP revelaram que: os monocristais escolhidos para os experimentos de DRXM eram representativos de toda amostra e os novos sais de ETB sintetizados

apresentaram elevada pureza, sem a presença dos materiais de partida ou de qualquer outra impureza cristalina na amostra final.

4.3 Espectros vibracionais no infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada com o intuito de confirmar a formação dos novos sais de ETB.¹¹⁴ É esperado que os espectros infravermelho dos compostos sintetizados apresentem mudanças, isto é, algumas bandas referentes a modos vibracionais específicos devem estar deslocadas nos espectros em virtude da protonação/desprotonação das moléculas e de interações intermoleculares entre o ETB e os coformadores.¹¹³⁻¹¹⁴ Os espectros infravermelho do fármaco ETB na forma de base livre e dos sais de ETB reportados neste trabalho estão apresentados na Figura 25. A atribuição das bandas foi realizada utilizando dados espectroscópicos reportados para ácidos dicarboxílicos bem como de outras formas sólidas encontradas na literatura para o fármaco ETB.^{84,145-146} Além disso, as características supramoleculares observadas durante a análise cristalográfica foi de extrema importância na interpretação dos resultados.

Figura 25 - Espectros na região do infravermelho do fármaco etambutol (ETB) e dos sais: oxalato de etambutol (ETBOXA), maleato de etambutol (ETBMAL) e tereftalato de etambutol (ETBTRF).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a formação dos sais, a banda de absorção referente ao estiramento da ligação C=O do grupo carboxílico (COOH), que geralmente aparece na região de 1700 cm^{-1} , deve desaparecer dando origem a duas novas bandas no espectro infravermelho. Estas duas bandas são relacionadas às vibrações de estiramento antissimétricos em torno de 1550 cm^{-1} e simétricos em 1400 cm^{-1} do grupo carboxilato (COO^-) e podem ser utilizadas como impressões digitais para verificar a desprotonação dos ácidos.¹¹⁴ Consequentemente, isto também afeta os modos de vibração dos grupos NH da amina secundária do ETB. De acordo com dados da literatura, aminas secundárias apresentam apenas um modo de estiramento da ligação de N-H na região de $3300\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, enquanto que para a forma protonada (NH_2^+), podem aparecer mais de uma banda referente a este modo vibracional na região de $3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶

No espectro infravermelho do ETB, a vibração do estiramento da ligação N-H aparece como uma única banda em 3270 cm^{-1} . No entanto, devido à protonação e, consequentemente, a formação da unidade catiônica $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ nas estruturas dos sais, bandas relacionadas aos modos vibracionais de estiramento do grupo NH_2^+ (amina secundária protonada) foram observadas, deslocadas para menores número de onda, nos espectros infravermelho dos sais estando localizadas em: 3000 cm^{-1} no espectro do sal ETBOXA, 3004 cm^{-1} no espectro do sal ETBMAL e em 2977 cm^{-1} no espectro do sal ETBTRF.

Com relação aos ácidos carboxílicos, vale a pena destacar que a desprotonação parcial dos ácidos oxálico e maleico foi confirmada pela presença de duas bandas em 3347 cm^{-1} (ETBOXA) e 3350 cm^{-1} (ETBMAL) referentes ao estiramento da ligação O-H do grupo COOH. Outras duas bandas, referentes ao estiramento da ligação C=O do grupo COOH, foram observadas em 1702 cm^{-1} e 1698 cm^{-1} nos espectros dos sais ETBOXA e ETBMAL, respectivamente. Além disso, em todos os espectros infravermelho dos sais, foi possível notar o aparecimento de novas bandas associadas às vibrações dos ânions carboxilato (COO^-). Essas bandas, referentes aos estiramentos antissimétrico e simétrico do grupo COO^- , estão compreendidas na região de $1582\text{-}1384\text{ cm}^{-1}$ dos espectros. Diante dessas observações, foi possível confirmar que o ácido tereftálico encontra-se totalmente desprotonado e os ácidos oxálico e maleico com apenas um dos grupos COOH desprotonados.

4.4 Análises térmicas: curvas de TG e de CED e microscopia ótica térmica

As análises térmicas do etambutol e de suas respectivas modificações cristalinas descritas neste trabalho foram realizadas visando comparar a estabilidade e, consequentemente, a energia de rede cristalina desses sais em relação ao ETB. As curvas TG e de CED do ETB e dos sais oxalato, maleato e tereftalato de etambutol estão representadas na Figura 26. Todas as curvas de CED mostraram apenas um evento endotérmico muito bem definido que foi atribuído ao processo de fusão das amostras. Como as energias das redes cristalinas estão diretamente relacionadas com as temperaturas de fusão, foi possível considerar quais arranjos cristalinos apresentam maior coesão. Para os sais ETBOXA e ETBTRF, os picos endotérmicos referentes à fusão das amostras apareceram em temperaturas muito próximas, 204,1°C (com $T_{on-set} = 200,04$ °C) para o ETBOXA e 207,43°C (com $T_{on-set} = 206,29$ °C) para o ETBTRF, o que indica estes sais apresentam energia de rede cristalina semelhantes. Os valores encontrados nas curvas de CED estão de acordo com o que foi observado nas curvas TG, uma vez que nenhuma perda de massa foi observada para estes sais no intervalo entre 30 a 215°C. As perdas de massa iniciais observadas nas curvas TG para os sais ETBOXA e ETBTRF ocorreram nas faixas de temperatura de 210-340 °C (~99%) e 220-480 °C (~95%), respectivamente, e foram atribuídas à degradação das amostras. De maneira semelhante, a curva de CED do sal ETBMAL possui um pico endotérmico muito bem definido em 152,24 °C (com $T_{on-set} = 151,08$ °C) que foi atribuído à fusão da amostra. Também foi observado um segundo evento endotérmico na curva CED em ~170°C que foi associado ao início da degradação do sal. Depois de 170 °C, a curva TG mostrou que há uma perda gradual de massa de aproximadamente 80% até 400 °C, onde ocorre a degradação do sal.

Figura 26 - Curvas TG e de CED dos compostos: (a) etambutol (base livre), (b) oxalato de etambutol, (c) maleato de etambutol e (d) tereftalato de etambutol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Visando acompanhar em tempo real as transformações que acontecem nos cristais, foi utilizado um microscópio ótico, contendo uma câmera de vídeo, acoplado a um sistema *Hot-stage*. Embora esses experimentos e as análises por CED e TG tenham sido realizados sob diferentes atmosferas, a interpretação dos resultados observados nas curvas de CED/TG foi confirmada com sucesso pelas imagens de microscopia *Hot-Stage* (Figura 27). Primeiramente, as imagens confirmaram que os cristais dos sais de ETB apresentamos mesmos hábitos cristalinos observados nos experimentos de DRXM. Além disso, os cristais dos sais ETBOXA, ETBMAL e ETBTRF começam a fundir em, aproximadamente, 204°C, 154°C e 200°C, respectivamente, concordando com os picos endotérmicos de fusão observados nas curvas de CED desses sais. Logo após a fusão dos cristais, é possível observar que a amostras sofrem degradação, concordando com os resultados das curvas TG.

Figura 27 - Microscopia ótica e análise térmica por *Hot-Stage* de cristais dos sais: (a) oxalato de etambutol, (b) maleato de etambutol e (c) tereftalato de etambutol.

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir dos resultados das análises térmicas, dois pontos merecem ser destacados: (1) todos os sais de ETB descritos neste trabalho são mais estáveis termicamente do que a forma neutra do fármaco ETB (ponto de fusão de ~ 88 °C e temperatura inicial (*on-set*) de degradação de ~ 165 °C), ou seja, possuem um empacotamento cristalino mais coeso com maior energia de rede e (2) em todos os casos não há evidência de eventos de transição de fase nas amostras nas condições experimentais estudadas. Dessa forma, uma ordem de estabilidade térmica das modificações cristalinas de ETB pode ser determinada. Como os compostos ETBOXA e ETBTRF fundem e degradam em temperaturas muito próximas, pode-se afirmar que estes sais possuem uma estabilidade térmica equivalente. Portanto, considerando os resultados das análises térmicas, a seguinte ordem de estabilidade foi estabelecida: $\text{ETBTRF} \cong \text{ETBOXA} > \text{ETBMAL} > \text{ETB}$.

4.5 Estudos de estabilidade

As formas sólidas multicomponentes do fármaco etambutol conhecidas até o momento possuem uma característica intrínseca que é a elevada higroscopicidade. Essa indesejável propriedade prejudica a qualidade de formulações farmacêuticas que contém esse IFA, sobretudo os comprimidos conhecidos como 4 em 1 usados no tratamento da tuberculose que se baseiam uso combinado do cloridrato de ETB com outros três fármacos. A isoniazida e a rifampicina, que usadas de maneira combinada com o ETB, são suscetíveis a hidrólise que é desencadeada, na maioria das vezes, devido à presença do ETB, que eleva o teor de água na formulação devido ao seu alto caráter higroscópico. Tudo indica que essa tendência dos sais

de etambutol serem higroscópicos é uma característica topológica das estruturas, uma vez que os arranjos cristalinos permitem que haja uma interação muito pronunciada com moléculas de água, levando na maioria das vezes ao colapso da estrutura. Em consequência disso, quando expostas a ambientes úmidos, as amostras inicialmente sólidas tornam-se semissólidas, podendo até mesmo se tornarem líquidas. O cloridrato de etambutol é um bom exemplo, conforme mostra a Figura 28.

Figura 28 - Transformação de sólido para líquido do cloridrato de etambutol motivado pela elevado caráter higroscópico deste sal.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Diante desta indesejável característica, as modificações cristalinas do etambutol realizadas neste trabalho foram avaliadas quanto à sua natureza higroscópica. Os perfis higroscópicos dos sais de etambutol foram determinados através de análises termogravimétricas. Depois de sintetizados, os sais foram inicialmente secos para garantir que toda água residual da amostra fosse retirada. Uma vez secas, as amostras foram colocadas num dessecador contendo água. A presença de água criou uma atmosfera extremamente úmida (~100% de umidade relativa) dentro dessecador, permitindo uma rápida e eficaz interação das moléculas de água com a amostra. O tempo que cada sal permaneceu no dessecador pode ser relacionado com a rapidez com que cada composto absorveu água, ou seja, quanto mais higroscópico for a amostra, mais rápido ela irá absorver água e, consequentemente, menos tempo ficará no dessecador. Dessa forma, após permanecerem por um tempo determinado dentro do dessecador fechado, as amostras foram submetidas à análise termogravimétrica com o intuito de determinar o conteúdo de água que foi absorvido pela mesma. Essa checagem foi feita através da determinação da perda de massa relativa até 150 °C nas curvas TG.

Como esperado, o sal cloridrato de etambutol confirmou seu alto caráter higroscópico. Depois de uma hora mantido dentro do dessecador com água, a amostra teve uma perda de massa de aproximadamente 25% na curva TG (Figura 30a) referente a saída de moléculas de água previamente absorvidas pela amostra. Além disso, este sal se tornou líquido depois de mantido por mais de oito horas dentro do dessecador (Figura 28). De maneira semelhante com o que foi observado para o cloridrato, os sais de maleato e tereftalato de etambutol também apresentaram perdas significativas de massas em suas respectivas curvas TG, nos diferentes tempos nos quais esses sais foram mantidos dentro do dessecador. As perdas de massa desses dois sais variaram de 2,61% a 21,97%, conforme mostrado nas Figuras 30a-c. Entretanto, o sal oxalato de etambutol mostrou que, nas condições experimentais estabelecidas, o composto não apresenta caráter higroscópico, mesmo depois de mantido por 48 horas de dentro do dessecador com água (Figura 29). As curvas TG desse sal (Figuras 30a-c) não apresentaram perdas de massa significativa (sempre menor que 1%) no intervalo de temperatura analisado.

Figura 29 - Demonstração da natureza não higroscópica do sal oxalato de etambutol. É possível perceber que a amostra permanece sólida mesmo depois de mantida por 48 horas dentro do dessecador com água.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30 - Curvas TG dos sais de etambutol mostrando as perdas de massa relativa após uma hora (a), seis horas (b) e doze horas (c) em atmosfera úmida (~100% de umidade relativa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados encontrados para o sal oxalato de etambutol, no que se refere à higroscopicidade deste composto, sugerem que o empacotamento cristalino desse sal é tão coeso que dificulta a penetração de moléculas de água na estrutura. Por outro lado, no cloridrato de etambutol, moléculas de água conseguem adentrar mais facilmente no arranjo cristalino, levando rapidamente ao colapso da estrutura. Dessa forma, o empacotamento cristalino do cloridrato de etambutol pode ser considerado menos coeso em comparação com o do oxalato. De fato, essa constatação é corroborada pelos valores de densidade dos cristais, onde a densidade do sal de oxalato ($1,352 \text{ g/cm}^3$) é consideravelmente maior que a densidade do sal de cloridrato ($1,224 \text{ g/cm}^3$). A Figura 31 mostra os empacotamentos cristalinos destes dois sais nos planos *ab* e *ac*. É possível perceber que o arranjo cristalino das moléculas na estrutura do oxalato de etambutol é muito mais denso do que o observado para o sal de cloridrato de etambutol.

Figura 31 - Representação do empacotamento cristalino do sal cloridrato de etambutol nos planos *ab* (a) e *ac* (b). As letras (c) e (d) mostram o empacotamento cristalino do sal oxalato de etambutol nos planos *ab* e *ac*.

Fonte: Elaborado pelo autor

5 ISONIAZIDA

Este capítulo é dedicado a apresentação dos resultados de quatro modificações cristalinas do fármaco tuberculostático INH. Trata-se de quatro novos cocristais farmacêuticos que foram sintetizados, utilizando a abordagem da engenharia de cristais, a partir de reações estequiométricas da INH com os ácidos carboxílicos: *p*-nitrobenzóico (PNBA), *p*-cianobenzóico (PCNBA) e *p*-aminobenzóico (PABA). O planejamento dessas sínteses foi baseado nas características supramoleculares da INH, que possui três grupos funcionais importantes na sua estrutura: a hidrazina, a amida e o anel piridínico. Tais grupos são excelentes aceitadores quando estão envolvidos em ligações de hidrogênio. Em estruturas com ácidos carboxílicos, esses grupos geralmente formam heterosíntons bastante estáveis com os grupos COOH. A hidrazina da INH também pode atuar tanto como aceitador quanto como doador em ligações de hidrogênio, permitindo a formação de homosíntons envolvendo os nitrogênios da hidrazina. Diante dessas interessantes e promissoras características supramoleculares da INH, novas modificações cristalinas foram realizadas, a partir de reações deste fármaco com ácidos carboxílicos *para* substituídos derivados do ácido benzóico.

Recentemente, uma série de modificações cristalinas da INH foi reportada na literatura, visando não só explorar a diversidade de síntons supramoleculares formados por este IFA com moléculas orgânicas diversas, como também melhorar suas propriedades físico-químicas, sobretudo a estabilidade.^{92-93,95,147} A INH é um fármaco altamente solúvel em água e, isoladamente, apresenta boa estabilidade, mesmo quando exposta a ambientes com elevadas temperaturas e umidade.^{100,104} Entretanto, quando usada de forma combinada com outras drogas tuberculostáticas, a INH torna-se suscetível a reações de hidrólise devido a interações complexas que ocorrem entre ela e outros fármacos.^{100-103,105} Nesse sentido, a cocristalização da INH com moléculas orgânicas farmacêuticamente aceitas (ou reconhecidas como seguras)¹⁰⁷ tem se apresentado como uma eficiente estratégia para melhorar a estabilidade da INH em formulações farmacêuticas. Portanto, as novas modificações cristalinas da INH, reportadas neste trabalho, devem ser encaradas como promissoras, uma vez que podem melhorar estabilidade de produtos farmacêuticos que contenha a INH associada a outros fármacos.

5.1 Análise cristalográfica e interações intermoleculares

As sínteses supramoleculares entre a INH e ácidos carboxílicos derivados do ácido benzóico (substituídos na posição *para*) teve como resultado os seguintes cocristais: (1) cocristal de INH com o ácido *p*-nitrobenzóico na proporção estequiométrica de 1:1 denominado INH-PNBA, (2) cocristal de INH com o ácido *p*-cianobenzóico com estequiometria de 1:1 chamado de INH-PCNBA, (3) polimorfo I (ou forma I) do cocristal de INH como ácido *p*-aminobenzóico na proporção estequiométrica de 1:2 denominado INH-PABA-I e (4) polimorfo II (ou forma II) do cocristal de INH como ácido *p*-aminobenzóico com estequiometria de 1:2 chamado de INH-PABA-II. A escolha desses coformadores foi feita levando em consideração dois critérios: (1) satisfazer a "regra do pKa" para formação de cocristais que estabelece que a diferença entre os valores de pKa da base (neste caso a INH) e do ácido deve ser menor ou igual a 0¹⁸, e (2) reproduzir os sítios supramoleculares $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$ e $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{hidrazina}}$ entre a INH e os coformadores.

Além da análise dos valores de pKa e dos possíveis sítios supramoleculares a serem gerados, a formação dos cocristais de INH reportados neste trabalho, foi também confirmada medindo a diferença do comprimento das ligações C–O ($\Delta D_{\text{C-O}}$) dos grupos carboxílicos nas moléculas dos ácidos (coformadores). É bem estabelecido que, quando o comprimento dessas ligações são próximos, isto é, a diferença $\Delta D_{\text{C-O}}$ for menor que 0,03 Å, existe um forte indicativo da ocorrência de um fenômeno ressonante devido a perda de um próton. Com isso, o grupo carboxílico torna-se carregado negativamente na forma de um ânion carboxilato, resultando na formação de um sal. Em contrapartida, se a diferença $\Delta D_{\text{C-O}}$ for maior que 0,08 Å, conclui-se que as distâncias C–O no grupo carboxílico não são simétricas, diferindo dos ânions carboxilatos e indicando a formação de cocristais.¹⁸ Os valores de $\Delta D_{\text{C-O}}$ encontrados para os cocristais de INH foram todos maiores que 0,08 Å: INH-PNBA = 0,098(1) Å; INH-PCNBA = 0,108(2) Å; INH-PABA-I = 0,104(5) Å e 0,115(5) Å; INH-PABA-II = 0,110(2) Å e 0,102(2) Å. Com base nessas informações e partir dos dados de DRXM, uma descrição cristalográfica das estruturas e dos empacotamentos cristalinos de cada cocristal será feita a seguir. Primeiro, serão descritas as estruturas dos cocristais INH-PNBA e INH-PCNBA e, posteriormente, os polimorfos I e II do cocristal INH-PABA serão discutidos. Na Tabela 14 estão descritos os dados cristalográficos e os detalhes de cada refinamento dessas novas modificações cristalinas.

Tabela 14 -Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos cocristais de INH.

Identificação do cristal	INH-PNBA	INH-PCNBA	INH-PABA-I	INH-PABA-II
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₅	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₃	C ₂₀ H ₂₁ N ₅ O ₅	C ₂₀ H ₂₁ N ₅ O ₅
Peso molecular	304,27	284,28	411,42	411,42
Temperature (K)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	P2 ₁	P2 ₁ /c
a (Å)	7,0573(5)	7,0549(5)	12,9772(10)	16,2167(5)
b (Å)	7,1868(6)	7,1844(6)	5,0685(3)	5,08592(11)
c (Å)	14,9643(8)	15,2175(12)	16,0931(11)	25,4781(6)
α (°)	91,375(6)	81,660(6)	90	90
β (°)	98,592(5)	81,845(6)	108,818(8)	107,990(3)
γ (°)	116,362(7)	63,035(8)	90	90
Volume (Å ³)	668,92(9)	677,64(10)	1001,94(12)	1998,62(9)
Z / Z'	2 / 1	2 / 1	2 / 1	4 / 1
ρ_{calc} (g cm ³)	1,511	1,393	1,364	1,367
μ (mm ⁻¹)	0,119	0,102	0,101	0,101
Reflexões coletadas	11408	14281	11619	28914
Reflexões independentes	2922	2982	4042	4726
R ₁ [I $\geq$ 2 σ (I)]	0,0509	0,0452	0,0485	0,0528
wR ₂ [all data]	0,1453	0,1308	0,1247	0,1536
S	1,047	1,081	1,059	1,093

Fonte: Elaborada pelo autor

5.1.1 Cocristais de isoniazida com os ácidos *p*-nitrobenzóico e *p*-cianobenzóico

Os cocristais formados entre a INH e os ácidos *p*-nitrobenzóico (PNBA) e *p*-cianobenzóico (PCNBA) cristalizaram no grupo espacial triclínico centrossimétrico $P\bar{1}$. As unidades assimétricas destes cocristais (Figura 32) são constituídas de uma molécula de INH e uma molécula do ácido carboxílico correspondente, na proporção estequiométrica de 1:1. Conforme esperado, não houve a transferência de prótons dos ácidos carboxílicos para a INH. Os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio desses cocristais podem ser vistos na Tabela 15.

Figura 32 - Unidade assimétrica dos cristais: (a) INH-PNBA e (b) INH-PCNBA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 15 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para os cocristais INH-PNBA e INH-PCNBA.

Interação	$d(D\cdots A)(\text{\AA})$	$d(H\cdots A)(\text{\AA})$	$\angle D-H\cdots A(^{\circ})$	código de simetria
INH-PNBA				
O2–H2 $\cdots$ N2	2,658(2)	1,838(1)	177,13(11)	x,y,z
N3–H3A $\cdots$ O1	3,021(3)	2,476(2)	121,97(10)	x,y,z
N1–H1 $\cdots$ N3	2,911(3)	2,168(2)	144,46(15)	-x+2,-y+1,-z+2
N3–H3B $\cdots$ O5	3,208(3)	2,467(2)	144,66(16)	x+2,+y+1,+z+1
C3–H3 $\cdots$ O3	3,222(2)	2,577(1)	126,83(13)	x,y,z
INH-PCNBA				
O2–H2A $\cdots$ N2	2,658(2)	1,818(1)	174,42(12)	x,y,z
N1–H1 $\cdots$ N3	2,981(2)	2,259(1)	141,47(15)	-x,-y+2,-z+2
N3–H3B $\cdots$ N4	3,270(3)	2,515(2)	135,85(13)	-x+1,-y+2,-z+1
N3–H3A $\cdots$ O1	3,150(2)	2,295(1)	170,81(11)	x,y,z
C10–H10 $\cdots$ N3	3,610(3)	2,718(2)	168,08(13)	x+1,+y,+z-1
C3–H3 $\cdots$ O3	3,319(3)	2,690(2)	125,64(15)	x,y,z
C4–H4 $\cdots$ O1	3,353(3)	2,599(2)	138,49(13)	x+1,+y,+z
C12–H12 $\cdots$ O3	3,236(2)	2,493(2)	137,01(15)	x+1,+y,+z

Fonte: Elaborada pelo autor

O cocrystal INH-PNBA foi formado através das ligações de hidrogênio O2–H2 $\cdots$ N2 (2,658 Å, 177,13°) e C3–H3 $\cdots$ O3 (3,222 Å, 126,83°) envolvendo o grupo carboxílico do ácido PNBA e o anel piridínico da INH. Como resultado dessas interações, o recorrente sinton supramolecular COOH $\cdots$ N_{arom} foi formado. Na estrutura do cocrystal, as moléculas de INH estão dispostas em cadeias ao longo da direção [100]. A formação dessas cadeias de INH se dá por meio das ligações de hidrogênio N1–H1 $\cdots$ N3 (2,911 Å, 144,46°) e N3–H3A $\cdots$ O1 (3,021 Å, 121,97°) que ocorrem entre os hidrazinas e a amida da INH. Em virtude dessas interações, que levam a formação de dois homosíntons de INH, dois padrões de interações tipo anel com códigos $R_2^2(6)$ e $R_2^2(10)$ são gerados (Figura 33c), fazendo com que as moléculas de INH e de PNBA se apresentem de forma alternada no plano *ac*. Além disso, ao

longo da direção [010], as moléculas de PNBA estão conectadas às cadeias de INH através da ligação de hidrogênio N3–H3B...O5 (3,208 Å, 144,66°), formando uma estrutura em camadas (Figura 33b). Conforme esperado para uma estrutura que apresenta camadas, o empacotamento cristalino é também estabilizado por interações do tipo $\pi \cdots \pi$, com uma distância entre os centróides dos anéis das moléculas de INH e do ácido de 3,740(3) Å (Figura 33b). Essas interações permitem o empilhamento das camadas ao longo da direção [010].

Figura 33 - Visão do empacotamento do cocrystal INH-PNBA na unidade assimétrica. (b) A estrutura em camadas do cocrystal é estabilizada por interações $\pi \cdots \pi$ ($\pi \cdots \pi$). (c) Representação dos heterosíntons $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$ (em azul), formados entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e dos homosíntons formados através de interações entre os grupos hidrazinas da INH que geram dois padrões de interações tipo anel com códigos $R_2^2(6)$ e $R_2^2(10)$, que se estendem ao longo da direção [100].

Fonte: Elaborada pelo autor.

De maneira muito similar ao que foi descrito para o INH-PNBA, no cocrystal INH-PCNBA as moléculas de INH e do coformador PCNBA também estão associadas através das ligações de hidrogênio O2–H2...N2 (2,658 Å, 174,42°) e C3–H3...O3 (3,319 Å, 125,64°), o que leva a formação do sinton supramolecular $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$. Essas mesmas moléculas também estão conectadas através da ligação de hidrogênio N3–H3B...N4 (3,270 Å, 135,85°) envolvendo os grupos hidrazina e ciano, fazendo com que a INH e o ácido PCNBA fiquem

dispostos em cadeias ao longo da diagonal da direção ac (Figura 34c). Além disso, ao longo da direção $[100]$, essas cadeias estão paralelamente orientadas entre si, sendo unidas através das ligações de hidrogênio não-clássicas $C12-H12\cdots O3$ (3,236 Å, 137,01°) e $C10-H10\cdots N3$ (3,610 Å, 168,08°). Da mesma forma, ao longo da direção $[010]$, a interação entre as moléculas de INH de cadeias adjacentes leva a formação de dois homosíntons de INH, envolvendo os grupos hidrazina e amida. Esses homosíntons de INH geram dois padrões de interações tipo anel com códigos $R_2^2(6)$ e $R_2^2(10)$ que são estabilizados pelas interações $N1-H1\cdots N3$ (2,981 Å, 141,47°) e $N3-H3A\cdots O1$ (3,150 Å, 170,81°) (Figura 34c). Conforme esperado para um arranjo em camadas (Figura 34b), a estrutura do cocrystal INH-PCNBA é estabilizada por interações do tipo $\pi\cdots\pi$ formadas entre os centros aromáticos das moléculas de INH e do ácido PCNBA. A distância encontrada entre os centróides dos anéis das moléculas foi 3,777(2) Å.

Figura 34 - Empacotamento do cocrystal INH-PCNBA na unidade assimétrica. (b) Visão do arranjo em camadas do cocrystal. (c) Representação dos síntos supramoleculares: $COOH\cdots N_{arom}$ (em azul), formado entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e dos homosíntons formados através de interações entre os grupos hidrazinas da INH que geram dois padrões de interações tipo anel com códigos $R_2^2(6)$ e $R_2^2(10)$. Além disso, interações do tipo $\pi\cdots\pi$ (em verde) são mostradas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.2 Cocristais dos polimorfos de isoniazida com o ácido *p*-aminobenzóico

Os cristais obtidos a partir da reação entre a INH e o coformador ácido *p*-aminobenzóico (PABA) levou a formação de dois cocristais polimórficos (INH-PABA-I e INH-PABA-II). Durante os experimentos de cristalização, foi observado que esses cocristais apareciam no mesmo meio de cristalização quando condições como temperatura e solventes não eram bem ajustadas. O aparecimento simultâneo desses polimorfos por ser explicado por uma ação combinada de fatores cinéticos e termodinâmicos. Dessa forma, foram testadas diferentes temperaturas de cristalização, visando à formação de cristais de apenas uma das formas polimórficas. Assim, cristais da forma I foram obtidos a 25 °C enquanto que cristais da forma II a -5 °C, ambos usando uma mistura de 2:1 de etanol/acetonitrila como solvente, o que permitiu separá-los para que suas estruturas fossem caracterizadas posteriormente. Dessa forma, os cocristais INH-PABA-I e INH-PABA-II podem ser considerados polimorfos concomitantes.

O polimorfo I do cocrystal INH-PABA cristalizou no grupo espacial monoclinico não-centrossimétrico $P2_1$, enquanto que o polimorfo II cristalizou no grupo espacial monoclinico centrossimétrico $P2_1/c$. A unidade assimétrica de ambos os polimorfos (Figura 35) consiste de uma molécula de INH e duas moléculas de ácido *p*-aminobenzóico (nomeadas de PABA-A e PABA-B). Os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio desses cocristais estão descritos na Tabela 16.

Figura 35 - Unidade assimétrica dos cocristais (polimorfos): (a) INH-PABA-I e (b) INH-PABA-II.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 16 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio para os cocristais INH-PABA-I e INH-PABA-II.

Interação	$d(D\cdots A)(\text{\AA})$	$d(H\cdots A)(\text{\AA})$	$\angle D-H\cdots A(^{\circ})$	código de simetria
INH-PABA-I				
O1-H2A...N2	2,731(4)	1,916(3)	171,76(19)	x,y,z
O4-H4C...N3	2,819(4)	2,190(5)	148,96(16)	x,y,z
N1-H1...O1	2,851(3)	2,128(2)	141,49(19)	x,+y-1,+z
N5-H5A...O3	2,992(5)	2,180(3)	155,81(21)	-x+1,+y-1/2,-z+2
N3-H3B...O1	3,218(5)	2,454(4)	143,34(17)	-x+1,+y-1/2,-z+2
N3-H3A...O5	3,091(4)	2,239(3)	169,46(23)	x,+y+1,+z
N4-H4A...N4	3,201(5)	2,396(4)	154,27(26)	-x,+y-1/2,-z
N4-H4B...O5	2,998(5)	2,170(4)	162,12(20)	-x+1,+y+1/2,-z+1
C4-H4...O2	3,365(6)	2,581(3)	142,27(28)	-x+1,+y-1/2,-z+1
C3-H3...O3	3,499(4)	2,624(3)	156,96(24)	x,+y+1,+z
C12-H12...O5	3,358(4)	2,608(3)	138,10(21)	-x+1,+y+1/2,-z+1
C17-H17...O3	3,298(5)	2,560(3)	136,52(20)	-x+1,+y-1/2,-z+2
INH-PABA-II				
O2-H2A...N2	2,729(3)	1,916(2)	171,55(13)	x,y,z
O4-H4A...N3	2,725(3)	2,004(2)	146,48(13)	x,y,z
N1-H1...O1	2,878(2)	2,164(1)	140,12(10)	x,+y-1,+z
N3-H3A...O5	3,030(2)	2,170(2)	173,37(12)	x,+y-1,+z
N5-H5A...N4	3,179(3)	2,366(2)	157,76(13)	x+1,-y+1/2+1,+z-1/2
N4-H4B...N5	3,168(3)	2,348(2)	159,56(13)	x-1,-y+1/2,+z+1/2
N5-H5B...O3	2,954(2)	2,116(2)	159,51(14)	-x+2,-y+1,-z+1
N3-H3B...O1	3,177(2)	2,356(2)	153,46(13)	-x+2,-y+1,-z+1
N4-H4C...O5	2,968(2)	2,105(2)	166,68(12)	-x+1,-y+1,-z+1
C12-H12...O5	3,461(2)	2,738(2)	135,25(12)	-x+1,-y+1,-z+1
C19-H19...O3	3,274(2)	2,562(2)	133,60(12)	-x+2,-y+1,-z+1
C4-H4...O3	3,519(3)	2,633(2)	159,39(14)	x,+y+1,+z

Fonte: Elaborada pelo autor

Em ambas as formas polimórficas, as moléculas de PABA-A estão associadas às moléculas de INH através de ligações de hidrogênio clássicas (O-H...N), levando a formação do heterosínton clássico (COOH...N_{arom}) entre anel piridínico da INH e a carboxila do ácido. De maneira semelhante, as moléculas de PABA-B formam um segundo heterosínton (COOH...N_{hidrazina}) com a INH na estrutura através de ligações de hidrogênio clássicas do tipo O-H...N que envolvem a carboxila do ácido e o átomo de nitrogênio N3 na hidrazina (ver Figuras 36c e 37c). Outro ponto importante que merece destaque é que a sobreposição das moléculas de INH dos dois polimorfos do cocrystal INH-PABA (Figura 38) revelou que não houve mudanças na conformação molecular da INH, permitindo concluir que os cocristais INH-PABA-I e INH-PABA-II são polimorfos orientacionais.

Figura 38 - Sobreposição das conformações moleculares da INH provenientes das duas formas polimórficas do cocrystal INH-PABA. A sobreposição foi feita através do anel piridínico de cada molécula e mostra que não há diferença conformacional entre as moléculas de INH em ambos polimorfos.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise dos empacotamentos cristalinos revelou que os polimorfos do cocrystal INH-PABA apresentam algumas similaridades estruturais. A primeira delas refere-se à dimensão dos eixos cristalográficos *b* e *c* da cela unitária do INH-PABA-I, que são similares à dimensão dos eixos *b* e *a* do INH-PABA-II, respectivamente (Tabela 14). Nota-se ainda que, estruturalmente, em ambos os polimorfos é possível observar a formação de duas cadeias independentes que se estendem infinitamente ao longo da estrutura. A primeira delas é constituída por moléculas de INH que são conectadas entre si através da ligação de hidrogênio N1–H1...O1, levando a formação de um padrão de interações tipo cadeia com código $C_1^1(4)$. Similarmente, nas estruturas dos polimorfos do INH-PABA as moléculas de PABA-A e PABA-B estão ligadas entre si através interações do tipo N–H...O. Todos estes atributos supramoleculares dos cocristais INH-PABA-I e INH-PABA-II estão descritos nas Figuras 36c e 37c, respectivamente.

Figura 36 - Visão parcial do empacotamento do cocrystal INH-PABA-I ao longo dos eixos *a* e *c*. (b) Orientação das moléculas na unidade assimétrica mostrando que o ângulo formado pelos planos das moléculas de PABA-A e PABA-B é de 80,08. (c) Representação dos síntos supramoleculares: COOH...N_{arom} (em azul), formado entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e COOH...N_{hidrazina} (em marrom), formado entre a hidrazina e a carboxila. Além disso, ligações de hidrogênio do tipo N-H...O entre as moléculas de INH e entre as moléculas de PABA levam a formação de cadeias que se estendem infinitamente longo da estrutura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 37 - Visão parcial do empacotamento do cocrystal INH-PABA-II ao longo dos eixos *a* e *c*. (b) Orientação das moléculas na unidade assimétrica mostrando que o ângulo formado pelos planos das moléculas de PABA-A e PABA-B é de $3,12^\circ$. Representação dos heterosínons: $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$ (em azul), formado entre o anel piridínico e o grupo carboxílico, e $\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{hidrazina}}$ (em marrom), formado entre a hidrazina e a carboxila. Cadeias de moléculas de INH e de moléculas de PABA são formadas e estendidas infinitamente ao longo da estrutura através de ligações de hidrogênio do tipo $\text{N-H} \cdots \text{O}$.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O empacotamento cristalino das formas I e II do cocrystal INH-PABA revelou também que as cadeias de moléculas de PABA em ambas as estruturas estão ligadas com as moléculas de INH. Entretanto, a principal diferença entre essas formas polimórficas está relacionada com a orientação das moléculas na estrutura. Uma forma de provar isso seria determinando como as moléculas de INH e de PABA estão orientadas entre si na unidade assimétrica. No cocrystal INH-PABA-I, o ângulo formado entre os planos das moléculas de PABA-A e PABA-B é de $80,08^\circ$ (Figura 36b), enquanto que no cocrystal INH-PABA-II os planos das moléculas A e B formam um ângulo de $3,12^\circ$ (Figura 37b). Além disso, ao longo das cadeias de PABA, os planos de duas moléculas de INH adjacentes formam um ângulo de $73,37^\circ$ entre si no polimorfo I (Figura 39a). Em contrapartida, no polimorfo II os planos de duas moléculas de INH adjacentes são praticamente paralelos entre si. Dessa forma, apesar das similaridades estruturais verificadas nos empacotamentos cristalinos dos polimorfos do cocrystal INH-PABA (ver Figuras 36a e 37a), existe uma clara diferença na orientação das moléculas de

INH e PABA (e dos planos dessas moléculas) na estrutura, confirmando que o polimorfismo entre os cocristais de INH-PABA é do tipo orientacional.

Figura 39 - Representação das cadeias de moléculas de PABA mostrando que: (a) no cocrystal INH-PABA-I (polimorfo I) os planos de duas moléculas de INH adjacentes na estrutura formam um ângulo de $73,37^\circ$ entre si, enquanto que (b) no cocrystal INH-PABA-II (polimorfo II) os planos das moléculas de INH adjacentes na estrutura são praticamente paralelos entre si.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Caracterização por DRXP

Os difratogramas experimentais dos cocristais de isoniazida foram comparados com os padrões de DRX teóricos, simulados a partir das respectivas estruturas cristalinas determinadas por DRXM (Figura 40). Sabendo que os cocristais foram obtidos por meio de reações estequiométricas da INH com ácidos carboxílicos, picos de Bragg de outras fases cristalinas poderiam ser observados nos difratogramas experimentais dos cocristais. Isso teria acontecido caso houvesse uma cristalização concomitante da INH e/ou dos coformadores durante a formação dos cocristais, por exemplo. Entretanto, em todos os difratogramas experimentais, foi observado a formação de uma única fase cristalina, pois não foram

verificados a presença de picos adicionais em 2θ que pudessem ser atribuídos a presença de uma nova fase na amostra. Dessa maneira, devido a boa concordância encontrada entre os padrões de DRX experimentais e simulados dos cocristais de INH, é possível afirmar que: os monocristais escolhidos para o experimentos de DRXM eram representativos das amostras sintetizadas e não foram verificados a presença dos reagentes de partida ou de qualquer outra impureza cristalina na amostra final, confirmando a elevada pureza dos cristais formados.

Figura 40 - Difratogramas experimentais e calculados dos cocristais de INH.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise por DRXP das formas I e II dos cocristais de INH-PABA permitiu a diferenciação clara e inequívoca desses dois polimorfos. Conforme mencionado anteriormente (seção 5.1.2), o aparecimento de cristais de ambos polimorfos ocorre, na maioria das vezes, de maneira concomitante no mesmo meio de cristalização, sendo necessário que esta etapa seja feita em temperaturas diferentes (25 °C e -5 °C) para que apenas uma forma polimórfica seja obtida. Assim, analisando os difratogramas experimentais dos polimorfos do cocrystal INH-PABA é possível concluir que a cristalização das formas I e II, em diferentes temperaturas, foi eficiente, pois não foram verificados a presença de picos de Bragg do polimorfo II no difratograma do polimorfo I e vice-versa.

5.3 Espectros vibracionais no infravermelho

A espectroscopia vibracional no infravermelho foi mais uma das técnicas utilizadas para caracterizar as novas modificações cristalinas da isoniazida. Com a formação dos cocristais, espera-se observar nos espectros infravermelho bandas referentes aos modos vibracionais da INH e dos ácidos carboxílicos. Além disso, algumas dessas bandas podem estar deslocadas nos espectros em virtude de interações intermoleculares e formação de síntons entre a INH e os coformadores.¹¹⁴ Para critérios de comparação, o espectro da INH também foi analisado, sendo representado junto com os espectros dos cocristais na Figura 41. A atribuição das bandas (Tabela 17) nos espectros foi realizada com base na descrição cristalográfica das estruturas dos cocristais e a partir de dados espectroscópicos reportados para outras formas sólidas da INH e ácidos carboxílicos.^{92-94,147}

Figura 41 - Espectros na região do infravermelho do fármaco INH (preto) e dos cocristais: INH-PNBA (verde), INH-PCNBA (roxo), INH-PABA-I (azul) e INH-PABA-II (vermelho).
Fonte: Elaborada pelo autor.

A molécula de INH apresenta grupos funcionais importantes, dentre eles, a hidrazina, a amida e o anel piridínico. Os modos vibracionais destes grupos são facilmente identificados no espectro infravermelho da INH. Duas bandas em 3303 cm^{-1} e 3212 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação N–H da amina primária e uma banda em 3110 cm^{-1} atribuída

ao estiramento da ligação N–H da amina secundária da hidrazina aparecem no espectro. Além disso, mais duas bandas características da INH podem ser observadas, uma em 1662 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O da amida e outra em 1332 cm^{-1} referente ao estiramento C–N do anel piridínico. Todas essas frequências de vibração aparecem deslocadas nos espectros infravermelho dos cocristais, confirmando de fato que essas novas modificações cristalinas foram formadas.

De acordo com a literatura, aminas primárias apresentam duas bandas associadas aos estiramentos da ligação N–H e aparecem na região de $3400\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, enquanto que para aminas secundárias apenas uma banda referente a este mesmo estiramento é observada na região de $3200\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶ Como esperado, essas bandas apareceram no espectro infravermelho da INH. Entretanto, devido à formação de novas entidades supramoleculares que surgiram por meio de ligações de hidrogênio envolvendo o grupo hidrazina da INH e os grupos funcionais dos coformadores, as bandas relacionadas aos estiramentos N–H foram observadas deslocadas para menores números de onda nos espectros dos cocristais (Tabela 17).

Os ácidos carboxílicos, usados como coformadores, normalmente apresentam duas bandas de absorção características no infravermelho que estão relacionadas com o grupo COOH. A primeira delas aparece na região de $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ e esta relacionada ao estiramento da ligação O–H, e a segunda aparece na região de $1750\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ e refere-se ao estiramento da ligação C=O. Essas bandas foram observadas nos espectros de todos os cocristais estando em: 3330 cm^{-1} e 1712 cm^{-1} (INH-PNBA), 3340 cm^{-1} e 1710 cm^{-1} (INH-PCNBA), 3460 cm^{-1} e 1663 cm^{-1} (INH-PABA-I) e 3459 cm^{-1} e 1662 cm^{-1} (INH-PABA-II).

Em relação ao anel piridínico, uma banda de absorção aparece em 1332 cm^{-1} no espectro infravermelho da INH, sendo atribuída ao estiramento da ligação C–N. Nos espectros dos cocristais, as bandas referentes a este modo vibracional aparecem deslocadas (de 8 a 28 cm^{-1}) para menores números de onda, devido à formação de ligações de hidrogênio entre o grupo COOH dos coformadores e o anel piridínico da INH. Por fim, foi possível observar nos espectros infravermelho dos cocristais a presença de bandas que foram atribuídas a modos vibracionais dos grupos funcionais nitro, ciano e amina presentes na posição *para* do anel benzênico das moléculas dos coformadores (Tabela 17).

Tabela 17 - Principais atribuições espectroscópicas (em cm^{-1}) para a INH e os cocristais de INH.

INH	INH-PNBA	INH-PCNBA	INH-PABA-I	INH-PABA-II	Atribuições
-	3330	3340	3460	3459	$\nu(\text{O-H})_{\text{carboxíla}}$
3303 3212	3230, 3148	3277, 3115	3229, 3106	3298, 3208	$\nu(\text{N-H } 1^{\circ})_{\text{hidrazina}}$
3110	3054	3065	3051	3050	$\nu(\text{N-H } 2^{\circ})_{\text{hidrazina}}$
-	-	-	3362, 3300	3380, 3232	$\nu(\text{N-H } 1^{\circ})_{\text{amina}}$
-	-	2228	-	-	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})_{\text{ciano}}$
-	1712	1710	1663	1662	$\nu(\text{C=O})_{\text{carboxila}}$
1662	1677	1670	1634	1335	$\nu(\text{C=O})_{\text{amida}}$
-	1520	-	-	-	$\nu_{\text{a}}(\text{N-O})_{\text{nitro}}$
-	1346	-	-	-	$\nu_{\text{s}}(\text{N-O})_{\text{nitro}}$
1332	1308	1324	1321	1310	$\nu(\text{C-N})_{\text{piridina}}$

ν = estiramento da ligação, a = modo antissimétrico, s = modo simétrico

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Análises térmicas: curvas de TG e de CED e microscopia ótica térmica

O comportamento térmico das novas modificações cristalinas da INH foi estudado através das seguintes técnicas de caracterização térmica: termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (CED) e microscopia ótica térmica com sistema *Hot-stage*. O uso combinado dessas técnicas permitiu comparar a estabilidade térmica dos cocristais, não só entre eles como também a estabilidade dessas novas formas sólidas em relação a INH. Para fins de comparação, as curvas TG e CED da INH foram incluídas na discussão (Figura 42). A curva CED da INH é caracterizada por apenas um pico endotérmico em 171°C ($T_{\text{on-set}} = 169,96^{\circ}\text{C}$) atribuído ao processo de fusão. Na curva TG, observa-se que a degradação ocorre em uma única etapa com início de perda de massa em 175°C e término em 380°C . Por fim, mediante a análise do perfil térmico dos polimorfos INH-PABA-I e INH-PABA-II, foi possível estabelecer se essas formas polimórficas são monotropicamente ou enantiotropicamente relacionadas. As curvas TG e CED dos quatro cocristais de INH estão representadas na Figura 43.

Figura 42 - Curvas TG e de CED da Isoniazida (INH).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 43 - Curvas TG e de CED dos cocrystalis: (a) INH-PNBA, (b) INH-PCNBA, (c) INH-PABA-I (polimorfo I) e (d) INH-PABA-II (polimorfo II).

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível observar em todas as curvas CED dos cocristais a presença de um único evento endotérmico muito bem definido que foi atribuído ora à fusão e ora à degradação das amostras. Os eventos endotérmicos verificados nas curvas CED dos cocristais INH-PNBA e INH-PCNBA que aparecem em 181,71°C ($T_{on-set} = 179,53$ °C) e 172,75°C ($T_{on-set} = 169,36$ °C), respectivamente, foram atribuídos à degradação térmica das amostras. Esses valores concordam com o que foi observado nas curvas TG desses dois cocristais. A curva TG do INH-PNBA mostra que a perda de massa do cocrystal (~96%) começa em 165 °C e segue de maneira gradual até aproximadamente 350 °C. De maneira semelhante, a curva TG do cocrystal INH-PCNBA apresenta uma perda de massa de aproximadamente 80%, que tem início em 160 °C e término em 400 °C. Dessa forma, para ambos cocristais, os eventos endotérmicos observados nas curvas CED são acompanhados por perdas de massa nas curvas TG, indicando que essas amostras sofrem apenas degradação.

Todavia, para os cocristais de INH-PABA (polimorfos), foi possível observar a fusão das amostras. A curva CED do polimorfo I do INH-PABA possui um pico endotérmico em 163,57 °C ($T_{on-set} = 152,59$ °C) relacionado ao processo de fusão deste polimorfo. Este evento térmico de fusão é seguido de um evento de degradação térmica, uma vez que foi verificado na curva TG do polimorfo I uma perda de massa inicial em 170°C, que se estendeu até ~400 °C com a liberação de cerca de 90% do conteúdo inicial. Em comparação com todas as formas sólidas de INH descritas neste trabalho, a forma II do cocrystal INH-PABA foi a que apresentou menor estabilidade térmica. A curva CED deste polimorfo possui um pico endotérmico em 134,42 °C ($T_{on-set} = 130,53$ °C) que foi atribuído ao processo de fusão da amostra. De acordo com a curva TG, uma perda de massa de ~98% foi observada, tendo início em 150 °C e término em 400 °C, concordando com o resultado demonstrado na curva CED deste polimorfo.

A microscopia ótica térmica (*Hot-stage*) também foi utilizada visando confirmar os eventos observados nas curvas TG e CED. Os resultados de ambas as análises térmicas tiveram uma boa concordância, mesmo sendo realizados em atmosferas diferentes. A partir das imagens de microscopia *Hot-stage* (Figura 44), foi possível confirmar que os cocristais de INH-PNBA e INH-PCNBA sofrem degradação térmica ao invés de fusão. As imagens dessas duas modificações cristalinas (Figuras 44a e 44b) mostram que os cristais começam a se tornar escuros e a perder massa em torno de 175 °C e 165 °C, respectivamente, concordando os eventos mostrados nas curvas CED e TG desses cocristais. Além disso, as imagens de microscopia *Hot-stage* também mostram a fusão das formas polimórficas I e II do cocrystal INH-PABA (Figuras 44c e 44d), que ocorrem em 164 °C para a forma I e em 136 °C para a

forma II, corroborando os valores dos picos endotérmicos observados nas curvas CED desses cocristais. Vale destacar, que não houve evidências de quaisquer fenômenos de transição de fase nas amostras durante as análises térmicas, uma vez que não houve o aparecimento de picos adicionais nas curvas CED.

Figura 44 - Microscopia ótica e análise térmica por *Hot-Stage* dos cocristais: (a) INH-PNBA, (b) INH-PCNBA, (c) INH-PABA-I (polimorfo I) e (d) INH-PABA-II (polimorfo II).
Fonte: Elaborada pelo autor.

A estabilidade térmica de uma amostra cristalina pode ser entendida em termos da ruptura da estrutura quando esta é exposta a um processo de aquecimento (como acontece nos experimentos de TG e CED).¹⁴⁸ Dentro dessa perspectiva e diante dos resultados das análises térmicas da INH e de seus cocristais, a seguinte ordem de estabilidade térmica foi estabelecida: INH > INH-PABA-I > INH-PNBA > INH-PCNBA > INH-PABA-II. A degradação dos cocristais INH-PNBA e INH-PCNBA são eventos que promoveram a ruptura da estrutura cristalina e ocorreram em temperaturas mais baixas quando comparadas com a do INH-PABA-I. Considerando ainda o comportamento térmico dos polimorfos do cocrystal INH-PABA, foi possível observar que: (1) o cocrystal INH-PABA-I apresenta um ponto de fusão e uma temperatura inicial de degradação maior que o INH-PABA-II, indicando que a forma I é mais estável que a forma II; (2) não houve transição de fase para ambos os polimorfos no intervalo de temperatura de 25 °C até as respectivas temperaturas de fusão, (3) o cocrystal INH-PABA-II possui uma menor entalpia de fusão ($77,66 \text{ J. g}^{-1}$) e um menor ponto de fusão ($134,42 \text{ °C}$) em comparação com INH-PABA-I (que possui uma entalpia de fusão de $145,31 \text{ J. g}^{-1}$ e um ponto de fusão de $163,57 \text{ °C}$), indicando que as formas polimórficas I e II do cocrystal INH-PABA são monotropicamente relacionadas.³⁷⁻¹¹⁸

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Como resultados deste trabalho, oito novas modificações cristalinas de fármacos com ação antituberculose foram preparadas e tiveram suas estruturas determinadas, alcançando com sucesso o principal objetivo proposto neste trabalho. O planejamento das novas modificações cristalinas foi realizado usando como referência o pKa dos fármacos ETH, ETB e INH na forma de base livre e por meio de informações acerca dos sítios supramoleculares preferenciais formados pelos grupos funcionais destes IFA's. Com isso, planos de sínteses e protocolos de cristalização foram elaborados, permitindo a obtenção das novas formas sólidas. Dessa maneira, uma forma salina da etionamida (ETHNO₃), três sais de ETB (ETBOXA, ETBMAL e ETBTRF) e quatro cocristais de INH (INH-PNBA, INH-PCNBA, INH-PABA forma I e INH-PABA forma II) foram obtidos no total. Uma vez obtidos, os inéditos compostos foram caracterizados no estado sólido através das técnicas de DRXM, DRXP, análises térmicas (CED, TG, termomicroscopia) e espectroscopia vibracional (IV e Raman).

Estruturalmente, o sal nitrato de etionamida revelou atributos estruturais interessantes que contribuíram para explicar a elevada solubilidade deste sal. O principal deles se deve a presença de quatro unidades catiônicas (ETH⁺) e quatro ânions nitrato na unidade assimétrica, o que levou a formação de quatro independentes pares iônicos na estrutura. Esse foi o primeiro relato de uma estrutura com mais de uma molécula de etionamida na unidade assimétrica ($Z' > 1$). Conforme esperado e verificado em outros sais de etionamida já reportados, cada par iônico formado é estabilizado por uma ligação de hidrogênio assistida por carga do tipo $N^+-H\cdots O^-$, envolvendo o nitrogênio protonado do anel piridínico do cátion ETH⁺ e o oxigênio do ânion NO₃⁻. Em consequência dessas interações, o recorrente sítio supramolecular piridinium⁺...ânion é formado. Além dos resultados de DRXM, a protonação das moléculas de ETH também foi confirmada através dos espectros IV e Raman do sal, nos quais foram observados um deslocamento para menores números de onda da banda referente ao estiramento da ligação C–N do anel piridínico. As análises térmicas do sal ETHNO₃ mostraram que o composto funde numa temperatura inicial de 145,7 °C, aproximadamente 15 °C abaixo da temperatura de fusão da ETH ($T_{on-set} = 160,2$ °C). Tal evidência é explicada pelas múltiplas conformações moleculares adotadas pelos cátions ETH⁺ na estrutura, o que torna o empacotamento do composto menos eficiente e mais instável em termos energéticos, influenciando diretamente na temperatura de fusão. Em relação a solubilidade no equilíbrio, determinada em três diferentes meios de dissolução (água purificada e soluções tampão de pH 4,0 e 7,0), o sal nitrato de etioanmida é consideravelmente mais solúvel (cerca de 204 a 323

vezes) do que a ETH na forma neutra, tornando esta forma sólida um excelente candidato para novas formulações farmacêuticas contendo a ETH.

Os novos sais de etamtubol (oxalato, maleato e tereftalato), foram desenhados a partir de reações da base livre do ETB com ácidos dicarboxílicos. A preparação destas modificações cristalinas teve como principal motivação reduzir a influência da elevada higroscopicidade do ETB, já que esta indesejável característica é prejudicial para formulações farmacêuticas. A análise das estruturas e dos empacotamentos cristalinos revelaram que, em todos os sais, os dois nitrogênios das aminas secundárias do ETB estão protonados e os pares iônicos formados são estabilizados pelo sinton supramolecular $\text{NH}^+ \cdots \text{COO}^-$. Além disso, o caráter iônico dos novos compostos foi confirmado pelo aparecimento de bandas na região de 3000 cm^{-1} dos espectros IV, que foram atribuídas aos modos vibracionais das aminas secundárias protonadas (NH_2^+) do cátion $[\text{ETBH}_2]^{2+}$. O comportamento térmico dos novos sais de ETB mostrou que a fusão das amostras ocorre entre 152°C e 207°C , sendo todas essas temperaturas bem acima do ponto de fusão da forma neutra do ETB ($\sim 88^\circ\text{C}$). Além disso, a avaliação da natureza higroscópica dos compostos em questão indicou que todas as formas salinas do ETB, com exceção do oxalato, comprovaram ser higroscópicas nas condições experimentais estabelecidas. A razão para isso está, provavelmente, relacionada com as diferenças encontradas nos arranjos supramoleculares das formas sólidas. O arranjo cristalino do sal ETBOXA, por exemplo, é formado por cadeias de ânions oxalato parcialmente desprotonados ($\text{OXAH}^- \cdots \text{OXAH}^-$) que se conectam através de fortes ligações de hidrogênio do tipo $\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}^-$, levando a formação de um compacto e coesivo empacotamento cristalino que também é estabilizado por outras interações clássicas do tipo $\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}$ e $\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}$. Esses atributos estruturais fornecem fortes indícios que poderiam explicar a natureza não-higroscópica do sal ETBOXA.

Os cocristais de isoniazida, denominados INH-PNBA, INH-PCNBA e INH-PABA (formas I e II), foram racionalmente planejados e obtidos através de reações com ácidos carboxílicos aromáticos com o intuito de explorar a grande diversidade de síntons supramoleculares que podem ser gerados pelos grupos funcionais da INH com grupos COOH de moléculas orgânicas. A análise das estruturas dos compostos INH-PNBA e INH-PCNBA revelou que o empacotamento cristalino desses cocristais são formados e estabilizados através de interações intermoleculares que ocorrem entre o anel piridínico da INH e carboxila do ácido, o que resulta na formação de síntons supramoleculares ácido $\cdots$ piridina ($\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{piridina}}$). Além disso, o arranjo cristalino desses cocristais é também sustentado por interações do tipo $\pi \cdots \pi$, que ocorre entre os centróides dos anéis e permite o empilhamento de

camadas na estrutura. Por outro lado, nos cocristais polimórficos INH-PABA (formas I e II) há o envolvimento de dois sítios supramoleculares na formação e estabilização da estrutura: ácido...piridina ($\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{piridina}}$) e ácido...hidrazina ($\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{hidrazina}}$). A diferente orientação dos planos da INH e dos ácidos na estrutura associado com o fato de que não houve mudanças nas conformações das moléculas, permite concluir que as formas I e II do cocrystal INH-PABA são polimorfos orientacionais. Além das análises de DRXM, os espectros IV dos novos compostos confirmaram a formação dos cocristais. Os resultados das análises térmicas mostraram que os cocristais INH-PNBA e INH-PCNBA sofrem degradação térmica, enquanto que os ambos os polimorfos do cocrystal INH-PABA fundem. De acordo com a entalpia de fusão dos polimorfos, é possível estabelecer que há uma relação monotrópica entre eles, já que não foram verificados eventos de transição de fase e a forma II possui uma temperatura e uma entalpia de fusão menor que a forma I. Em relação a estabilidade térmica dos cocristais, a seguinte ordem foi estabelecida: $\text{INH-PABA-I} > \text{INH-PNBA} > \text{INH-PCNBA} > \text{INH-PABA-II}$.

Portanto, a contribuição maior deste trabalho foi o desenvolvimento de novas formas sólidas de fármacos tuberculostáticos com propriedades físico-químicas e/ou farmacocinéticas melhoradas, partindo dos conceitos e estratégias da engenharia de cristais. O sal nitrato de etionamida, por exemplo, apresenta uma solubilidade aquosa muito maior que a da forma neutra da ETH, chegando a ser ~300 vezes mais solúvel. Com isso, espera-se que a dissolução e a biodisponibilidade sejam também aumentadas, de modo que a eficácia farmacológica possa ser alcançada com doses terapêuticas menores. Com uma possível redução do princípio ativo no comprimido, as reações de efeitos adversos e os custos de produção poderiam ser diminuídos, o que permitiria levar medicamentos mais seguros e baratos para a população. Outro relato interessante descrito neste trabalho refere-se ao sal oxalato de etambutol que mostrou ser não-higroscópico perante as análises termogravimétricas. Esse notório comportamento é encarado com otimismo, pois caso essa nova modificação cristalina fosse inserida, no lugar do cloridrato de etambutol, por exemplo, nas formulações farmacêuticas que se baseiam no uso combinado de outros fármacos anti-tuberculose, as reações de degradação desencadeadas pela elevada higroscopicidade da forma cloridrato seriam possivelmente eliminadas, melhorando a estabilidade e a qualidade dos produtos farmacêuticos acabados. Em relação aos cocristais de INH, espera-se que essas novas modificações cristalinas apresentem uma melhora na estabilidade da INH, sobretudo em formulações farmacêuticas em que a INH encontra-se presente de maneira combinada com

outros fármacos, uma vez que a INH torna-se susceptível a sofrer reações de degradação nessas condições.

Como perspectivas, pretende-se dar continuidade aos estudos iniciados neste trabalho buscando novas formas sólidas farmacêuticas não só dos fármacos ETH, ETB e INH, objeto de estudo neste trabalho, como também de outros IFA's usados na farmacoterapia da tuberculose. Espera-se ainda realizar os testes de dissolução destas novas formas sólidas e, se possível determinar a biodisponibilidade e a bioequivalência das mesmas, de modo que as novas modificações cristalinas possam, de fato, ser encaradas como potenciais novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- 1 AUGSBURGER, L. L.; HOAG, S. W. **Pharmaceutical dosage forms-tablets**. New York: CRC Press, 2016.
- 2 WOUTERS, J.; QUERE, L.; THURSTON, D. E. **Pharmaceutical salts and cocrystals**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011.
- 3 BYRN, S.; ZOGRAFI, G.; CHEN, X. **Solid-state properties of pharmaceutical materials**. New York: John Wiley & Sons, 2017.
- 4 MANSOUR, H. M.; SOHN, M.; AL-GHANANEEM, A.; DELUCA, P. P. Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3298-3322, 2010.
- 5 SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 603-616, 2007.
- 6 DUGGIRALA, N. K.; PERRY, M. L.; ALMARSSON, O.; ZAWOROTKO, M. J. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. **Chemical Communications**, v. 52, n. 4, p. 640-655, 2016.
- 7 KAWAKAMI, K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 480-495, 2012.
- 8 AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.
- 9 HILFIKER, R. **Polymorphism: in the pharmaceutical industry**. New York: Wiley, 2006.
- 10 GROTHE, E. et al. Solvates, salts, and cocrystals: a proposal for a feasible classification system. **Crystal Growth & Design**, v. 16, p. 3237-3243, 2016. doi:10.1021/acs.cgd.6b00200.
- 11 PETIT, S.; COQUEREL, G. The amorphous state. In: HILFIKER, Rolf (Ed.) **Polymorphism: in the pharmaceutical industry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2006. p. 259-285.
- 12 BABU, N. J.; NANGIA, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 7, p. 2662-2679, 2011.
- 13 GRIESSER, U. J. The importance of solvates. In: HILFIKER, R. (Ed.). **Polymorphism**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 211-233.
- 14 FETH, M. P. et al. Challenges in the development of hydrate phases as active pharmaceutical ingredients – an example. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 116-129, 2011.

- 15 STAHL, P. H.; WERMUTH, C. G. **Handbook of pharmaceutical salts properties, selection and use**. 2nd ed. New York: Wiley, 2008.
- 16 DAVIES, G. Changing the salt, changing the drug. **Pharmaceutical Journal**, v. 266, n. 7138, p. 322-323, 2001.
- 17 BIGHLEY, L.; BERGE, S.; MONKHOUSE, D. Preservation of pharmaceutical products to salt forms of drugs and absorption. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. New York: Marcel Dekker, 1996. v. 13, p. 453-499.
- 18 CHILDS, S. L.; STAHLY, G. P.; PARK, A. The salt-cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 323-338, 2007.
- 19 CHENEY, M. L. et al. Effects of crystal form on solubility and pharmacokinetics: a crystal engineering case study of lamotrigine. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 394-405, 2009.
- 20 BERGE, S. M.; BIGHLEY, L. D.; MONKHOUSE, D. C. Pharmaceutical salts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 1, p. 1-19, 1977.
- 21 ELDER, D. P.; HOLM, R.; DIEGO, H. L. D. Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 88-100, 2013.
- 22 TONG, W.-Q. T.; WHITESELL, G. In situ salt screening-a useful technique for discovery support and preformulation studies. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 3, n. 2, p. 215-223, 1998.
- 23 DINIZ, L. F.; CARVALHO JR, P. S.; DE MELO, C.; ELLENA, J. Reducing the hygroscopicity of the anti-tuberculosis drug (S, S)-ethambutol using multicomponent crystal forms. **Crystal Growth & Design**, v. 17, n. 5, p. 2622-2630, 2017.
- 24 STAHLY, G. P. Diversity in single- and multiple-component crystals. the search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 6, p. 1007-1026, 2007.
- 25 VISHWESHWAR, P. et al. Crystal engineering of pharmaceutical co-crystals from polymorphic active pharmaceutical ingredients. **Chemical Communications**, n.36, p. 4601-4603, 2005. doi: 10.1039/b501304f.
- 26 ALMARSSON, Ö.; PETERSON, M. L.; ZAWOROTKO, M. The A to Z of pharmaceutical cocrystals: a decade of fast-moving new science and patents. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 1, n. 3, p. 313-327, 2012.
- 27 RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Cocrystals: molecular design of pharmaceutical materials. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 299-300, 2007.
- 28 TRASK, A. V. An overview of pharmaceutical cocrystals as intellectual property†. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 301-309, 2007.

- 29 GELLIE, B.; JOHNSON, C.; WEISBROD, T. Patenting of inventions relating to polymorphs. In: STOREY, R. A.; YMÉN, I. (Ed.). **Solid state characterization of pharmaceuticals**. New York: John Wiley & Sons, 2011. p. 451-471.
- 30 BRITTAİN, H. G. Cocrystal systems of pharmaceutical interest: 2010. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 2, p. 1046-1054, 2012.
- 31 FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Benefits of cocrystallisation in pharmaceutical materials science: an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1547-1559, 2010.
- 32 SUN, C. C.; HOU, H. Improving mechanical properties of caffeine and methyl gallate crystals by cocrystallization. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 5, p. 1575-1579, 2008.
- 33 TRASK, A. V.; MOTHERWELL, W. D. S.; JONES, W. Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 320, n. 1-2, p. 114-123, 2006.
- 34 CHOW, S. F. et al. Simultaneously improving the mechanical properties, dissolution performance, and hygroscopicity of ibuprofen and flurbiprofen by cocrystallization with nicotinamide. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 7, p. 1854-1865, 2012.
- 35 JUNG, M. S. et al. Bioavailability of indomethacin-saccharin cocrystals. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1560-1568, 2010.
- 36 VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAİN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.
- 37 BRITTAİN, H. G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. 3rd ed. New York: CRC Press, 2016.
- 38 DESIRAJU, G. R. Polymorphism: the same and not quite the same. **Crystal Growth and Design**, v. 8, n. 1, p. 3-5, 2008.
- 39 BRITTAİN, H. G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. 2nd ed. New York: CRC Press, 2009.
- 40 HILFIKER, R.; BLATTER, F.; RAUMER, M. V. Relevance of solid-state properties for pharmaceutical products. In: HILFIKER, R. (Ed.). **Polymorphism: in the pharmaceutical industry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006. p. 1-19.
- 41 CHAWLA, G., BANSAL, K. A. Challenges in polymorphism of pharmaceuticals. **CRIPS**, v. 4, n. 1, p. 9-12, 2004.
- 42 ZERKOWSKI, J. A.; MACDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Polymorphic packing arrangements in a class of engineered organic crystals. **Chemistry of Materials**, v. 9, n. 9, p. 1933-1941, 1997.

- 43 BURLEY, J. C.; DUER, M. J.; STEIN, R. S.; VRCELJ, R. M. Enforcing ostwald's rule of stages: isolation of paracetamol forms III and II. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 271-276, 2007.
- 44 HENG, J. Y.; WILLIAMS, D. R. Wettability of paracetamol polymorphic forms I and II. **Langmuir**, v. 22, n. 16, p. 6905-6909, 2006.
- 45 NANGIA, A. Conformational polymorphism in organic crystals. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 5, p. 595-604, 2008.
- 46 BABU, N. J.; CHERUKUVADA, S.; THAKURIA, R.; NANGIA, A. Conformational and synthon polymorphism in furosemide (Lasix). **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 4, p. 1979-1989, 2010.
- 47 MARTINS, F. T. et al. Conformational polymorphism in racemic crystals of the diuretic drug chlortalidone. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 7, p. 3235-3244, 2009.
- 48 BAUER, J. et al. Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 859-866, 2001.
- 49 CRUZ-CABEZA, A. J.; BERNSTEIN, J. Conformational polymorphism. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 4, p. 2170-2191, 2014.
- 50 CRUZ-CABEZA, A. J.; REUTZEL-EDENS, S. M.; BERNSTEIN, J. Facts and fictions about polymorphism. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 23, p. 8619-8635, 2015.
- 51 ALMARSSON, Ö. Z.; ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? **Chemical Communication**, n.17, p. 1889-1896, 2004.doi: 10.1039/B402150A.
- 52 HICKEY, M. B.; ALMARSSON, Ö.; PETERSON, M. L. Crystal engineering and crystallography in the pharmaceutical industry. **CrystEngComm**, v. 14, n. 7, p. 2349-2349, 2012.
- 53 CHOW, K.; TONG, H. H.; LUM, S.; CHOW, A. H. Engineering of pharmaceutical materials: an industrial perspective. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2855-2877, 2008.
- 54 HOLLINGSWORTH, M. D. Crystal engineering: from structure to function. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2410-2413, 2002.
- 55 RANTANEN, J.; KHINAST, J. The future of pharmaceutical manufacturing sciences. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3612-3638, 2015.
- 56 DESIRAJU, G. R. Crystal engineering: from molecule to crystal. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 27, p. 9952-9967, 2013.
- 57 DESIRAJU, G. R. Supramolecular synthons in crystal engineering - a new organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 34, n. 21, p. 2311-2327, 1995.

- 58 DESIRAJU, G. R.; PARSHALL, G. W. Crystal engineering: the design of organic solids. **Materials Science Monographs**, v. 54, n. 1, p. 1-312, 1989.
- 59 BLAGDEN, N.; DE MATAS, M.; GAVAN, P. T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617-630, 2007.
- 60 BRICE, J. Some thermodynamic aspects of the growth of strained crystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 28, n. 2, p. 249-253, 1975.
- 61 DESIRAJU, G. R. Crystal engineering: a brief overview. **Journal of Chemical Sciences**, v. 122, n. 5, p. 667-675, 2010.
- 62 BOSCH, E. Role of sp-C-H...N hydrogen bonding in crystal engineering. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 8, p. 3808-3813, 2010.
- 63 ABRAMOV, Y. A. Virtual hydrate screening and coformer selection for improved relative humidity stability. **CrystEngComm**, v. 17, n. 28, p. 5216-5224, 2015.
- 64 GROOM, C. R.; BRUNO, I. J.; LIGHTFOOT, M. P.; WARD, S. C. The Cambridge structural database. **Acta Crystallographica Section B: structural science, crystal engineering and materials**, v. 72, n. 2, p. 171-179, 2016.
- 65 TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188-2194, 2002.
- 66 HOTEZ, P. J. et al. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 2865-2874, 2014.
- 67 HOLMES, P. (Ed.) **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases**. Washington: World Health Organization, 2015.
- 68 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2013**. Geneva: WHO Press, 2013.
- 69 GENEWEIN, A. et al. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. **Lancet**, v. 342, n. 8875, p. 841-844, 1993.
- 70 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2016**. Geneva: WHO Press, 2016.
- 71 DA ROCHA, J. L. et al. Farmacovigilância em tuberculose: relato de uma experiência no Brasil. **Vigilância Sanitária em Debate: sociedade, ciência & tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 131-135, 2015.
- 72 DE SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 678, 2005.

73 GEMAL, A. L. **Produção de medicamentos para o tratamento da tuberculose no Brasil:** recomendações visando ao aprimoramento da capacidade nacional de produção de medicamentos para a tuberculose. Rio de Janeiro: Instituto de Química - UFRJ, 2011. 51p. Estudo de caso.

74 ARBEX, M. A.; VARELLA, M. D. C. L.; DE SIQUEIRA, H. R.; DE MELLO, F. A. F. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626-640, 2010.

75 ARBEX, M. A.; VARELLA, M. D. C. L.; DE SIQUEIRA, H. R.; DE MELLO, F. A. F. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: fármacos de segunda linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 641-656, 2010.

76 COLLETER, J. C.; GADRET, M. Structure cristalline de composés antituberculeux. I. structure cristalline du chlorhydrate d'ethionamide. **Acta Crystallographica Section B**, v. 24, n. 4, p. 513-519, 1968.

77 COLLETER, J. C.; GADRET, M. Structure cristalline de composés antituberculeux. II. structure cristalline du bromhydrate d'ethionamide. comparaison avec celle du chlorhydrate d'ethionamide. **Acta Crystallographica Section B**, v. 24, n. 4, p. 519-525, 1968.

78 ALLÉAUME, M.; LEROY, F.; GADRET, M.; GOURSOLLE, M. Structure cristalline de composés antituberculeux. IV. structure cristalline de l'éthyl-2-thiocarbamoyl-4 pyridine. **Acta Crystallographica Section B: structural crystallography and crystal chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1994-2000, 1973.

79 BAI, G. Y. et al. (S,S)-2,2'-(1,2-Ethanediyldiimino) dibutan-1-ol. **Acta Crystallographica Section E: structure reports online**, v. 62, n. 6, p. 2173-2174, 2006.

80 GODFREY, R.; HARGREAVES, R.; HITCHCOCK, P. Absolute configuration of (+)-ethambutol hydrobromide. **Acta Crystallographica Section C: crystal structure communications**, v. 48, n. 1, p. 79-81, 1992.

81 BAI, G. Y.; ZHANG, C. F.; SIMPSON, J.; NING, H. S.; PENG, H. W. (R,S)-2,2'-(Ethane-1,2-diyl-diiminio) dibutan-1-ol dinitrate. **Acta Crystallographica Section E: structure reports online**, v. 62, n. 12, p. 5580-5581, 2006.

82 BAI, G. Y.; NING, H. S.; ZHANG, Y. C.; ZENG, T.; LI, J. S. (S,S)-2,2'-(Ethane-1,2-diyl-diiminio) dibutan-1-ol dinitrate. **Acta Crystallographica Section E: structure reports online**, v. 62, n. 8, p. 3364-3365, 2006.

83 BAI, G. Y.; NING, H. S.; SIMPSON, J.; QIN, X. Y.; LI, N. (S, S)-N, N'-Bis (2-hydroxy-2-butyl) ethylenediammonium oxalate pentahydrate. **Acta Crystallographica Section E: structure reports online**, v. 62, n. 10, p. 4567-4568, 2006.

84 CHERUKUVADA, S.; NANGIA, A. Salts and ionic liquid of the antituberculosis drug s, s-ethambutol. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 4, p. 1752-1760, 2013.

- 85 RUBIN-PREMIER, J. M. et al. Variable temperature studies of a polymorphic system comprising two pairs of enantiotropically related forms: [S,S]-ethambutol dihydrochloride. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 3, p. 431-439, 2004.
- 86 JENSEN, L. H. The crystal structure of isonicotinic acid hydrazide¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 18, p. 4663-4667, 1954.
- 87 FREITAS, M. C. et al. Synthesis and structural characterization of a zinc (II) complex of the mycobactericidal drug isoniazid – toxicity against *Artemia salina*. **Polyhedron**, v. 30, n. 11, p. 1922-1926, 2011.
- 88 GROBELNY, P.; MUKHERJEE, A.; DESIRAJU, G. R. Drug-drug co-crystals: temperature-dependent proton mobility in the molecular complex of isoniazid with 4-aminosalicylic acid. **CrystEngComm**, v. 13, n. 13, p. 4358-4364, 2011.
- 89 KAUR, R. et al. Structural insights into proton conduction in gallic acid–isoniazid cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 14, n. 2, p. 423-426, 2014.
- 90 LEMMERER, A.; BERNSTEIN, J.; KAHLENBERG, V. Hydrogen bonding patterns of the co-crystal containing the pharmaceutically active ingredient isoniazid and terephthalic acid. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 41, n. 7, p. 991-997, 2011.
- 91 MASHHADI, S. M. A.; YUNUS, U.; BHATTI, M. H.; TAHIR, M. N. Isoniazid cocrystals with anti-oxidant hydroxy benzoic acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1076, p. 446-452, 2014.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.07.070.
- 92 SARCEVICA, I. et al. Crystal and molecular structure and stability of isoniazid cocrystals with selected carboxylic acids. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 3, p. 1082-1090, 2013.
- 93 SWAPNA, B.; MADDILETI, D.; NANGIA, A. Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: polymorphism, isostructurality, and stability. **Crystal Growth & Design**, v. 14, n. 11, p. 5991-6005, 2014.
- 94 MASHHADI, S. M. A. et al. Synthesis, characterization, solubility and stability studies of hydrate cocrystal of antitubercular Isoniazid with antioxidant and anti-bacterial Protocatechuic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1117, n., p. 17-21, 2016.doi: 10.1016/j.molstruc.2016.03.057.
- 95 DE MELO, C. C. et al. Supramolecular synthesis and thermochemical investigations of pharmaceutical inorganic isoniazid salts. **CrystEngComm**, v. 18, n. 34, p. 6378-6388, 2016.
- 96 DE MELO, C. C. et al. Mechanochemistry applied to reformulation and scale-up production of Ethionamide: salt selection and solubility enhancement. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 149-156, 2016.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.007.
- 97 DINIZ, L. F.; CARVALHO, P. S.; DE MELO, C. C.; ELLENA, J. Development of a salt drug with improved solubility: Ethionamide nitrate. **Journal of Molecular Structure**, v. 1137, p. 119-125, 2017.doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.02.036.

- 98 MANNAVA, M. K. C.; SURESH, K.; NANGIA, A. Enhanced bioavailability in the oxalate salt of the anti-tuberculosis drug ethionamide. **Crystal Growth & Design**, v. 16, n. 3, p. 1591-1598, 2016.
- 99 BECKER, C. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ethambutol dihydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1350-1360, 2008.
- 100 BHUTANI, H.; MARIAPPAN, T.; SINGH, S. An explanation for the physical instability of a marketed fixed dose combination (FDC) formulation containing isoniazid and ethambutol and proposed solutions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 6, p. 667-672, 2004.
- 101 BHUTANI, H.; MARIAPPAN, T. T.; SINGH, S. The physical and chemical stability of anti-tuberculosis fixed-dose combination products under accelerated climatic conditions. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 9, p. 1073-1080, 2004.
- 102 BHUTANI, H.; SINGH, S.; JINDAL, K. C.; CHAKRABORTI, A. K. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 5, p. 892-899, 2005.
- 103 PRASAD, B.; BHUTANI, H.; SINGH, S. Study of the interaction between rifapentine and isoniazid under acid conditions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1438-1441, 2006.
- 104 HAYWOOD, A.; MANGAN, M.; GRANT, G.; GLASS, B. Extemporaneous isoniazid mixture: stability implications. **Journal of Pharmacy Practice and Research**, v. 35, n. 3, p. 181-182, 2005.
- 105 BHUTANI, H.; SINGH, S.; JINDAL, K. Drug-drug interaction studies on first-line anti-tuberculosis drugs. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 10, n. 4, p. 517-524, 2005.
- 106 BAILEY, L. C.; ABDOL, H. High-performance liquid chromatographic analysis of isoniazid and its dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 4, p. 564-567, 1977.
- 107 BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Generally recognized as safe (GRAS): history and description. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 3-18, 2004.
- 108 RAW, A. S. et al. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 397-414, 2004.
- 109 BRITAIN, H. G. X-ray diffraction II: using single-crystal X-ray diffraction to study polymorphism and solvatomorphism. **Pharmaceutical Technology**, v. 24, n. 9, p. 116-125, 2000.

- 110 FERREIRA, F. F.; ANTONIO, S. G.; ROSA, P. C. P.; PAIVA-SANTOS, C. D. O. Crystal structure determination of mebendazole form A using high-resolution synchrotron x-ray powder diffraction data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1734-1744, 2010.
- 111 ROY, S.; AITIPAMULA, S.; NANGIA, A. Thermochemical analysis of venlafaxine hydrochloride polymorphs 1– 5. **Crystal Growth & Design**, v. 5, n. 6, p. 2268-2276, 2005.
- 112 DA SILVA, C. C. et al. Triple structural transition below room temperature in the antifilarial drug diethylcarbamazine citrate. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 7, p. 3094-3101, 2010.
- 113 BUGAY, D. E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 43-65, 2001.
- 114 HEINZ, A.; STRACHAN, C. J.; GORDON, K. C.; RADES, T. Analysis of solid-state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 971-988, 2009.
- 115 VIRTANEN, T.; MAUNU, S. L. Quantitation of a polymorphic mixture of an active pharmaceutical ingredient with solid state ¹³ C CPMAS NMR spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, n. 1, p. 18-25, 2010.
- 116 SUN, C.; GRANT, D. J. Influence of crystal shape on the tableting performance of L-lysine monohydrochloride dihydrate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 5, p. 569-579, 2001.
- 117 GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. New York: Oxford University Press, 2002.
- 118 BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. New York: Oxford University Press, 2002.
- 119 LAWRENCE, X. Y. et al. Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 4, p. 531-536, 2003.
- 120 DAVID, W. I. **Structure determination from powder diffraction data**. Oxford: Oxford University, 2002.
- 121 RODRÍGUEZ-SPONG, B. et al. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241-274, 2004.
- 122 SAUNDERS, M.; GABBOTT, P. Thermal analysis – conventional techniques. In: STOREY, R.; YMEN, I.(Ed.).**Solid state characterization of pharmaceuticals**.Chichester: John Wiley & Sons, 2011. p. 135-186.

- 123 CRAIG, D. Q. M. Characterization of polymorphic systems using thermal analysis. In: HILFIKER, Rolf (Ed.) **Polymorphism**: in the pharmaceutical industry. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2006. p. 43-79.
- 124 CRUZ-CABEZA, A. J. Acid–base crystalline complexes and the pKa rule. **CrystEngComm**, v. 14, n. 20, p. 6362-6365, 2012.
- 125 PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B.; SERJEANT, E. P. **pKa prediction for organic acids and bases**. New York: Springer, 1981.
- 126 NECHIPADAPPU, S. K.; TRIVEDI, D. R. Pharmaceutical salts of ethionamide with GRAS counter ion donors to enhance the solubility. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 578-589, 2017. doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.035.
- 127 BECKER, C. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: isoniazid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 3, p. 522-531, 2007.
- 128 AGILENT TECHNOLOGIES. **CrysalisPRO oxford diffraction**: data collection and processing software for agilent x-ray diffractometers. United Kingdom: Yarnton, 2012.
- 129 DOLOMANOV, O. V. et al. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, n. 2, p. 339-341, 2009.
- 130 FARRUGIA, L. WinGX and ORTEP for Windows: an update. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 4, p. 849-854, 2012.
- 131 SHELDRICK, G. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A**, v. 64, n. 1, p. 112-122, 2008.
- 132 SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: structural chemistry**, v. 71, n. 1, p. 3-8, 2015.
- 133 SPEK, A. Single-crystal structure validation with the program PLATON. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2003.
- 134 SPEK, A. Structure validation in chemical crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 65, n. 2, p. 148-155, 2009.
- 135 MACRAE, C. F. et al. Mercury CSD 2.0 - new features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n. 2, p. 466-470, 2008.
- 136 NARDELLI, M. PARST95—an update to PARST: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, n. 5, p. 659-659, 1995.
- 137 GLOMME, A.; MÄRZ, J.; DRESSMAN, J. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 1-16, 2005.

- 138 HIGUCHI, T. K.; CONNORS A. Phase solubility techniques. **Advances in Chemical Instrumentation**, v. 4, n. 1, p. 212-217, 1965.
- 139 WYSOKIŃSKI, R. et al. Density functional study on the molecular structure, infrared and Raman spectra, and vibrational assignment for 4-thiocarbamoylpyridine. **Journal of Molecular Structure**, v. 791, n. 1, p. 70-76, 2006.
- 140 MUKHERJEE, A.; DESIRAJU, G. R. Combinatorial exploration of the structural landscape of acid-pyridine cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 14, n. 3, p. 1375-1385, 2014.
- 141 GOEBBERT, D. J. et al. Infrared spectroscopy of the microhydrated nitrate ions $\text{NO}_3\text{-(H}_2\text{O)}$. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 26, p. 7584-7592, 2009.
- 142 HANCOCK, B. C.; YORK, P.; ROWE, R. C. The use of solubility parameters in pharmaceutical dosage form design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, n. 1, p. 1-21, 1997.
- 143 ESCUDERO, G. E. et al. Improving the antidepressant action and the bioavailability of sertraline by co-crystallization with coumarin 3-carboxylate. structural determination. **Chemico-Biological Interactions**, v. 249, p. 46-55, 2016. doi:10.1016/j.cbi.2016.03.010
- 144 CHERUKUVADA, S.; NANGIA, A. Polymorphism in an API ionic liquid: Ethambutol dibenzoate trimorphs. **CrystEngComm**, v. 14, n. 23, p. 7840-7843, 2012.
- 145 GIFFIN, G. A. et al. Vibrational spectroscopy of secondary amine salts: 1. assignment of NH_2^+ stretching frequencies in crystalline phases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 49, p. 15914-15920, 2009.
- 146 HEACOCK, R.; MARION, L. The infrared spectra of secondary amines and their salts. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 34, n. 12, p. 1782-1795, 1956.
- 147 AITIPAMULA, S.; WONG, A. B.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. Novel solid forms of the anti-tuberculosis drug, Isoniazid: ternary and polymorphic cocrystals. **CrystEngComm**, v. 15, n. 29, p. 5877-5887, 2013.
- 148 JÓJÁRT-LACZKOVICH, O.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Amorphization of a crystalline active pharmaceutical ingredient and thermoanalytical measurements on this glassy form. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 243-247, 2010.

APÊNDICE A – Development of a salt drug with improved solubility: Ethionamide nitrate

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/molstruc>

Development of a salt drug with improved solubility: Ethionamide nitrate

Luan F. Diniz, Paulo S. Carvalho Jr., Cristiane C. de Melo, Javier Ellena*

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2016

Received in revised form

8 February 2017

Accepted 9 February 2017

Available online 11 February 2017

Keywords:

Active pharmaceutical ingredients

Tuberculosis

Ethionamide

Solubility

X-ray diffraction

Vibrational spectroscopy

ABSTRACT

To avoid drug resistance, an adequate tuberculosis treatment should include not only a first-line drug but also at least one second-line drug such as, for example, Ethionamide (ETH). However, the dissolution rate and oral absorption of ETH is highly limited by its low aqueous solubility. Considering that a salt is in general more soluble than its parent compound, herein we depicted a new supramolecular modification of ETH, an Ethionamide nitrate salt (ETHNO₃). This salt is the first ETH structure that has been crystallized with four independent ionic pairs (ETH⁺NO₃⁻) in the asymmetric unit. In addition to the structural study, the salt formation was also identified on the FT-IR and FT-Raman spectra. The thermal behavior of ETHNO₃ was also investigated here together with its solubility profile in three dissolution media (purified water, pH 4.0 and 7.0).

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Salt formation is well recognized and accepted as the most effective and simple method for modifying the solubility of ionizable drugs [1–4]. For weakly basic APIs, salt formation experiments are usually conducted using inorganic acids, mainly HCl (c.a. ~54% of pharmaceutical salts) [5–7]. However, the study of different salt formers is mandatory since the influence of a given counterion on the API's physicochemical properties is still difficult to predict. Consequently, the screening and selection of an optimal salt form with the desired physico-chemical properties as well as pharmacodynamics behavior has become a crucial stage on the drug discovery pathway [5–7].

Tuberculosis (TB) is one of the major causes of mortality in developing countries [8]. Its high incidence and prevalence turns TB a global health problem. The success of first-line drugs in TB treatment is low and often requires the application of second-line drugs [9]. In addition, the high incidence of TB in HIV patients has highly contributed to the emergence and spread of multidrug-resistant TB (MDR-TB). Although the second-line drugs are less effective and tolerated than the first-line ones, they are essential to

avoid the growth of resistance strains and to reduce the treatment time [9]. Ethionamide (ETH, Scheme 1), 2-ethylpyridine-4-carbothioamide, is a Biopharmaceutical Classification System (BCS) class II anti-TB drug. It is the most frequently used second-line drug in the treatment of MDR-TB [10,11]. Its limited solubility [12] and unfavored bioavailability has stimulated the design of new solid forms, such as salts and cocrystals, in order to enhance its pharmaceutical performance. In our recent study [13], we synthesized and study three ETH salts: a maleate, a saccharinate and an oxalate. Following this approach, Mannava et al. [14] has been reported a series of ETH co-crystals with glutaric, adipic, suberic, sebacic and fumaric acids. Within this framework, herein we describe a novel ETH salt form with an inorganic acid, HNO₃. Besides the two halides of ETH (hydrochloride and hydrobromide salts [15,16]), Ethionamide nitrate (ETHNO₃) represents the third inorganic salt reported to date. In addition to the solubility studies at different dissolution media (purified water, pH 4.0 and 7.0), a solid state characterization of ETHNO₃ was performed using Single-Crystal X-ray Diffraction (SCXRD), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Hot-stage Microscopy (HSM), Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Raman (FT-Raman) spectroscopy.

* Corresponding author.

E-mail address: javiere@ifsc.usp.br (J. Ellena).

Scheme 1. Structure of Ethionamide (ETH) showing the conformational flexible substituents (thionamide and ethyl groups) and the τ and χ torsion angles.

2. Experimental

2.1. Preparation

Ethionamide was purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. All other chemicals, such as nitric acid and ethanol, were from analytical grade. ETHNO₃ was obtained by the reaction of ETH and HNO₃ acid. 20 mg of ETH was mechanically reacted with excess of HNO₃ (14 mol L⁻¹). After that the system suffer a change in its color and the resultant solid was dissolved in ethanol 95% solution and left for slow evaporation at room temperature. Red plate crystals were obtained after a few days upon solvent evaporation. X-ray powder diffraction was used to verify the purity of synthesized sample. The experimental powder XRD pattern of ETHNO₃ is in good agreement with the calculated indicating that the sample presents high purity (Fig. S2).

2.2. Single crystal structure determination (SCSD)

The X-ray diffraction data for the ETHNO₃ was collected at room temperature on an Agilent Super Nova diffractometer with CCD detector system equipped with a Mo source ($\lambda = 0.71073$ Å). The data integration, the Lorentz and polarization effect and absorption corrections were applied with CrysAlis(Pro) [17]. Using Olex2 [18], the structure was solved by direct methods and the model obtained was refined by full-matrix least squares on F² (SHELXTL-97 [19]). All the hydrogen atoms were placed in calculated positions and refined with fixed individual displacement parameters [$U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}$ or $1.5U_{eq}$] according to the riding model (C–H bond lengths of 0.97 Å and 0.96 Å, for methylene and methyl groups, respectively). An analysis of the diffraction data revealed a twinned structure and disordered ethyl groups (for more details see ESI[†]). Molecular representations were generated by Olex2 [18] and MERCURY 3.2 [20]. The CIF file of the ETHNO₃ was deposit in the Cambridge Structural Data Base [21] under the code CCDC 1504368. Copies of the data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk.

2.3. Thermal analyses

DSC measurements were performed on a DSC-60 Schimatzu instrument with constant sample weight (2.5 ± 0.5 mg), scanning rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$, under dry N₂ as the purge gas. TGA was carried out on a Shimadzu TGA-60 thermobalance. Approximately 5.0 mg of sample were placed on an alumina pan and heated under N₂ flow from 25 to 300 °C at a heating rate of 10°C/min . All thermal analyses were performed on the temperature range of 25–250 °C.

2.4. Hot-stage polarized optical microscopy

HSM was performed on a Leica DM2500P microscope connected to a Linkam T95-PE hot-stage equipment under air atmosphere.

Data were visualized with a Linksys 32 software for hot-stage control. Crystal ETHNO₃ was placed on a 13 mm glass coverslip within a 22 mm diameter pure silver heating block inside of the stage. The sample was heated at a ramp rate of $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ up to a final temperature of 200 °C but discontinued on melting of all material.

2.5. Vibrational spectroscopy analysis

The infrared spectra were recorded on Alpha Bruker FT-IR spectrophotometer using KBr pellets in the range of 4000–400 cm⁻¹ with an average of 64 scans and 2 cm⁻¹ of spectral resolution. FT-Raman spectroscopy was performed using a Bruker RFS 100 instrument with Nd³⁺/YAG laser operating at 1064 nm in the near-infrared and a CCD detector cooled with liquid nitrogen using a spectral resolution of 4 cm⁻¹.

2.6. Solubility measurements

Aqueous solubility of ETH and ETHNO₃ was determined by the flask saturation method at 25 °C in three dissolution media (purified water, pH 4.0 and 7.0) [22]. Saturated solutions of ETHNO₃ were prepared stirring an excess amount of this salt (100 mg) into 500 µL of each dissolution media for a period of 48 h. After 48 h of sedimentation, the solutions were filtered through a 0.45 mm filter (Millipore). The identity of the solid sediments was checked by PXRD analysis. UV–Vis spectroscopy was employed to analyze the ETHNO₃ supernatant concentration. Samples were diluted in their respective dissolution media before we start measuring. ETH and ETHNO₃ showed absorbance maxima at 282 nm in pH 4.0 and 286 nm in purified water and pH 7.0 (Figs. S5 and S6, Supplementary Information Section). ETH and ETHNO₃ solubility were measured by interpolating their maximum absorbance readings to a calibration curve. The calibration curve was constructed for each dissolution media studied at 25 °C using the maximum absorbance of ETH in concentrations ranging from 0.005 to 0.2 mg mL⁻¹ (Table S1).

3. Result and discussion

3.1. Structure determination

Ethionamide nitrate, ETHNO₃, has been prepared considering the protonable pyridine nitrogen atom of ETH (pK_a : 4.49 [13]) and the possible resultant pyridinium anion synthon [23–26]. Red-plate crystals only grow up at an extremely acid crystallization medium. ETHNO₃ crystallizes in the P1 Triclinic centrosymmetric space group ($Z = 2$) with four ETH⁺ NO₃⁻ pairs per asymmetric unit ($Z' = 4$) (Fig. 1) [27–29]. Details of the structure determination and refinement procedures are presented in Table 1. As expected, each independent ETH⁺ cation is H-bonded to a NO₃⁻ anion through the pyridinium ring. Pyridine protonation was confirmed by the proton location in the Fourier map and the analysis of the C4–N2–C5 angle in the pyridine ring (Table 2). This angle, which assumes the value of 118° in the neutral ETH, appears in the four independent molecules widened in the 122–124° range.

Structurally, ETH is a pyridine derivative with flexible substituents (Scheme 1), which explains the high number of ETH⁺ conformers found in the ASU ($Z' > 1$). Fig. 2 shows the overlay of the four conformers, obtained by superimposing the pyridinium rings. Notoriously, conformer A differs significantly from the other ones (see τ and χ torsion values in Table 2). Conformer B and C are practically equivalent, showing the same τ and χ values (Table 2). Conformer D in turn differs from those by the value of χ .

In the crystal packing of ETHNO₃, each NO₃⁻ anion is H-bonded

Fig. 1. View of the ETHNO₃ asymmetric unit.

Table 1

Crystal data and structure refinement of ETHNO₃.

Identification code	ETHNO ₃
Empirical formula	C ₃₂ H ₄₄ N ₁₂ O ₁₂ S ₄
Formula weight	917.03
Temperature/K	293(1)
Crystal system	Triclinic
Space group	$P\bar{1}$
<i>a</i> /Å	7.7527(11)
<i>b</i> /Å	15.994(2)
<i>c</i> /Å	17.9278(17)
α /°	75.511(10)
β /°	85.936(10)
γ /°	85.022(12)
Volume/Å ³	2141.4(5)
<i>Z</i> / <i>Z'</i>	2/4
$\rho_{\text{calc}}/\text{g/cm}^3$	1.422
μ/mm^{-1}	0.294
<i>F</i> (000)	960.0
Crystal size/mm ³	0.2 × 0.1 × 0.05
Radiation	MoK α (λ = 0.71073)
2 θ range for data collection/°	6.534 to 50.698
Index ranges	−9, 8; −19, 19; −21, 21
Reflections collected	17090
Independent reflections	7833 [<i>R</i> _{int} = 0.2322, <i>R</i> _{sigma} = 0.1775]
Data/restraints/parameters	7833/10/541
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.008
Final <i>R</i> indexes [<i>I</i> ≥ 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0869, <i>wR</i> ₂ = 0.2153
Final <i>R</i> indexes [all data]	<i>R</i> ₁ = 0.1296, <i>wR</i> ₂ = 0.2444
Largest diff. peak/hole/e Å ^{−3}	0.49/−0.48

Table 2

Selected torsion angles (τ and χ) for ETH⁺ conformers.

C3A–C2A–C1A–N1A	26.7(9)	C3C–C2C–C1C–N1C	−30.7(9)
C6A–C2A–C1A–S1A	25.0(9)	C5C–C2C–C1C–S1C	−30.4(9)
N2A–C5A–C7A–C8A	−64.0(1)	N2C–C6C–C7C–C8C	64.5(9)
C6A–C5A–C7A–C8A	122.4(9)	C5C–C6C–C7C–C8C	−115.7(8)
C3B–C2B–C1B–N1B	−29.7(9)	C3D–C2D–C1D–N1D	−29.3(9)
C5B–C2B–C1B–S1B	−31.4(8)	C5D–C2D–C1D–S1D	−30.2(9)
N2B–C5B–C7B–C8B	62.0(1)	N2D–C6D–C7D–C8D	−72.0(2)
C5B–C6B–C7B–C8B	−115.9(9)	C5D–C6D–C7D–C8D	146.0(1)

to one ETH⁺ conformers (via N2⁺–H2...O1[−]) to form the classical pyridinium...anion synthon. This results into four independent ionic pairs (namely A, B, C and D) with N2⁺...O1[−] interatomic distances between 2.793 and 2.857 Å (Table 3, Fig. 3).

Fig. 2. Overlay of the four ETH⁺ conformers, obtained by superimposing the pyridinium rings.

The NO₃[−] is also involved in H-bonds with the amide group of another ETH⁺ molecule. In fact, the anions act as bridges connecting two different ionic pairs (A to D and B to C) establishing two symmetry-independent chains along the [011] direction (Fig. 4a). These chains are alternately stacked along the *a* axis (Fig. 4b). In chain I, the anions are practically coplanar with the pyridinium ring, which explain the existence of an addition C–H...O[−] interaction and the formation of a *R*₂²(7) motif (Fig. 4a). This interaction, however, is not observed in the chain II, since the dihedral angle between the nitrate–pyridinium planes is 44.04° for the ionic pair A and 34.91° for the ionic pair D (see ESI†, Fig. S1). Chains I and II are linked by reciprocal (N1(A)–H1(A)...O3(C)/N1(C)–H1(C)...O3(A)) H-bonds giving rise to sheets parallel to the *bc* plane (Fig. 4a). These sheets are also stacked along the *a* axis by a combination of cross-linked H-bonds involving the same chains (i.e. chains I/I and chains II/II; Fig. S1). As shown in Fig. 4c, the overall 3-D arrangement is sustained essentially by van der Waals contacts, with hydrophobic channels intercalating the sheets.

3.2. Spectroscopy analysis

The vibrational study was performed taking into account the structural features outlined above. The FTIR and FT-Raman spectra of ETHNO₃ and ETH are presented in Fig. 5. The band assignments were made using the spectroscopic data of nitrate salts and related ETH compounds found in the literature [30–33].

FT-IR and FT-Raman spectra of ETH and ETHNO₃ show clear differences that could be, in part, attributed to the protonation of the pyridine and to the vibrational modes arising from the nitrate anion. A strong absorption band appearing at 1593 cm^{−1} in FT-IR

Table 3
Geometric parameters of the Hbonds in the ETHNO₃ structure.

D—H...A	<i>d</i> (D...A) (Å)	<i>d</i> (H...A) (Å)	∠D—H...A(°)	symmetry codes
N1A—H1AB...O1D	3.059(7)	2.217(5)	166.44(41)	x, +y+1, +z
N2A—H2A...O1A	2.793(7)	1.944(5)	169.06(39)	x, +y, +z+1
C4C—H4C...O3D	3.140(9)	2.459(5)	130.07(47)	−x+1, −y+1, −z+1
C4D—H4D...O2D	3.124(10)	2.474(6)	127.06(44)	−x+1, −y+1, −z+1
N1C—H1CB...O1B	3.138(6)	2.295(4)	166.78(36)	−x+2, −y+1, −z+1
N2B—H2B...O1B	2.843(7)	1.988(4)	173.71(37)	x−1, +y, +z
N1D—H1DA...O3B	3.025(8)	2.193(5)	162.86(39)	x−1, +y, +z
C4B—H4B...O3B	3.092(8)	2.464(5)	124.87(45)	x−1, +y, +z
N1B—H1BB...O1C	3.144(6)	2.298(2)	167.82(35)	−x+1, −y+2, −z
C4B—H4B...O3A	3.219(10)	2.574(6)	126.87(44)	x, y, z
C4C—H4C...O3C	3.061(9)	2.417(5)	126.35(49)	x, y, z
C4D—H4D...O2D	3.055(9)	2.550(6)	114.45(43)	x, y, z
N2D—H2D...O1D	2.832(7)	1.986(4)	167.84(37)	x, y, z
N1C—H1CA...O2B	3.011(8)	2.174(6)	164.45(41)	x, y, z
N2C—H2C...O1C	2.857(7)	1.971(4)	166.48(37)	x, y, z
N1D—H1DB...O1A	3.016(7)	2.182(5)	163.28(39)	x, y, z
N1B—H1BA...O2C	3.016(8)	2.176(5)	165.55(42)	x, y, z

Fig. 3. View of the two symmetry-independent chains. The yellow, blue, red and green colored molecules represent the A, B, C and D ETH⁺ conformers, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and 1596 cm^{−1} in FT-Raman characterizes the ETH spectra. These bands are attributed to the pyridine C–N stretching bonds and have been identified by Mukherjee et al. [31] as a fingerprint for the acid-pyridine H-bonds. In the salt spectrum, these bands appear blue shifted to 1620 cm^{−1} (FT-IR) and 1630 cm^{−1} (FT-Raman) due to the protonation.

Additionally, in the case of ETHNO₃, we observe the appearing of new bands associated to the anion vibrations. The FT-IR spectrum shows two bands at 1385 and 1321 cm^{−1} assigned to the N–O asymmetric stretching mode. The same finding is observed in the FT-Raman spectrum, where this mode appears split into two bands at 1330 and 1298 cm^{−1}.

As expected, the symmetric N–O stretching mode, which appears as a strong band at 1048 cm^{−1} in the FT-Raman, is not observed in the FT-IR spectrum. On the other hand, the band at 826 cm^{−1} is only observed in the FT-IR. This band arising from the N–O bending-out-of-plane mode is forbidden by electronic selection rules and is therefore absent in the FT-Raman spectrum.

3.3. Thermal characterization

The thermal profile was assessed by a combination of DSC, TGA and HSM techniques. DSC and TGA curves of ETHNO₃ are illustrated in Fig. 6a/b. The salt is stable between 25 and 140 °C. DSC curve shows an endothermic melting peak at 150.6 °C with an onset temperature of 145.7 °C. No other thermal events were observed in DSC curve before the melting (Fig. 6b). According to the TGA curve, the thermal decomposition is observed after 180 °C where an

exothermic peak (~195.2 °C) is also detected in the DSC curve (Fig. 6a). Although HSM and DSC/TG experiments were performed under different atmospheres, the DSC/TGA and HSM results are in good agreement to each other. The HSM images (Fig. 6c) show that a single ETHNO₃ crystal starts to melt at ca. 145 °C and that above 150 °C it is completely melted into a liquid droplet.

The melting point is directly related to the lattice energy (*E*_{latt}) and, therefore, with the strength of the interactions between ions or molecules in the crystal. The lattice energy for a crystalline solid is defined as the energy required for separating the ions or molecules at a sufficient distance from each other so that there is no interaction between them. Since energy is necessary to do this, the higher the lattice energy higher will be the melting point. The melting point of ETH (*T*_{onset} = 160.2 °C) [13] is higher than the melting point of its corresponding nitrate salt. Thus, despite the non-ionic nature, ETH molecules seems to be more tightly linked than those of ETHNO₃, which implies: *E*_{latt} (ETH) > *E*_{latt} (ETHNO₃).

3.4. Equilibrium solubility

Solubility is one of the most important properties of an API because is intrinsically related to its oral absorption and consequently to its pharmaceutical performance [34,35]. In the pharmaceutical context, the equilibrium solubility defines the maximum amount of drug dissolved in a medium at a specific temperature and pH. The equilibrium solubility of ETH and ETHNO₃ were determined at 25 °C in purified water and pH 4.0 and 7.0 (Fig. 7).

Both ETH and ETHNO₃ show the highest solubility values in pH 4.0. The mean values observed for ETH and ETHNO₃ in the buffered solution pH 4.0 were 0.68 mg/mL and 139.01 mg/mL, respectively. It is important to mention that the PXRD data of the solid residues agreed to the calculated ones using the Mercury program with the ETH and ETHNO₃ structures as input (Figs. S4 and S3). Furthermore, the pH values did not show any significant variation (see Table S2), which together with the powder diffraction patterns, exclude any possible conversion.

In comparison with the acid medium (pH 4.0), the solubility of ETHNO₃ in purified water is smaller (95.20 mg/mL), but even so ETHNO₃ is about 240-fold more soluble than ETH (0.42 mg/mL) in this medium. The reason is that the salt undergoes partial hydrolysis, in which the ionized drug (ETH⁺) reacts with the water, converting to its less soluble free base (ETH) and releasing H₃O⁺ ions. The increasing of hydronium concentration is accompanied by a decreasing of the pH value of water, from 5.90 to 3.05 (Table S2).

Fig. 4. Supramolecular 2-D sheet formed by the linking of the chains I/II via reciprocal N1(A)–H1(A)···O3(C) H-bonds (a). Partial view of the crystal packing highlighting the stacking of the chains along [100] (b). 3-D crystal packing diagram of ETHNO₃ (c).

Fig. 5. FT-IR spectrum of ETHNO₃ (red) and ETH (blue) (a). FT-Raman spectrum of ETHNO₃ (red) and ETH (blue) (b). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

At acidic pH media, the solubility of ETH is reported to be considerably higher than neutral one [13,14]. As result, all ETH formed as product of partial hydrolysis of the salt is soluble in the medium

and therefore it was not detected by PRXD analysis.

The solubility of ETH in the buffered solution pH 7.0 was practically the same that in the purified water (0.38 mg/mL). For ETHNO₃ (122.92 mg/mL), it was found a solubility value considerably higher than the one obtained in purified water, but lower than the value obtained in pH 4.0. Since there is no variation on the pH values, a possible conversion was discarded.

4. Conclusions

In this work, salt formation has been applied as a supramolecular strategy to achieve an enhancing of the ETH solubility. ETHNO₃ has been crystallized with four independent ionic pairs (namely A, B, C and D) in the asymmetric unit. For the first time it was reported an ETH structure with $Z' > 1$. Like in other ETH salts, the ionic pair is stabilized by a strong pyridinium⁺···anion H-bond. In addition to the SCXRD results, protonation of ETH molecules has also been confirmed by a significant blue shift of the pyridine C–N stretching mode in the FT-IR and FT-Raman spectra.

ETHNO₃ begins to melt at the temperature of 145.7 °C, approximately 15 °C below the melting point of ETH ($T_{\text{onset}} = 160.2$ °C). The multiple conformations adopted by the ETH⁺ cations and the less efficient crystal packing of ETHNO₃ appear to have a great effect on its melting point by introducing instability into the system. Taking into account the three dissolution media studied here (purified water, pH 4.0 and 7.0), both ETH and ETHNO₃ show to be considerably more soluble in the buffered solution pH 4.0. At this medium, ETHNO₃ is about 200-fold more soluble than ETH, which makes this salt a suitable candidate for novel ETH pharmaceutical formulations.

Fig. 6. TGA (a), DSC (b) curves and HSM images (c) of ETHNO_3 .

Fig. 7. Values of equilibrium solubility of ETH and ETHNO_3 in three dissolution media.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian funding agencies FAPESP (L.F.D. grant 15/25694-0 and P.S.C.-Jr. grant 12/05616-7), CAPES (C.C.M.) and CNPq (grant 306337/2013-4) for financial support. The authors would also like to thank Dra. Renata Diniz and Dr. Luiz F. C. Oliveira (Federal University of Juiz de Fora) for allowing access to the X-ray diffraction, FT-IR and FT-Raman facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.02.036>.

References

- [1] J. Wouters, L. Quere, D.E. Thurston, *Pharmaceutical Salts and Co-crystals*, Royal Society of Chemistry, 2011.
- [2] S.M. Berge, L.D. Bighley, D.C. Monkhouse, *Pharmaceutical salts*, *J. Pharm. Sci.* 66 (1) (1977) 1–19.
- [3] D.P. Elder, R. Holm, H.L. Diego, Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility, *Int. J. Pharm.* 453 (1) (2013) 88–100.
- [4] G. Davies, Changing the salt, changing the drug, *Pharm. J.* 266 (2001) 322–323.
- [5] P.H. Stahl, et al., *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, Wiley, 2002.
- [6] S.N. Black, et al., Structure, solubility, screening, and synthesis of molecular salts, *J. Pharm. Sci.* 96 (5) (2007) 1053–1068.

- [7] A.T.M. Serajuddin, Salt formation to improve drug solubility, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (7) (2007) 603–616.
- [8] K. Zaman, Tuberculosis: a global health problem, *J. Health Popul. Nutr.* 28 (2) (2010) 111–113.
- [9] M.L. Bastos, et al., Treatment outcomes of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis according to drug susceptibility testing to first-and second-line drugs: an individual patient data meta-analysis, *Clin. Infect. Dis.* 59 (10) (2014) 1364–1374.
- [10] Ethionamide, *Tuberculosis* 88 (2) (2008) 106–108.
- [11] F. Wang, et al., Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy, *J. Exp. Med.* 204 (1) (2007) 73–78.
- [12] Ethionamide Predicted Solubility. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00609>.
- [13] C.C. de Melo, et al., Mechanochemistry applied to reformulation and scale-up production of Ethionamide: salt selection and solubility enhancement, *Eur. J. Pharm. Sci.* 81 (2016) 149–156.
- [14] M.K.C. Mannava, K. Suresh, A. Nangia, Enhanced bioavailability in the oxalate salt of the anti-tuberculosis drug ethionamide, *Cryst. Growth Des.* 16 (3) (2016) 1591–1598.
- [15] J.C. Colleter, M. Gadret, Structure cristalline de composés antituberculeux. I. Structure cristalline du chlorhydrate d'éthionamide, *Acta Crystallogr. B24* (1968) 513–519.
- [16] J.C. Colleter, M. Gadret, Structure cristalline de composés antituberculeux. II. Structure cristalline du bromhydrate d'éthionamide. Comparaison avec celle du chlorhydrate d'éthionamide, *Acta Crystallogr. B24* (1968) 519–525.
- [17] CrysAlisPRO, Oxford Diffraction/Agilent Technologies UK Ltd, Yarnton, England.
- [18] O.V. Dolomanov, et al., OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program, *J. Appl. Crystallogr.* 42 (2) (2009) 339–341.
- [19] G. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. Sect. A* 64 (1) (2008) 112–122.
- [20] C.F. Macrae, et al., Mercury: visualization and analysis of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 39 (3) (2006) 453–457.
- [21] F. Allen, The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallogr. Sect. B* 58 (3 Part 1) (2002) 380–388.
- [22] C.H.M. Eirkson, C.M. Osbourne, P.G. Sayre, M. Zeeman, Water solubility, in: *Environmental Assessment Technical Assistance Handbook*, U.S.F.A.D. Administration, Washington DC, 1987, pp. 1–11.
- [23] B.R. Bhogala, S. Basavoju, A. Nangia, Tape and layer structures in cocrystals of some di- and tricarboxylic acids with 4,4'-bipyridines and isonicotinamide. From binary to ternary cocrystals, *CrystEngComm* 7 (90) (2005) 551–562.
- [24] B. Sarma, et al., Synthon competition and cooperation in molecular salts of hydroxybenzoic acids and aminopyridines, *Cryst. Growth Des.* 9 (3) (2009) 1546–1557.
- [25] A. Mukherjee, G.R. Desiraju, Combinatorial exploration of the structural landscape of acid–pyridine cocrystals, *Cryst. Growth Des.* 14 (3) (2014) 1375–1385.
- [26] B.G. Oliveira, State of the art in Hydrogen bond, *Quím. Nova* 38 (10) (2015) 1313–1322.
- [27] S. Aitipamula, et al., Multiple molecules in the crystallographic asymmetric unit. Self host-guest and doubly interpenetrated hydrogen bond networks in a pair of keto-bisphenols, *CrystEngComm* 5 (78) (2003) 447–450.
- [28] R. Bishop, M.L. Scudder, Multiple molecules in the asymmetric unit ($Z' > 1$) and the formation of false conglomerate crystal structures, *Cryst. Growth Des.* 9 (6) (2009) 2890–2894.
- [29] K.M. Steed, J.W. Steed, Packing problems: high Z' crystal structures and their relationship to cocrystals, inclusion compounds, and polymorphism, *Chem. Rev.* 115 (8) (2015) 2895–2933.

- [30] R. Wysokiński, et al., Density functional study on the molecular structure, infrared and Raman spectra, and vibrational assignment for 4-thiocarbamoylpyridine, *J. Mol. Struct.* 791 (1) (2006) 70–76.
- [31] A. Mukherjee, G.R. Desiraju, Combinatorial exploration of the structural landscape of Acid–Pyridine cocrystals, *Cryst. Growth Des.* 14 (3) (2014) 1375–1385.
- [32] N. Gourdoupi, et al., Novel proton-conducting polyelectrolyte composed of an aromatic polyether containing main-chain pyridine units for fuel cell applications, *Chem. Mater.* 15 (26) (2003) 5044–5050.
- [33] D.J. Goebber, et al., Infrared spectroscopy of the microhydrated nitrate ions $\text{NO}_3^-(\text{H}_2\text{O})_{1-6}$, *J. Phys. Chem. A* 113 (26) (2009) 7584–7592.
- [34] P.S. Carvalho Jr., et al., X-Ray diffraction, spectroscopy and thermochemical characterization of the pharmaceutical paroxetine nitrate salt, *J. Mol. Struct.* 1118 (2016) 288–292.
- [35] P.S. Carvalho Jr., et al., Rare case of polymorphism in a racemic fluoxetine nitrate salt: phase behavior and relative stability, *Cryst. Growth Des.* 16 (7) (2016) 3875–3883.

APÊNDICE B – Reducing the hygroscopicity of the anti-tuberculosis drug (*S,S*)-ethambutol
using multicomponent crystal forms

Reducing the Hygroscopicity of the Anti-Tuberculosis Drug (S,S)-Ethambutol Using Multicomponent Crystal Forms

Luan F. Diniz, Paulo S. Carvalho, Jr., Cristiane C. de Melo, and Javier Ellena*

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos, São Paulo, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: Ethambutol (ETB) is a chiral dibasic compound formulated and marketed as the (S,S)-ethambutol dihydrochloride, (S,S)-EDH, to treat tuberculosis. It is administered orally in a solid formulation composed of isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide as a fixed-dose combination tablet. Because of its high hygroscopicity, (S,S)-EDH is known for catalyzing the degradation of isoniazid by rifampicin to yield isonicotinyl hydrazone. In order to avoid or even minimize these mutual drug–drug interactions, in this work we have focused on the development of less hygroscopic multicomponent solid forms of ETB. Four salts of this drug, namely, oxalate (ETBOXA), maleate, terephthalate, and trichloroacetate, were prepared via supramolecular synthesis by the slow evaporation method and characterized by X-ray diffraction (single crystal X-ray diffraction, powder X-ray diffraction), spectroscopic (Fourier transform-infrared), and thermal (thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, hot stage microscopy) techniques. The hygroscopic nature of these salts, including (S,S)-EDH, were evaluated, and all of them were found to be hygroscopic, with the exception of ETBOXA.

1. INTRODUCTION

The development of multicomponent crystal forms, e.g., salts and cocrystals, represents an important branch of pharmaceutical sciences as an alternative route to improve drug's physicochemical properties (aqueous solubility, dissolution rate, hygroscopicity, and thermal stability).^{1–5} Apart from pharmaceutical perspectives, salt or cocrystal formation is a process strictly governed by the acidity/basicity of the ionizable groups in the drug and in the salt formers (or coformers).¹ In general, pharmaceutically acceptable strong acids are used to protonate a basic drug, such as ethambutol (ETB, Scheme 1) and thereby convert it into salts.⁶ In cases of nonprotonation or even nonionizable drugs, a cocrystal can be formed.⁷ However,

for ionizable drugs, salt formation is still the most effective low-cost method and consequently the preferential one to increase the low solubility and bioavailability of the parent drug.^{1,4,5} As estimated, approximately 50% of all drugs available for medicinal use are marketed as salts.⁸

Ethambutol (ETB) is one of the first-line antimycobacterial drugs used to treat tuberculosis (TB).⁹ It is formulated using the active stereoisomer (S,S)-ethambutol in the form of a dihydrochloride salt, (S,S)-EDH.^{9,10} The mechanism of action of this drug is not well-known, but there is some evidence that it acts by inhibition of the arabinosyl transferase. This enzyme catalyzes the polymerization of the arabinose into arabinan and then arabinogalactan, an essential component of the mycobacterial cell wall.^{9–11}

The first phase of TB treatment is based on the use of ETB in combination with isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide as a fixed-dose combination (FDC) tablet.^{9–11} The use of four drugs in a single tablet can simplify the TB treatment and limit the risk of drug resistance.^{12,13} Besides its obvious benefits, one of the main concerns about the use of antitubercular FDCs lies in the high hygroscopicity of (S,S)-EDH, which increases the degradation of rifampicin and isoniazid by providing a favorable acidic environment.^{9,10,14} At low pH values, rifampicin can be converted to 3-formylrifamycin, which further reacts with isoniazid to form isonicotinyl hydrazone. To avoid drug–drug

Scheme 1. Molecular Structure of ETB and Salt Formers Used in This Study

Received: January 27, 2017

Revised: March 13, 2017

Published: March 28, 2017

interactions and water uptake, two separated wet granulation process are employed, one for (S,S)-EDH and the other one for isoniazid and pyrazinamide. These two types of granules are coated with polymers before they are blended with rifampicin to make up the final product formulation.¹⁵

In order to overcome the undesirable effects of (S,S)-EDH, an extensive amount of studies have been emerged in the last few years, many of them dealing with the development of multicomponent crystal forms of this drug.^{16–22} Recently, Nangia et al. have been prepared and characterized five salts (sulfate, dimesylate, ditosylate, dibesylate, and fumarate) and two ionic liquids (dibenzoate and adipate), but all of them were found to be hygroscopic.²² For this reason, herein we report a screen of ETB with a series of carboxylic/dicarboxylic acids, trichloroacetic, maleic, oxalic, and terephthalic acids. This reaction has given rise to four ETB salts, and this is supported not only by the X-ray structures, but also by the spectroscopic data (Fourier transform infrared). Finally, the hygroscopic nature of these salts and of (S,S)-EDH has been evaluated by thermogravimetric analysis (TGA), in which the samples, initially dried, were exposed to an environment with high relative humidity, and their mass losses were measured for different exposure times.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Preparation of Ethambutol Free Base (ETB). (S,S)-EDH was purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. All other chemicals were of analytical or chromatographic grade. ETB was obtained according to the method reported by Bhutani et al.⁹ To 2 g of (S,S)-EDH was added 20 mL of a 5 mol L⁻¹ aqueous NaOH solution. This mixture was stirred for 10–15 min, and the product (ETB) was extracted with CH₂Cl₂ (25 mL). The organic phase was further dried with Na₂SO₄ to remove traces of water. Block-shaped crystals of ETB were grown after 1 day by slow evaporation of CH₂Cl₂ at room temperature. The final product was characterized by powder X-ray diffraction (PXRD) (Figure S2, Supporting Information).

2.2. Supramolecular Synthesis. Ethambutol Oxalate (ETBOXA). Twenty milligrams of ETB (0.098 mmol) was mechanically milled with 17.6 mg (0.195 mmol) of oxalic acid in a 1:2 (drug/acid) molar ratio. The resulting solid was dissolved in a 70% (v/v) methanol/ethanol solution and left to evaporate at room temperature. Colorless prism crystals were obtained after a few days upon slow solvent evaporation. The PXRD patterns from the milled and recrystallized samples are presented in Figure S4.

Ethambutol Maleate (ETBMAL). Twenty milligrams of ETB was dissolved in a 70% (v/v) methanol/ethanol solution and stirred at 70 °C. To this solution were added 22.7 mg (0.196 mmol) of maleic acid. Colorless plate crystals were obtained after a few days upon slow solvent evaporation.

Ethambutol Terephthalate (ETBTRP). 32.5 mg (0.195 mmol) of terephthalic acid was dissolved in a 70% (v/v) methanol/ethanol solution and stirred at 70 °C. This solution was filtered and then 20 mg of ETB were added. After a few hours of solvent evaporation colorless prism were grown.

Ethambutol Trichloroacetate (ETBTCA). Twenty milligrams of ETB was dissolved in methanol and stirred at 50 °C. Next, 31.9 mg (0.196 mmol) of trichloroacetic acid was added to the drug solution. Colorless prism crystals were formed after a few days upon slow solvent evaporation.

2.3. Single Crystal Structure Determination (SCSD). The X-ray diffraction data for the ETB salts were collected at room temperature on a Agilent Super Nova diffractometer with CCD detector system equipped with a Mo source ($\lambda = 0.71073$ Å). Data integration, Lorentz-polarization effects, and absorption corrections were performed with CrysAlisPro (version 171.38.43b). Using Olex2,²³ the structure was solved by direct methods, and the model

obtained was refined by full-matrix least-squares on F² (SHELXTL–97).²⁴ All the hydrogen atoms were placed in calculated positions and refined with fixed individual displacement parameters [$U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}$ or $1.5U_{eq}$] according to the riding model (C–H bond lengths of 0.97 Å and 0.96 Å, for methylene and methyl groups, respectively). Molecular representations were generated by Olex2²³ and MERCURY 3.7.²⁵ The CIF files of all structures were deposited in the Cambridge Structural Database²⁶ under the codes CCDC 1529922, 1529925, 1529926, and 1529927. Copies of the data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk.

2.4. Powder X-ray Diffraction (PXRD). PXRD was used to check the purity of all solid forms reported here (Figure S2). Data were recorded at room temperature on Rigaku Ultima IV diffractometer, in Bragg–Brentano reflective geometry, with CuK α radiation ($\lambda = 1.5406$ Å) at 40 kV–30 mA and Ni filter. The diffractograms were acquired in the 3–80° 2 θ range with a step width of 0.02° and a constant counting time of 5 s per step.

2.5. Vibrational Spectroscopy Analysis. Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded on an Alpha Bruker FT-IR spectrophotometer, using KBr pellets, in the range of 4000–400 cm⁻¹, with an average of 64 scans and 2 cm⁻¹ of spectral resolution.

2.6. Thermal Analysis. Differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained with a Shimadzu DSC-60 instrument. The samples (2.5 $\pm$ 0.5 mg) were placed in open aluminum pans and heated from 25 to 400 °C under a N₂. The heating rate was set to 10 °C/min. Thermogravimetric analyses (TGA) were carried out on a Shimadzu TGA-60 thermobalance. Approximately 5.0 mg of the samples was placed in open alumina pans and heated under N₂ flow from 25 to 500 °C at a heating rate of 10 °C/min. The resulting data were analyzed using the Shimadzu TA-60 software (version 2.2).

2.7. Hot Stage Polarized Optical Microscopy (HSM). HSM experiments were performed on a Linkam T95-PE device coupled to a Leica DM2500P optical microscope. Images were recorded using a CCD camera attached to the microscope at time intervals of 10 s. Single crystals of ETB salts were heated at a constant rate of 10 °C/min over a temperature range from 30 °C until the melting of the crystals. Both heating and acquisition of the images were controlled by the Lynksys 32 software package (version 1.96).

3. RESULT AND DISCUSSION

3.1. Structural Description. ETB is a dibasic drug that contains two ionizable amine groups ($pK_{a1} = 6.35$ and $pK_{a2} = 9.35$) on its molecular structure.²⁷ In order to reproduce the primary NH⁺...COO⁻ synthon, only acids containing carboxylic/dicarboxylic groups were selected for the cocrystallization experiments with ETB. The salt formation was investigated using a range of acids with different pK_a values: acid oxalic ($pK_{a1} = 1.25$; $pK_{a2} = 4.27$), maleic acid ($pK_{a1} = 1.83$; $pK_{a2} = 6.07$), trichloroacetic acid ($pK_{a1} = 0.66$), and terephthalic acid ($pK_{a1} = 3.55$; $pK_{a2} = 4.46$).²⁸ The calculated ΔpK_a ($pK_a(ETB) - pK_a(acid)$) values for the reaction of ETB with these acids are presented in Table 1. Even considering the pK_{a2} , these reactions give ΔpK_a values above the ones required by salt formation ($\Delta pK_a > 3$). The only exception was the terephthalic

Table 1. Calculated ΔpK_a Values for the Reaction of ETB with the Dicarboxylic/Carboxylic Acids Studied Here

compound	pK_{a1}/pK_{a2}	$\Delta pK_a = (pK_a(ETB) - pK_a(acid))$	stoichiometry
ethambutol	6.35/9.35		
oxalic acid	1.25/4.27	5.10/5.08	0.5:1 salt
maleic acid	1.83/6.07	4.52/3.28	1:2 salt
terephthalic acid	3.55/4.46	2.80/4.89	1:1 salt
trichloroacetic acid	0.66	5.69	1:2 salt

Table 2. Crystal Data, Data Collection, and Structure Refinement Parameters of ETB Salts

identification code	ETBOXA	ETBMAL	ETBTRP	ETBTCA
empirical formula	C ₇ H ₁₄ NO ₅	C ₁₈ H ₃₂ N ₂ O ₁₀	C ₁₈ H ₃₀ N ₂ O ₆	C ₁₄ H ₂₆ Cl ₆ N ₂ O ₆
formula weight	192.19	174.18	185.22	212.43
temperature (K)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)
crystal system	orthorhombic	orthorhombic	triclinic	monoclinic
space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	5.5391(4)	5.7004(6)	5.7153(2)	11.0388(8)
<i>b</i> (Å)	21.3637(19)	19.2444(19)	8.3805(4)	8.7807(5)
<i>c</i> (Å)	7.9772(5)	20.694(4)	10.7486(5)	12.8540(9)
α (deg)	90	90	70.141(4)	90
β (deg)	90	90	85.652(3)	104.999(7)
γ (deg)	90	90	88.231(4)	90
volume (Å) ³	943.99(12)	2270.1(5)	482.81(4)	1203.47(15)
<i>Z</i> / <i>Z'</i>	2/1/2	4/1	1/1	2/1
ρ_{calc} (g cm ^{−3})	1.352	1.274	1.274	1.466
μ (mm ^{−1})	0.115	0.104	0.095	0.744
<i>F</i> (000)	412.0	932.0	200.0	548.0
reflections collected	5775	10447	9861	11591
independent reflections	1875	3904	3897	5315
unique reflections	1538	2802	3713	4509
<i>R</i> ₁ [<i>I</i> ≥ 2 σ (<i>I</i>)]	0.0468	0.0589	0.0460	0.0501
<i>wR</i> ₂ [all data]	0.1125	0.1507	0.1231	0.1280
goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.086	1.088	1.054	1.045
Flack parameter	0.0(10)	0.1(9)	−0.3(5)	0.02(3)

Table 3. Geometric Parameters of the H-Bonds in the ETB Salts

interaction	D...A (Å)	H...A (Å)	D–H...A (deg)	symmetry code
ETBOXA				
O1–H1...O1A [−]	2.787	1.996	161.72	<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>
O3A–H3AA...O1A [−]	2.465	1.647	175.56	<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>
N1 ⁺ –H1A...O4A [−]	2.956	2.217	140.13	<i>x</i> + 1, + <i>y</i> , + <i>z</i>
N1 ⁺ –H1B...O2A [−]	2.859	1.980	169.12	<i>x</i> + 1, + <i>y</i> , + <i>z</i> + 1
ETBMAL				
O2–H2C...O1	2.765	1.948	174.37	− <i>x</i> + 1/2 + 2, − <i>y</i> + 1, + <i>z</i> − 1/2
O1–H1...O2B [−]	2.763	1.954	168.91	− <i>x</i> + 1/2 + 2, − <i>y</i> + 1, + <i>z</i> + 1/2
N1 ⁺ –H1A...O1B [−]	2.735	1.891	157.65	− <i>x</i> + 1/2 + 1, − <i>y</i> + 1, + <i>z</i> + 1/2
N1 ⁺ –H1B...O3A [−]	2.748	1.858	178.19	− <i>x</i> + 1, + <i>y</i> + 1/2, − <i>z</i> + 1/2 + 1
N2 ⁺ –H2B...O3B [−]	2.783	1.913	165.08	<i>x</i> + 1/2, − <i>y</i> + 1/2 + 1, − <i>z</i> + 1
N2 ⁺ –H2A...O1A [−]	2.785	1.944	156.96	<i>x</i> + 1, + <i>y</i> , + <i>z</i>
C2A–H2AA...O2A [−]	3.384	2.532	152.47	<i>x</i> + 1, + <i>y</i> , + <i>z</i>
C3A–H3AA...O4A [−]	3.479	2.576	163.62	<i>x</i> + 1, + <i>y</i> , + <i>z</i>
C2B–H2BA...O2B [−]	3.541	2.676	155.15	<i>x</i> − 1, + <i>y</i> , + <i>z</i>
C3B–H3BA...O4B [−]	3.412	2.591	147.54	<i>x</i> − 1, + <i>y</i> , + <i>z</i>
ETBTRP				
O1–H1...O3 [−]	2.826	2.109	145.95	<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>
O2–H2C...O5 [−]	2.751	1.957	162.44	<i>x</i> , + <i>y</i> + 1, + <i>z</i> + 1
N1 ⁺ –H1A...O5 [−]	2.744	1.868	167.58	<i>x</i> , + <i>y</i> , + <i>z</i> + 1
N2 ⁺ –H2A...O6 [−]	2.777	1.926	159.46	<i>x</i> − 1, + <i>y</i> , + <i>z</i> + 1
N2 ⁺ –H2B...O3 [−]	2.735	1.854	170.19	<i>x</i> − 1, + <i>y</i> + 1, + <i>z</i>
N1 ⁺ –H1B...O4 [−]	2.761	1.916	157.92	<i>x</i> , + <i>y</i> , + <i>z</i> + 1
C4–H4C...C _g ^a	3.647	2.802	147.35	<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>
ETBTCA				
N1 ⁺ –H1B...O1A [−]	2.780	1.987	147.72	<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>
N2 ⁺ –H2A...O1A [−]	2.862	2.007	160.66	<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>
N2 ⁺ –H2B... O1B [−]	2.747	1.869	168.66	<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>
N1 ⁺ –H1A... O2A [−]	2.796	1.935	162.28	− <i>x</i> + 1, + <i>y</i> + 1/2, − <i>z</i> + 1
O1–H1...O2B [−]	2.801	2.025	157.70	<i>x</i> − 1, + <i>y</i> , + <i>z</i>
O2–H2...O2B [−]	2.798	2.052	151.11	− <i>x</i> + 2, + <i>y</i> − 1/2, − <i>z</i> + 1

^aC_g: C12 → C17.

Figure 1. Crystal packing of ETBOXA along the [100] direction (a). H-bond 1D chain pattern highlighting the $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthon (b) and partial view of packing of the anion chains anions along the [100] direction (c).

acid, for which the ΔpK_a values fell into the range from 0 to 3 (Table 1). At this range, it is not possible to predict the proton transfer between the two species (ETB/acid) and consequently the salt formation, both forms salts and cocrystals being equally likely to occur.

The reaction between ETB and the acids resulted in the following crystal stoichiometries: $[\text{ETBH}_2]^{2+}/\text{OXA}^-$ 0.5:1, $[\text{ETBH}_2]^{2+}/\text{MAL}^-$ 1:2, $[\text{ETBH}_2]^{2+}/\text{TRP}^{2-}$ 1:1, and $[\text{ETBH}_2]^{2+}/\text{TCA}^-$ 1:2 salts. A single deprotonation for the maleic and oxalic acids is expected due to the large differences (>3 units) on their pK_a values. On the other hand, for the terephthalic acid, the first and second ionization constants (expressed by pK_{a1}/pK_{a2} values) are close, which suggests that a double deprotonation could occur concomitantly (Table 1). For all ETB X-ray structures, the identification of the crystalline form was performed measuring the C–O bond length differences ($\Delta D_{\text{C-O}}$).^{7,28} The expected equality of the C–O bond distances ($\Delta D_{\text{C-O}} < 0.03$ Å) was used as an indication of the electronic conjugation and partial double-bond character normally expected after the proton loss. Even so, spectroscopy techniques were also applied to confirm the salt formation.^{7,28} The asymmetric unit (ASU) of ETB salts is depicted in Figure S1 (see Supporting Information). To evaluate if the crystal chosen for the single crystal data collection was representative of the whole sample, PXRD measurements were carried out (Figure S2). A detailed description of each crystal structure is provided below. In Tables 2 and 3, the crystallographic details and the geometric parameters of the H-bonds are summarized, respectively.

Ethambutol Oxalate (ETBOXA, 0.5:1). This salt crystallizes in the orthorhombic space group $P2_12_12$ with $Z' = 1/2$. The ASU (Figure S1a) consists of one oxalate anion partially deprotonated (OXA^-) and a half of ETB cation ($[\text{ETBH}_2]^{2+}$). The $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ cation lies on a 2-fold axis, which gives rise to a 0.5:1 ($[\text{ETBH}_2]^{2+}/\text{OXA}^-$) stoichiometry. The partial deprotonation of the acid could not be proven by analysis of the $\Delta D_{\text{C-O}}$ values (0.049 and 0.086 Å). ETBOXA adopts a two-

dimensional (2D) layered structure defined not only by the expected $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthon, but also by the $\text{OH}\cdots\text{COO}^-$ and $\text{COOH}\cdots\text{COO}^-$ ones. In the crystal structure (Figure 1a), the cations are associated with the OXA^- anions via $\text{N}^+-\text{H}\cdots\text{O}^-$ H-bonds ($\text{N1}^+-\text{H1A}\cdots\text{O4A}^-$, 2.956 Å, 140.1° and $\text{N1}^+-\text{H1B}\cdots\text{O2A}^-$, 2.859 Å, 169.1°) to form one-dimensional (1D) chains along the [001] direction (Figure 1b). Beyond these interactions, the oxalate is also connected to the hydroxyl group of $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ through the $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O1A}^-$ (2.787 Å; 161.7°) H-bond. Furthermore, the anions are also linked to each other via $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}^-$ ($\text{O3A}-\text{H3AA}\cdots\text{O1A}^-$, 2.465 Å, 175.5°) H-bonds, to form two independent 1D chains running in opposite directions along the [100] direction (Figure 1c). In these chains, the OH hydrogens might be shared for both oxygen or even located in the center of the $\text{O}\cdots\text{O}$ atoms. These supramolecular features might explain the differences found for the C–O and C=O bond lengths.^{34,35} These chains are perpendicularly stacked along the [010] direction, as shown in Figure 1a.

Ethambutol Maleate (ETBMAL, 1:2). This salt crystallizes in the orthorhombic space group $P2_12_12$ with one $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ cation and two MAL^- anions in a 1:2 stoichiometry. The ASU containing the ion-pair is shown in Figure S1b. Proton transfer from two acid molecules to a single ETB molecule confirms the salt formation with protonation of both amine groups. However, this finding agrees only with the $\Delta D_{\text{C-O}}$ values calculated for one anion (0.024 Å). The other one shows C–O bonds distances very unequal (1.273/1.215 and 1.281/1.225 Å), which gives $\Delta D_{\text{C-O}}$ (0.058 and 0.056 Å) values above the defined cutoff ($\Delta D_{\text{C-O}} < 0.03$ Å). As expected, the anions display a planar configuration stabilized by the intramolecular $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}^-$ ($\text{O2A}-\text{H4AA}\cdots\text{O4A}^-$, 2.418 Å, 172.7° and $\text{O2B}-\text{H4BA}\cdots\text{O4B}^-$, 2.416 Å, 173.56°) H-bonds. A similar phenomenon as the one found in ETBOXA could explain the single deprotonation of the acid.^{34,35} Despite the unit cell differences (Table 1), this salt has some similarities at supramolecular level with the oxalate salt (see Figures 1a and

2a). The $\text{OH}\cdots\text{COO}^-$ interactions are preserved in both salts, as well as the $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthons. The MAL^- anions act as

Figure 2. Crystal packing of ETBMAL along the $[100]$ direction (a). H-bond 1D chain pattern highlighting the $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthon (b) and partial view of packing of the anion chains along the $[001]$ direction (c).

a bridge, connecting the cations via $\text{N}^+-\text{H}\cdots\text{O}^-$ H-bonds (see Table 2) to form 1D chains along the $[010]$ direction (Figure 2b). The 1D chains are further connected to each other into 2D layers parallel to the (001) plane by H-bonds involving the OH groups ($\text{O2}-\text{H2C}\cdots\text{O}^-$, 2.765 Å, 174.3°) of the drug (Figure 2a). In addition, the anions also make an infinite and independent 1D chain along the $[100]$ direction through $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}^-$ interactions, thus giving rise to a $\text{R}_2^2(7)$ motif (Figure 2c). As observed in the ETOXA structure, these chains run in opposite directions along the $[100]$ and are perpendicularly stacked along the $[001]$ direction (Figure 2a).

Ethambutol Terephthalate (ETBTRP, 1:1). This salt belongs to the triclinic space group $P1$ and its ASU consists of one

$[\text{ETBH}_2]^{2+}$ cation and one TRP^{2-} anion (Figure S1c). Protonation of the two secondary amines of the drug by the diprotic terephthalic acid is confirmed by $\Delta D_{\text{C}-\text{O}}$ values (0.024 and 0.031 Å). The corresponding $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthons lead to the formation of a $\text{R}_4^4(12)$ motif defined by four $\text{N}^+-\text{H}\cdots\text{O}^-$ (see Table 2) H-bonds (Figure 3b). Such motifs further assemble into a 3D arrangement via $\text{O1}-\text{H1}\cdots\text{O3}^-$ (2.826 Å, 145.9°) and $\text{O2}-\text{H2C}\cdots\text{O5}^-$ (2.751 Å, 162.4°) H-bonds (Figure 3a). Beyond these interactions, ETB^+ cations and TRP^- anions are also connected along the $[010]$ direction by nonclassical $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ ($\text{C4}-\text{H4C}\cdots\text{C}_g$, 3.647 Å, 147.3°) interactions (Figure 3c).

Ethambutol Trichloroacetate (ETBTCA, 1:2). This salt was solved and refined in the monoclinic space group $P2_1$ with one $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ cation and two TCA^- anions (A and B) in the ASU (Figure S1d). Proton transfer from two monoprotic acids ($\Delta D_{\text{C}-\text{O}} = 0.035$ Å, $\Delta D_{\text{C}-\text{O}} = 0.005$ Å) to a single ETB molecule resulted in protonation of both N1 and N2 amine atoms and in the formation of $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthons. However, as expected from structures with $Z' > 1$, each TCA^- anion has its own supramolecular pattern.²⁹ While the anion A is associated with both amine groups by the bifurcated $\text{N1}^+-\text{H1B}\cdots\text{O1A}^-$ (2.780 Å, 147.7°) and $\text{N2}^+-\text{H2A}\cdots\text{O1A}^-$ (2.861 Å, 160.6°) interactions, the anion B binds only to one via the $\text{N2}^+-\text{H2B}\cdots\text{O1B}^-$ interaction (Figure 4b). These ion-pairs propagate along the $[001]$ direction through $\text{O1}-\text{H1}\cdots\text{O2B}^-$ (2.801 Å, 160.6°) H-bonds (Figure 4c). The overall three-dimensional (3D) packing is characterized by the presence of a hydrophilic cavity established by TCA^- anions running along the ac plane (Figure 4a).

ETB is a flexible molecule and therefore can adopt different conformations by rotation of $\text{C}-\text{C}$ and $\text{C}-\text{N}$ bonds. In Figure S3 is presented the overlay of the five $[\text{ETBH}_2]^{2+}$ cations (one arising from the (S,S) -EDH salt and the other ones from the salts studied here), obtained by the superimposing of N1, C5,

Figure 3. View of ETBTRP crystal packing along the $[100]$ (a). The $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthons giving rise to a $\text{R}_4^4(12)$ motif (b). These motifs are further assembled into a 3D packing by $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}^-$ and $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ interactions (c).

Figure 4. View of ETBTCA packing along the *ac* plane showing the hydrophilic channels in which the chlorine atoms are inserted (a). The ion-pairs formed by the $N^+-H\cdots O^-$ H-bonds (b) are extended into a 1D chain via $O-H\cdots O^-$ H-bonds along the [001] direction (c).

Table 4. Selected Torsion Angles for (S,S)-EDH and ETB Salts

	(S,S)-EDH ^{a,b}	ETBOXA ^{a,b}	ETBMAL	ETBTRP	ETBTCA
N1–C2–C1–O1	58.6(7)	76.0(3)	−61.7(4)	−70.2(4)	54.2(6)
N1–C2–C3–C4	168.6(5)	−163.9(3)	−170.4(5)	−178.0(4)	−161.7(7)
N2–C8–C7–O2	58.6(7)	76.0(3)	−56.9(6)	−80.1(4)	−57.9(6)
N2–C8–C9–C10	168.6(5)	−163.9(3)	−168.4(5)	−170.9(3)	−164.4(5)
N1–C5–C6–N2	171.0(4)	172.0(2)	−175.5(3)	177.1(3)	78.1(5)

^aN1–C2–C1–O1 = N2–C8–C7–O2. ^bN1–C2–C3–C4 = N2–C8–C9–C10.

C6, and N2 atoms. The cations differ in the spatial orientation of the ethyl and hydroxyl groups, which is implicit by the different values founded for the N1–C2–C1–O1 and N1–C2–C3–C4 torsion angles (Table 4). For ETBTCA, it is also observed a significant variation on the value of the respective N1–C5–C6–N2 torsion angle. Such deviation could be a consequence of the bifurcated $N^+-H\cdots O^-$ H-bonds presented only in its structure.

3.2. Spectroscopy Analysis. FT-IR spectra of ETB free base and its salts are presented in Figure 5. Analysis and band assignments were performed using the spectroscopic data available for the carboxylic/dicarboxylic acids and ETB solid forms.^{22,30,31} Salt formation was identified by evaluation of changes in the vibrational modes of specific functional groups of the drug and the salt formers.^{32,33} After the salt formation, the strong C=O absorption band ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) of COOH group should disappear giving rise to two bands in the FT-IR spectrum. These two bands are associated with the antisymmetric ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) and symmetric ($\sim 1400\text{ cm}^{-1}$) stretching vibrations of COO^- group and can be used as a fingerprint to check the acid deprotonation. Consequently, this should also affect the NH vibration modes of the secondary amine groups of ETB. According to the literature, secondary amine shows only one NH stretch ($3300\text{--}3150\text{ cm}^{-1}$), while its salt, or protonated form ($\cdot\text{NH}_2^+$), shows NH stretches in the region of $3100\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$. In the FT-IR spectrum of ETB free base, the NH stretching vibration appears as a single band at

Figure 5. FT-IR spectra of ETB free base (black) and ETB salts: ETBOXA (blue), ETBMAL (red), ETBTRP (violet), and ETBTCA (green).

3270 cm^{-1} . However, due to its protonation, bands related to the NH_2^+ stretching modes are observed shifted to lower wavenumbers in the salts spectra: 3000 cm^{-1} (ETBOXA), 3004 cm^{-1} (ETBMAL), 2977 cm^{-1} (ETBTRP), and 2983 cm^{-1} (ETBTCA). With respect to the acids, it is worth mentioning that the partial deprotonation of the oxalic and maleic acids could be identified by the presence of bands at 3447 and 3350 (O-H stretching) and 1702 and 1698 cm^{-1} (C=O

Figure 6. DSC and TGA curves of ETB salts: (a) ETBOXA, (b) ETBMAL, (c) ETBTRP, and (d) ETBTCA.

stretching), respectively. The complete deprotonation of the acid molecules in the ETBTRP and ETBTCA structures is confirmed by the presence of bands arising only from the antisymmetric and symmetric stretching of COO^- groups (bands assigned from 1620 to 1330 cm^{-1}).

3.3. Thermal Characterization. DSC curves show distinct melting points for all salts; however for ETBOXA and ETBTRP, the melting temperatures are found to be quite close (Figure 6). DSC curves of ETBOXA and ETBTRP are characterized by an endothermic melting peak at 204.1 °C ($T_{\text{onset}} = 200.04$ °C) and 207.43 °C ($T_{\text{onset}} = 206.29$ °C), respectively. These values are in agreement with the TGA curves, since any mass loss was observed for these salts in the range of 50–208 °C. The first mass losses in the TGA curves of ETBOXA (210–240 °C) and ETBTRP (209–263 °C) were attributed to the beginning of sample decomposition.

The melting point of ETBMAL can be associated with a sharp endothermic peak observed at 152.24 °C ($T_{\text{onset}} = 151.08$ °C) in the DSC curve. This salt is thermally stable up to ~176 °C; after this temperature, a gradual mass loss can be observed in the TGA curve. In comparison with the other salts reported here, ETBTCA is the one with the lowest melting temperature. DSC curve of ETBTCA showed an endothermic peak at 126.23 °C ($T_{\text{onset}} = 125.26$ °C), which was assigned to the melting process.

The interpretation of DSC/TGA results were successfully confirmed by HSM experiments (Figure 7). According to the HSM images, a single-crystal of ETBOXA, ETBMAL, ETBTRP, and ETBTCA starts to melt at 204, 154, 200, and 123 °C, respectively. As a result, it is worth mentioning two points: (1) these salts are thermally more stable than the corresponding ETB free base (melting point of ~88 °C), and (2) in all cases there is no evidence of a phase transition.

3.4. Hygroscopicity Measurements. Hygroscopicity of ETB salts were evaluated by thermogravimetric analysis. First,

Figure 7. Hot-stage microscopy images of ETBOXA (a), ETBMAL (b), ETBTRP (c), and ETBTCA (d) single crystals.

the samples were dried in an oven and then placed in a desiccator. Distilled water was employed to maintain the relative humidity (100% RH) inside the desiccator. The time that each salt was kept inside the desiccator can be related to how fast it absorbs water. Therefore, the more hygroscopic the salt is, the more quickly it absorbs water, and the less time it will be on the desiccator. The TGA curves were used to check the amount of water adsorbed, since the mass losses before 150 °C were due to the content of water molecules previously adsorbed by the dried samples.

As expected, (S,S)-EDH proved to be very hygroscopic. After 1 h in a humid environment, the hydrochloride form had a mass loss of about 25% (Figure 8a). Moreover, this salt became liquid when it remained more than 8 h in the desiccator (Figure 8d). However, ETBOXA was shown to be nonhygroscopic,

Figure 8. TGA curves of ETB salts after 1 h (a), 6 h (b), and 12 h (c) in humid atmosphere. Images of (S,S)-EDH after 8 h (d) and ETBOXA after 48 h (e) in humid atmosphere.

even after 48 h in the desiccator (Figure 8e). This result suggests that the packing arrangement of ETBOXA molecules is so cohesive that it would avoid penetration by water molecules. For the other salts (ETBMAL, ETBTRP, and ETBTCA), the TGA curves (Figure 8a–c) show significant mass losses owing to their hygroscopic nature.

4. CONCLUSIONS

Within our continuing efforts to develop new solid forms of anti-tuberculosis drugs, in this work we presented four salts of ETB obtained by the reaction with carboxylic/dicarboxylic (oxalic, maleic, terephthalic, and trichloroacetic) acids. These salts were prepared with the aim to get a non-hygroscopic solid form of ETB to reduce the influence of the high hygroscopicity of (S,S)-EDH which is responsible for the degradation of isoniazid and rifampicin in the FDC tablet used in the TB treatment. Analysis of the crystal structures (and packing) revealed that the ion-pairs are stabilized by the expected $\text{NH}^+\cdots\text{COO}^-$ synthons, and that in all cases the two amine groups of the drug are protonated. Similarly, their salt natures were confirmed by the appearing of two bands in the FT-IR spectra ($3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) related to the NH_2^+ stretching modes.

The salts were found to melt between 123 and 204°C , i.e., above the melting temperature of ETB ($\sim 88^\circ\text{C}$). For all salts, DSC curves showed only a single melting endothermic peak, which rules out any phase transition in this temperature range. In addition, with the exception of the oxalate salt, all the other ones are shown to be hygroscopic. The reason for this is not totally clear, but it seems to be related to the differences in the supramolecular arrangements, mainly to the formation of $\text{OXA}^-\cdots\text{OXA}^-$ infinite chains through $\text{O}\cdots\text{H}\cdots\text{O}^-$ H-bonds that give rise to the formation of a more compact 3D crystal packing. This supramolecular feature might explain the non-

hygroscopic nature of the ETBOXA salt. Interestingly, the oxalate salt was also the one with higher melting temperature (204°C).

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.cgd.7b00144.

PXRD patterns, ORTEP view of the asymmetric units, crystallographic data, and figures and tables related to single crystal studies for ethambutol salts (PDF)

Accession Codes

CCDC 1529922 and 1529925–1529927 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: javiere@ifsc.usp.br.

ORCID

Javier Ellena: 0000-0002-0676-3098

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Brazilian funding agencies FAPESP (L.F.D. Grant 15/25694-0 and P.S.C.-Jr. Grant 12/05616-7), CAPES (C.C.M), and CNPq for financial support. The authors would also like to thank Dra. Renata Diniz and

Dra. Charlane C. Correa (Federal University of Juiz de Fora) for allowing access to the X-ray diffraction facilities.

■ REFERENCES

- (1) Wouters, J.; Quéré, L. *Pharmaceutical Salts and Co-crystals*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 2011.
- (2) Berge, S. M.; Bighley, L. D.; Monkhouse, D. C. J. *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 1–19.
- (3) Babu, N. J.; Nangia, A. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 2662–2679.
- (4) Serajuddin, A. T. M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 603–616.
- (5) De Melo, C. C.; Da Silva, C. C. P.; Pereira, C. C. S. S.; Rosa, P. C. P.; Ellena, J. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *81*, 149–156.
- (6) Carvalho, P. S.; De Melo, C. C.; Ayala, A. P.; Da Silva, C. C. P.; Ellena, J. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 1543–1549.
- (7) Da Silva, C. C. P.; Pepino, R.; de, O.; De Melo, C. C.; Tenorio, J. C.; Ellena, J. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 4383–4393.
- (8) Heinrich, S.; Wermuth, C. Wiley InterScience, 2008; p 388.
- (9) Bhutani, H.; Singh, S.; Jindal, K. C.; Chakraborti, A. K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 892–899.
- (10) Singh, S.; Mohan, B. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2003**, *7*, 298–303.
- (11) Bastos, M. L.; Hussain, H.; Weyer, K.; Garcia-Garcia, L.; Leimane, V.; Leung, C. C.; Narita, M.; Penã, J. M.; Ponce-de-Leon, A.; Seung, K. J.; Shean, K.; Sifuentes-Osornio, J.; Van der Walt, M.; Van der Werf, T. S.; Yew, W. W.; Menzies, D. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, 1364–1374.
- (12) WHO; The World Health Organization, 4th ed. 2010, 1–160.
- (13) Bastos, M. L.; Hussain, H.; Weyer, K.; Garcia-Garcia, L.; Leimane, V.; Leung, C. C.; Narita, M.; Penã, J. M.; Ponce-de-Leon, A.; Seung, K. J.; Shean, K.; Sifuentes-Osornio, J.; Van der Walt, M.; Van der Werf, T. S.; Yew, W. W.; Menzies, D.; Hong-min, W.; Xiao-Hong, Z. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 1285–1286.
- (14) Lima, P. C.; Albert, A. L. M.; Leandro, K. C. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2015**, *74*, 190–199.
- (15) Part 6 rifampicin/isoniazid/pyrazinamide/ethambutol 150 mg/75 mg/400 mg/275 mg film-coated tablets Part 6 rifampicin/isoniazid/ pyrazinamide/ethambutol 150 mg/75 mg/400 mg/275 mg film-coated tablets.
- (16) Bai, G.-Y.; Zhang, C.-F.; Zhang, Y.-C.; Zeng, T.; Li, J.-S. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, o2173–o2174.
- (17) Bai, G. Y.; Zhang, C. F.; Simpson, J.; Ning, H. S.; Peng, H. W. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, o5580–o5581.
- (18) Godfrey, R.; Hargreaves, R.; Hitchcock, P. B. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **1992**, *48*, 79–81.
- (19) Bai, G.-Y.; Ning, H. S.; Simpson, J.; Qin, X. Y.; Li, N. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, 4567–4568.
- (20) Faria, A. F.; Marcellos, L. F.; Vasconcelos, J. P.; De Souza, M. V. N.; Júnior, A. L. S.; Do Carmo, W. R.; Diniz, R.; De Oliveira, M. A. L. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 867–874.
- (21) Cherukuvada, S.; Nangia, A. *CrystEngComm* **2012**, *14*, 7840.
- (22) Cherukuvada, S.; Nangia, A. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13*, 1752–1760.
- (23) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339–341.
- (24) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122.
- (25) Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G. P.; Taylor, R.; Towler, M.; Van De Streek, J. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453–457.
- (26) Allen, F. H.; Motherwell, W. D. S. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **2002**, *58*, 407–422.
- (27) *Tuberculosis* **2008**, *88*, 102–105.10.1016/S1472-9792(08)70008-8
- (28) Childs, S. L.; Stahly, G. P.; Park, A. *Mol. Pharmaceutics* **2007**, *4*, 323–338.
- (29) Steed, J. W. W. *CrystEngComm* **2003**, *5*, 169–179.
- (30) Giffin, G. A.; Boesch, S.; Bopege, D. N.; Powell, D. R.; Wheeler, R. A.; Frech, R. J. *Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15914–15920.
- (31) Heacock, R. A.; Marion, L. *Can. J. Chem.* **1956**, *34*, 1782–1795.
- (32) Heinz, A.; Strachan, C. J.; Gordon, K. C.; Rades, T. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 971–988.
- (33) Lin, H. L.; Huang, Y. T.; Lin, S. Y. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2016**, *123*, 2345–2356.
- (34) Steiner, T. *Chem. Commun.* **1999**, *22*, 2299–2300.
- (35) Bartoszak, E.; Dega-Szafran, Z.; Jaskólski, M.; Szafran, M. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1995**, *91*, 87–92.

APÊNDICE C – Novel Isoniazid cocrystals with aromatic carboxylic acids: crystal engineering, spectroscopy and thermochemical investigations

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/molstruc>

Novel Isoniazid cocrystals with aromatic carboxylic acids: Crystal engineering, spectroscopy and thermochemical investigations

Luan F. Diniz ^a, Matheus S. Souza ^a, Paulo S. Carvalho Jr. ^a, Cecilia C.P. da Silva ^a,
Richard F. D'Vries ^{a, b}, Javier Ellena ^{a, *}

^a Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, Cali, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2017

Received in revised form

27 September 2017

Accepted 28 September 2017

Available online 30 September 2017

Keywords:

Tuberculosis

Isoniazid

Cocrystals

Crystal engineering

X-ray diffraction

ABSTRACT

Four novel cocrystals of the anti-tuberculosis drug Isoniazid (INH), including two polymorphs, with the aromatic carboxylic acids *p*-nitrobenzoic (PNBA), *p*-cyanobenzoic (PCNBA) and *p*-aminobenzoic (PABA) were rationally designed and synthesized by solvent evaporation. Aiming to explore the possible supramolecular synthons of this API, these cocrystals were fully characterized by X-ray diffraction (SCXRD, PXRD), spectroscopic (FT-IR) and thermal (TGA, DSC, HSM) techniques. The cocrystal formation was found to be mainly driven by the synthons formed by the pyridine and hydrazide moieties. In both INH–PABA polymorphs, the COOH acid groups are H-bonded to pyridine and hydrazide groups giving rise to the acid...pyridine and acid...hydrazide heterosynthons. In INH–PNBA and INH–PCNBA cocrystals these acid groups are only related to the pyridine moiety. In addition to the structural study, supramolecular and Hirshfeld surface analysis were also performed based on the structural data. The cocrystals were identified from the FT-IR spectra and their thermal behaviors were studied by a combination of DSC, TGA and HSM techniques.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Multicomponent crystals, e.g. salts and cocrystals, are important technology topics in pharmaceutical science [1–3]. Cocrystals have been attracting scientific and pharmaceutical interest in the last decades due to their potential ability to modify important properties of active pharmaceutical ingredients (APIs) such as solubility, dissolution rate, bioavailability, hygroscopicity, and/or thermal stability. In addition, cocrystal formation does not lead to changes in the nature of the API, unlike the situation observed during salt formation, where the API must protonate or be protonated [3–7]. Since cocrystals are the result of a supramolecular synthesis and their physicochemical and pharmacokinetic properties are not predictable, they can be considered a novel and non-obvious invention. Consequently, cocrystals can be patented if they show some utility [4,8,9].

Isoniazid (INH, Scheme 1), pyridine-4-carbohydrazide, has been the subject of many scientific studies, not only due to its

therapeutic properties, but also because of its ability to form a variety of solid forms [10–14]. This API is a bacteriostatic stable drug widely used in combination with Rifampicin (RMP), Pyrazinamide (PZA) and Ethambutol (ETB) as a fixed-dose combination (FDC) tablet in the first phase of tuberculosis (TB) treatment [15–17]. The use of four drugs in a single tablet aims to reduce the risk of drug-resistance and simplify the TB treatment [18]. Although INH is stable over long time periods at ambient temperature as well as in accelerated stability conditions (40 °C, 75% RH) [19,20], its main drawback is that, in the FDC tablet formulations, INH undergoes degradation due to drug-drug interactions [21,22]. The presence of other anti-TB drugs, such as PZA and ETB, were found to further accelerate the INH degradation [23]. Its limited stability in the FDC formulation has spurred the design of new solid forms, such as salts and cocrystals, in order to enhance its pharmaceutical behavior and solve its stability issue.

In the present study, pharmaceutical cocrystals of INH were synthesized by a crystal engineering approach with three aromatic carboxylic acids: *p*-nitrobenzoic acid (PNBA), *p*-cyanobenzoic acid (PCNBA), and *p*-aminobenzoic acid (PABA) (Scheme 1). In order to expand the range of new solid forms of INH available, an extensive amount of structures has been reported in the last few years

* Corresponding author.

E-mail address: javiere@ifsc.usp.br (J. Ellena).

Scheme 1. Molecular structure of INH and coformers used in this study.

[24–29]. Recently, Trivedi et al. [30] reported a series of two salts and two cocrystals of INH with three coformers (2,5-dihydroxybenzoic, 3-aminobenzoic, and phthalic acids). Following this approach, in a previous, but recent study [31], our group synthesized and depicted four INH inorganic salts: a hydrobromide, a nitrate, an anhydrous sulfate, and an hemihydrate sulfate. Within this framework, the novel cocrystals described herein were planned with the aim of exploring the diversity of the supramolecular syntheses of this API, and provide insights that might be useful for the future synthesis of INH crystalline structures with improved stability properties. The characterization of these cocrystals was carried out using Single-Crystal and Powder X-ray Diffraction (SCXRD, PXRD), Hirshfeld Surface (HS) Analysis, Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Hot-Stage Microscopy (HSM) and Fourier Transform Infrared (FT-IR).

2. Experimental details

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich and used without any further purification. Analytical grade solvents were used for the crystallization experiments. Cocrystals were crystallized via the technique of slow solvent evaporation.

2.1. Supramolecular synthesis of isoniazid cocrystals

- a *INH–PNBA*. Isoniazid (40 mg, 0.292 mmol) and *p*-nitrobenzoic acid (48.6 mg, 0.291 mmol) were dissolved in 5 mL of ethanol and heated at 70 °C for 30 min. Colorless plates of the 1:1 INH–PNBA cocrystal were obtained at room temperature.
- b *INH–PCNBA*. Isoniazid (40 mg, 0.292 mmol) and *p*-cyanobenzoic acid (42.8 mg, 0.291 mmol) were dissolved in a hot (70 °C) ethanol/acetonitrile (2:1 mixture) solution. Colorless plates of 1:1 INH–PCNBA cocrystal were obtained at room temperature.
- c *INH–PABA*. Isoniazid (40 mg, 0.292 mmol) and *p*-aminobenzoic acid (80 mg, 0.584 mmol) were dissolved in a hot (70 °C) solution of ethanol/acetonitrile (2:1 mixture). Two polymorphic forms of 1:2 INH–PABA cocrystals arose: Form I at 25 °C and Form II at 5 °C. Both polymorphic forms crystallized with prismatic habits.

2.2. Single crystal structure determination (SCSD)

Data collection of the INH cocrystals were performed at room temperature on an Agilent Super Nova diffractometer with CCD

detector system equipped with a Mo source ($\lambda = 0.71073$ Å). Data integration, Lorentz-polarization effects and absorption corrections were performed with CrysAlisPro [32] (version 171.38.43 b). Using the Olex2 program [33], the structure was solved by direct methods and the model obtained was refined by full-matrix least squares on F^2 (SHELXTL–97) [34]. All C–H hydrogen atoms were placed in calculated positions and refined with fixed individual displacement parameters [$U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}$] according to the riding model (C–H bond lengths of 0.93 Å) [34]. Mixed models were used for the treatment of hydrogen atoms attached to N and O atoms. Molecular representations were generated by Olex2 [33] and MERCURY 3.9 [35]. The CIF files of all structures were deposit in the Cambridge Structural Data Base [36] under the codes CCDC 1554637, 1554639, 1554640 and 1554641. Copies of the data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk.

2.3. Powder X-ray diffraction (PXRD)

Data were recorded at room temperature on a Rigaku Ultima IV diffractometer, in Bragg-Brentano reflective geometry, with CuK α radiation ($\lambda = 1.5406$ Å) at 40 kV – 30 mA and Ni filter. The diffractograms were acquired in the 3–80° 2θ range with a step width of 0.02° and a constant counting time of 5 s per step.

2.4. Hirshfeld Surfaces (HS) and derived fingerprint plots

Hirshfeld surface analysis was used for the examination of the different types of interactions within the crystal structures of the INH cocrystals, showing the areas susceptible to weak and strong interactions. The 2-dimensional fingerprint plots, derived from the 3-dimensional d_{norm} Hirshfeld surfaces were generated using the software Crystal Explorer 3.1 [37] and both are illustrated in Fig. S2. Fig. S3 shows the comparative percentage in bars of the different types of contacts occurring in the INH cocrystals.

2.5. Vibrational spectroscopy

Fourier Transform infrared (FT-IR) spectra were recorded on a Bruker Vertex 70v spectrometer equipped with ATR accessory in the range of 4000 – 400 cm^{-1} , with an average of 256 scans and 2 cm^{-1} of spectral resolution.

2.6. Thermal analysis

Thermogravimetric Analyses (TGA) were carried out on a Shimadzu TGA-60 thermobalance. Approximately 5.0 mg of the samples were placed in open alumina pans and heated under N_2 flow from 25 to 600 °C at a heating rate of 10 °C/min. The Differential Scanning Calorimetry (DSC) was performed on Shimadzu DSC-60 instrument. The samples (2.5 ± 0.5 mg) were placed in open aluminum pans and heated from 25 to 400 °C under a N_2 atmosphere. The heating rate was set to 10 °C/min. According to TGA data, these experiments have been performed up to before the degradation temperature of each compound. The resulting data were analyzed using the Shimadzu TA-60 software (version 2.2).

2.7. Hot-Stage polarized optical microscopy

All Hot-Stage Microscopy (HSM) examinations were performed on a Linkam T95-PE device coupled to a Leica DM2500P optical microscope. Images were recorded using a CCD camera attached to the microscope at time intervals of 10 s. Single crystals of INH cocrystals were heated at a constant rate of 10 °C/min over a temperature range from 30 °C until the melting or the decomposition of the crystals. Both heating and acquisition of the images

Fig. 1. Main Hydrogen Bonding Homo and Heterosynths in INH cocrystal structures.

Table 1
Calculated ΔpK_a between INH and carboxylic acid cofomers.

Compound	pK_a	$\Delta pK_a = (pK_a(\text{INH}) - pK_a(\text{acid}))$
Isoniazid	3.50	–
<i>p</i> -nitrobenzoic acid	3.43	0.07
<i>p</i> -cyanobenzoic acid	3.55	–0.05
<i>p</i> -aminobenzoic acid	2.38	1.12

were controlled by the Lynksys 32 software package (version 1.96).

3. Result and discussion

3.1. Structural description

INH is a weak base that contains two main functional groups in its structure: hydrazide and pyridine ring. Both groups are excellent hydrogen bond acceptors to form acid...pyridine ($\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$) and acid...hydrazide ($\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{hydrazide}}$) heterosynths. Moreover, the hydrazide group has also good hydrogen bond acceptor atoms (O and N) as well as donors which could generate

hydrazide...hydrazide homosynthon. Fig. 1 shows the main hydrogen bonding supramolecular synthons (homo and hetero-synths) found to INH cocrystals with carboxylic acids. In a survey of the Cambridge Structural Database (CSD) [36], 39 INH cocrystals structures with cofomers containing COOH groups have been identified showing that they represent about 40% of all INH structures deposited in CSD. Among the synthons represented in Fig. 1, the acid...pyridine (I) is the most recurrent being present in approximately 87% of the structures. In turn, the homosynths II, III and IV are found in 18%, 36% and 18%, respectively. Finally, the heterosynths V and VI appear in 8% and 31%, respectively, in the INH structures with carboxylic acids reported to date. In order to reproduce these acid...pyridine and acid...hydrazine heterosynths, and based on the pK_a value of pyridine nitrogen of INH ($pK_a = 3.50$) [38], only aromatic acids containing COOH groups that agree with the “ pK_a rule” for cocrystal, *i. d.* $\Delta pK_a = pK_a(\text{base}) - pK_a(\text{acid}) < 0$ or between 0 and 3 [39,40], were selected for the cocrystallization experiments. The cocrystal formation was investigated using three acids with the following pK_a values: *p*-nitrobenzoic acid ($pK_a = 3.43$), *p*-cyanobenzoic acid ($pK_a = 3.55$) and *p*-aminobenzoic acid ($pK_a = 2.38$). As result, INH–PNBA, INH–PCNBA and two polymorphs of INH–PABA (Form I and II) were obtained. Table 1 presents the calculated ΔpK_a values between INH and their respective carboxylic acid cofomers.

Cocrystal formation was clearly identified by measuring the C–O bond length differences of the carboxyl groups in the acid molecules ($\Delta D_{\text{C-O}}$). It is stated that if this difference is smaller than 0.03 Å, the salt formation is expected. On the other hand, if this variation is high (>0.08 Å), then a cocrystal is formed [40,41]. The $\Delta D_{\text{C-O}}$ values founded for all INH structures depicted here are higher than 0.08 Å (INH–PNBA = 0.098 (1) Å; INH–PCNBA = 0.108 (2) Å; INH–PABA-I = 0.104 (5) and 0.115 (5); INH–PABA-II = 0.110 (2) and 0.102 (2)), which means that the C–O distances are not symmetrical, as in the carboxylate anions, evidencing a cocrystal formation. Fig. S1 shows the asymmetric unit (ASU) of INH cocrystals. A detailed description of each crystal structure is provided below. The crystallographic data and the geometric parameters of the H-bonds are summarized in Tables 2 and 3, respectively.

3.1.1. INH–PNBA

This cocrystal crystallized in the triclinic $P\bar{1}$ space group. The asymmetric unit (ASU) of this cocrystal (Fig. S1a) consists of one

Table 2
Crystallographic parameters of INH cocrystals.

Identification code	INH–PNBA	INH–PCNBA	INH–PABA-I	INH–PABA-II
Empirical formula	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$	$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$	$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$
Formula weight	304.27	284.28	411.42	411.42
Temperature (K)	293 (2)	293 (2)	293 (2)	293 (2)
Crystal system	Triclinic	Triclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P2_1$	$P2_1/c$
a (Å)	7.0573 (5)	7.0549 (5)	12.9772 (10)	16.2167 (5)
b (Å)	7.1868 (6)	7.1844 (6)	5.0685 (3)	5.08592 (11)
c (Å)	14.9643 (8)	15.2175 (12)	16.0931 (11)	25.4781 (6)
α (°)	91.375 (6)	81.660 (6)	90	90
β (°)	98.592 (5)	81.845 (6)	108.818 (8)	107.990 (3)
γ (°)	116.362 (7)	63.035 (8)	90	90
Volume (Å ³)	668.92 (9)	677.64 (10)	1001.94 (12)	1998.62 (9)
Z/Z'	2/1	2/1	2/1	4/1
ρ_{calc} (g cm ^{–3})	1.511	1.393	1.364	1.367
μ (mm ^{–1})	0.119	0.102	0.101	0.101
Reflections collected	11408	14281	11619	28914
Independent reflections	2922	2982	4042	4726
Unique reflections	2189	2444	3774	3780
R_1 [$I \geq 2\sigma(I)$]	0.0509	0.0452	0.0485	0.0528
wR_2 [all data]	0.1453	0.1308	0.1247	0.1536
Goodness-of-fit on F^2	1.047	1.081	1.059	1.093

Table 3
Geometric parameters of the H-bonds in the INH cocrystals.

Interaction	D...A(Å)	H...A(Å)	D–H...A(°)	Symmetry Code
INH-PNBA				
O2–H2...N2	2.658 (2)	1.838 (1)	177.13 (11)	x,y,z
N3–H3A...O1	3.021 (3)	2.476 (2)	121.97 (10)	x,y,z
N1–H1...N3	2.911 (3)	2.168 (2)	144.46 (15)	−x + 2, −y + 1, −z + 2
N3–H3B...O5	3.208 (3)	2.467 (2)	144.66 (16)	x + 2, +y + 1, +z + 1
C3–H3...O3	3.222 (2)	2.577 (1)	126.83 (13)	x,y,z
INH-PCNBA				
O2–H2A...N2	2.658 (2)	1.818 (1)	174.42 (12)	x,y,z
N1–H1...N3	2.981 (2)	2.259 (1)	141.47 (15)	−x, −y + 2, −z + 2
N3–H3B...N4	3.270 (3)	2.515 (2)	135.85 (13)	−x + 1, −y + 2, −z + 1
N3–H3A...O1	3.150 (2)	2.295 (1)	170.81 (11)	x,y,z
C10–H10...N3	3.610 (3)	2.718 (2)	168.08 (13)	X + 1, +y, +z − 1
C3–H3...O3	3.319 (3)	2.690 (2)	125.64 (15)	x,y,z
C4–H4...O1	3.353 (3)	2.599 (2)	138.49 (13)	x + 1, +y, +z
C12–H12...O3	3.236 (2)	2.493 (2)	137.01 (15)	x + 1, +y, +z
INH-PABA-I				
O1–H2A...N2	2.731 (4)	1.916 (3)	171.76 (19)	x,y,z
O4–H4C...N3	2.819 (4)	2.190 (5)	148.96 (16)	x,y,z
N1–H1...O1	2.851 (3)	2.128 (2)	141.49 (19)	x, +y − 1, +z
N5–H5A...O3	2.992 (5)	2.180 (3)	155.81 (21)	−x + 1, +y − 1/2, −z + 2
N3–H3B...O1	3.218 (5)	2.454 (4)	143.34 (17)	−x + 1, +y − 1/2, −z + 2
N3–H3A...O5	3.091 (4)	2.239 (3)	169.46 (23)	x, +y + 1, +z
N4–H4A...N4	3.201 (5)	2.396 (4)	154.27 (26)	−x, +y − 1/2, −z
N4–H4B...O5	2.998 (5)	2.170 (4)	162.12 (20)	−x + 1, +y + 1/2, −z + 1
C4–H4...O2	3.365 (6)	2.581 (3)	142.27 (28)	−x + 1, +y − 1/2, −z + 1
C3–H3...O3	3.499 (4)	2.624 (3)	156.96 (24)	x, +y + 1, +z
C12–H12...O5	3.358 (4)	2.608 (3)	138.10 (21)	−x + 1, +y + 1/2, −z + 1
C17–H17...O3	3.298 (5)	2.560 (3)	136.52 (20)	−x + 1, +y − 1/2, −z + 2
INH-PABA-II				
O2–H2A...N2	2.729 (3)	1.916 (2)	171.55 (13)	x,y,z
O4–H4A...N3	2.725 (3)	2.004 (2)	146.48 (13)	x,y,z
N1–H1...O1	2.878 (2)	2.164 (1)	140.12 (10)	x, +y − 1, +z
N3–H3A...O5	3.030 (2)	2.170 (2)	173.37 (12)	x, +y − 1, +z
N5–H5A...N4	3.179 (3)	2.366 (2)	157.76 (13)	x + 1, −y + 1/2 + 1, +z − 1/2
N4–H4B...N5	3.168 (3)	2.348 (2)	159.56 (13)	x − 1, −y + 1/2 + z + 1/2
N5–H5B...O3	2.954 (2)	2.116 (2)	159.51 (14)	−x + 2, −y + 1, −z + 1
N3–H3B...O1	3.177 (2)	2.356 (2)	153.46 (13)	−x + 2, −y + 1, −z + 1
N4–H4C...O5	2.968 (2)	2.105 (2)	166.68 (12)	−x + 1, −y + 1, −z + 1
C12–H12...O5	3.461 (2)	2.738 (2)	135.25 (12)	−x + 1, −y + 1, −z + 1
C19–H19...O3	3.274 (2)	2.562 (2)	133.60 (12)	−x + 2, −y + 1, −z + 1
C4–H4...O3	3.519 (3)	2.633 (2)	159.39 (14)	x, +y + 1, +z

INH molecule and one *p*-nitrobenzoic acid (PNBA) molecule. The cocrystal was formed through O2–H2...N2 (2.658 (2) Å, 177.13 (11)°) and C3–H3...O3 (3.222 (2) Å, 126.83 (13)°) H-bonds involving the hydroxyl groups of PNBA and the pyridine one of INH to form an acid...pyridine heterosynthon (COOH...N_{arom}). In the cocrystal, INH molecules are arranged into chains along [100] direction by N1–H1...N3 (2.911 (3) Å, 144.46 (15)°) and N3–H3A...O1 (3.021 (3) Å, 121.97 (10)°) interactions that results in the $R_2^2(6)$ and $R_2^2(10)$ motifs, respectively (Fig. 2c). As result, INH and PNBA molecules are alternately present in the *ac* plane. Along the [010] direction, the PNBA molecules are associated to a INH chain by N3–H3B...O5 (3.208 (3) Å, 144.66 (16)°) H-bonds forming a layered structure (Fig. 2b). As expected, the crystal packing is stabilized by stacking of layers along the [010] direction through π – π stacking interactions between the INH and PNBA rings with intercentroid distance of 3.740 (3) Å (Fig. 2b).

3.1.2. INH–PCNBA

This cocrystal crystallizes in the triclinic $P\bar{1}$ space group with one INH molecule and one *p*-cyanobenzoic acid (PCNBA) molecule in the ASU (Fig. S1b). Similarly to INH–PNBA, the API and the coformer are associated by the acid...pyridine (COOH...N_{arom}) heterosynthon through O2–H2...N2 (2.658 (2) Å, 174.42 (12)°) and C3–H3...O3 (3.319 (3) Å, 125.64 (15)°) interactions. The INH and PCNBA molecules are also connected by N3–H3B...N4 (3.270 (3) Å,

135.85 (13)°) H-bonds involving the hydrazide and cyano groups. Thus, INH and PCNBA molecules are arranged into chains along the diagonal of *ac* direction (Fig. 3c). Moreover, along the [100] direction, these chains are oriented parallel to each other and are linked through C12–H12...O3 (3.236 (2) Å, 137.01 (15)°) and C10–H10...N3 (3.610 (3) Å, 168.08 (13)°) interactions. Likewise, along the [010] direction, adjacent chains are related to each other by the hydrazide...hydrazide homosynthon ($R_2^2(6)$ and $R_2^2(10)$ graph set) from the association of INH molecules (Fig. 3c). As expected from the layered arrangement (Fig. 3b), the INH–PCNBA structure is stabilized by π ... π interactions (3.777 (2) Å) formed between the aromatic centre of INH and acid molecules (Fig. 3c).

3.1.3. INH–PABA polymorphs

The crystals obtained from the reaction between INH and the coformer PABA in ethanol/acetonitrile (2:1 mixture) gave rise to the formation of two polymorphic cocrystals, namely INH–PABA-I and INH–PABA-II. The appearance of these polymorphic phases occurs simultaneously at different crystallization conditions. Thus, INH–PABA-I and INH–PABA-II can be considered concomitant polymorphs. The occurrence of both forms in the same crystallization medium can be explained by an interplay of kinetic and thermodynamic factors. The Form I was preferentially obtained at 25 °C while crystallization of Form II occurred at −5 °C. Thus, it was possible to separate these phases and analyze their structures.

Fig. 2. (a) Packing view of the INH-PNBA Asymmetric Unit. (b) The layered structure is stabilized through π - π stacking interactions (in green). The molecular slice direction is indicated by a plane (in red). (c) Representation of the acid...pyridine heterosynthon (in blue) and hydrazide...hydrazide homosynths ($R_2^2(6)$ and $R_2^2(10)$ motifs) which are extended along $[100]$ direction. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 3. (a) Packing view of the INH-PCNBA Asymmetric Unit. (b) Layered arrangement of the cocrystal. The molecular slice direction is indicated by a plane (in blue). (c) Representation of the acid...pyridine (in blue), hydrazide...hydrazide ($R_2^2(6)$ and $R_2^2(10)$ motifs) synths and π - π stacking interactions (in green). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The INH-PABA-I crystallizes in the monoclinic space group $P2_1$, whereas the INH-PABA-II crystallizes in the monoclinic $P2_1/c$ space group. The ASU of both polymorphs consists of one INH molecule

and two PABA molecules (namely as PABA-A and PABA-B). In both polymorphic forms, the PABA-A and INH molecules are associated by the acid...pyridine ($\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{arom}}$) heterosynthon while PABA-B

Fig. 4. (a) View of INH-PABA Form I packing along the *a* and *c* axis. The molecular slice direction is indicated by a plane (in dark green). (b) Orientation of molecules in the ASU showing that the mean plane of PABA-A and PABA-B molecules are 80.08°. (c) Representation of the acid...pyridine (in blue) and acid...hydrazide (in brown) heterosynths. The INH and PABA chains are formed and extended through N–H...O H-bonds. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

is H-bonded to INH by $\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{hydrazide}}$ to form an acid...hydrazide heterosynthon (Figs. 4c and 5c). No conformational changes are observed between the INH molecules in the INH–PABA-I and INH–PABA-II structures (Fig. S5), allowing to conclude that this is a

case of orientational polymorphism.

The polymorphs of INH–PABA have some structural similarities:

- (i) The *b* and *c* axis of INH–PABA-I, are similar to the *b* and *a* axis of INH–PABA-II, respectively (Table 2).
- (ii) Structurally, both

Fig. 5. (a) View of INH-PABA Form II packing along the *a* and *c* axis. The molecular slice direction is indicated by a plane (in light green). (b) Orientation of molecules in the ASU showing that the mean plane of PABA-A and PABA-B molecules are 3.12°. (c) Representation of the acid...pyridine (in blue) and acid...hydrazide (in brown) heterosynths. The INH and PABA chains are formed and extended through N–H...O H-bonds. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 6. Diffractograms of INH cocrystals. For all cocrystals, the experimental and calculated PXRD patterns show a good agreement, thus proving the purity and the homogeneity of the samples.

polymorphs show the presence of chains made only by PABA molecules as well as chains made only by INH molecules which are independents from each other. The INH molecules are connected between them by $N1-H1 \cdots O1$ interactions forming a $C_1^1(4)$ chain motif. Similarly, the PABA-A and PABA-B molecules are linked to each other through $N-H \cdots O$ H-bonds. These supramolecular motifs from INH–PABA-I and INH–PABA-II are shown in Figs. 4c and 5c, respectively. (iii) In the both structures the PABA chains are linked to INH molecules. However, the main difference between the polymorphs is related to the orientation of molecules in the ASU. In the INH–PABA-I the mean plane of PABA-A and PABA-B molecules are 80.08° (Fig. 4b), while in INH–PABA-II is around 3.12° (Fig. 5b). Moreover, along the PABA chains, the adjacent INH molecules are

73.37° oriented along [001] direction in INH–PABA-I, while in the INH–PABA-II the INH molecules are almost parallel each other (Fig. S6). The 3-D structure view along the *a* and *c* axis of INH–PABA polymorphs pointing out the features of each packing are shown in Figs. 4a and 5a.

3.2. Powder X-ray diffraction analysis

Powder X-ray diffraction is the most suitable characterization tool in establishing the completeness relative to the formation of novel crystalline forms [42]. Also, PXRD analysis confirms if the single crystal chosen for the data collection is representative of the whole sample. In this sense, this technique was used to verify the

Fig. 7. FT-IR spectra of INH (black) and INH cocrystals: INH–PNBA (green), INH–PCNBA (purple), INH–PABA Form-I (blue) and INH–PABA Form-II (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4
Principal FT-IR bands (cm^{-1}) for INH and INH cocrystals.

INH	INH-PNBA	INH-PCNBA	INH-PABA-I	INH-PABA-II	Assignment
—	3330	3340	3460	3459	$\nu(\text{O-H})_{\text{carboxyl}}$
3303, 3212	3230, 3148	3277, 3115	3229, 3106	3298, 3208	$\nu(\text{N-H } 1^\circ)_{\text{hydrazide}}$
3110	3054	3065	3051	3050	$\nu(\text{N-H } 2^\circ)_{\text{hydrazide}}$
—	—	—	3362, 3300	3380, 3232	$\nu(\text{N-H } 1^\circ)_{\text{amine}}$
—	—	2228	—	—	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})_{\text{cyano}}$
—	1712	1710	1663	1662	$\nu(\text{C=O})_{\text{carboxyl}}$
1662	1677	1670	1634	1335	$\nu(\text{C=O})_{\text{amide}}$
—	1520	—	—	—	$\nu_{\text{a}}(\text{N-O})_{\text{nitro}}$
—	1346	—	—	—	$\nu_{\text{s}}(\text{N-O})_{\text{nitro}}$
1332	1308	1324	1321	1310	$\nu(\text{C-N})_{\text{pyridine}}$

ν = stretching, a = antisymmetric, s = symmetric.

purity of the compounds. All INH cocrystals synthesized in the present study display experimental diffraction patterns in good agreement with the simulated ones, obtained from SCXRD analysis (Fig. 6), thus indicating that the obtained single crystals present high purity and representativity.

Additionally, the PXRD patterns analysis of INH–PABA polymorphs allowed to clearly and unambiguously differentiate them. Each experimental diffractogram revealed the presence of characteristic Bragg peaks, which are related to the formation of only one crystalline phase. Therefore, it is possible to state that the crystallization of INH–PABA forms I and II at different temperatures (25 °C and –5 °C) was an efficient procedure. In this sense, no Bragg peaks related to polymorph I were verified in the PXRD pattern of polymorph II (and vice versa).

3.3. Spectroscopy analysis

The FT-IR spectra of INH and its cocrystals (Fig. 7) were analyzed taking into account the structural features observed in the crystallographic study. Band assignments (Table 4) were performed using spectroscopic data available for cocrystals with carboxylic acids and related INH compounds found in the literature [24,26,27,29]. The cocrystal formations were identified by the evaluation of the changes in the vibrational modes of specific functional groups of the INH and the carboxylic acid coformers [43]. The functional groups in the INH molecule, among them hydrazide, amide and pyridine ring, exhibit IR stretching frequencies at 3303 cm^{-1} and 3212 cm^{-1} (primary amine NH stretches), 3110 cm^{-1} (secondary amine NH stretch), 1662 cm^{-1} (amide C=O stretch) and 1332 cm^{-1} (pyridine ring CN stretch). These stretching

Fig. 8. DSC and TGA curves of INH cocrystals: INH–PNBA, INH–PCNBA, INH–PABA Form-I and INH–PABA Form-II.

Fig. 9. Hot-stage microscopy images of INH–PNBA (a), INH–PCNBA (b), INH–PABA-Form-I (c) and INH–PABA-Form-II (d) single crystals.

frequencies appear shifted in the FT-IR spectra of all INH cocrystals, confirming the formation of novel solid forms.

According to the literature, primary amine shows two NH stretches ($3400 - 3100\text{ cm}^{-1}$), while secondary amine, shows only one NH stretch ($3200 - 3000\text{ cm}^{-1}$) [44]. In the INH FT-IR spectrum, the NH stretching vibrations attributed to primary amine appear as two bands at 3303 cm^{-1} and 3212 cm^{-1} . As expected, the NH stretching related to secondary amine is also observed as a single band at 3110 cm^{-1} . However, due to the formation of hydrogen bonding synthons involving the hydrazide group, the bands assigned to the NH stretching modes are observed shifted to lower wavenumbers in the cocrystals spectra.

The carboxylic acids, used as coformers, normally display two characteristic absorption bands at $3500 - 3300\text{ cm}^{-1}$ and $1750 - 1660\text{ cm}^{-1}$ related to the hydroxyl and carbonyl stretches of COOH group, respectively. These bands are observed in all cocrystals spectra: 3330 cm^{-1} and 1712 cm^{-1} (INH–PNBA), 3340 cm^{-1} and 1710 cm^{-1} (INH–PCNBA), 3460 cm^{-1} and 1663 cm^{-1} (INH–PABA Form-I) and 3459 cm^{-1} and 1662 cm^{-1} (INH–PABA Form-II). Concerning the pyridine ring, a strong band at 1662 cm^{-1} , assigned to the C–N stretching mode, is observed in the INH spectrum. In the cocrystals spectra, these bands appear shifted ($8 - 28\text{ cm}^{-1}$) due to the formation of acid...pyridine H-bonds. It is worth mentioning that the vibrational modes arising from the others functional groups such as nitro, cyano and amine, present in the acids molecules, could also be observed in the cocrystals spectra.

3.4. Thermal characterization

The thermal behavior of the INH cocrystals was studied by a combination of DSC, TGA and HSM techniques. The DSC/TGA curves of INH cocrystals are presented in Fig. 8. For comparison purpose, the DSC curve of INH was included (see Fig. S3). INH is stable between 25 and $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ and its DSC curve exhibits a single endothermic melting peak at $171\text{ }^{\circ}\text{C}$. DSC curves of INH–PNBA and

INH–PCNBA are characterized by a single endothermic peak at $181.71\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 179.53\text{ }^{\circ}\text{C}$) and $172.75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 169.36\text{ }^{\circ}\text{C}$), respectively, which were attributed to the fusion/decomposition of the samples. These values agree with the gradual mass loss that occurs in the TGA curves which begins at around $165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sublimation of samples, $T_{\text{onset}} = 164.90\text{ }^{\circ}\text{C}$) for INH–PNBA and $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 160.95\text{ }^{\circ}\text{C}$) for INH–PCNBA.

The melting point of INH–PABA Form-I is assigned to an endothermic peak at $163.57\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 152.59\text{ }^{\circ}\text{C}$) in the DSC curve. This event is accompanied by the thermal decomposition of the sample since a gradual mass loss in the TGA curve up to $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 168.15\text{ }^{\circ}\text{C}$) can be observed. In comparison with the other cocrystals reported here, we found that INH–PABA Form II is the one with the lowest thermal stability. DSC curve of this polymorph showed an endothermic peak at $134.42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 130.53\text{ }^{\circ}\text{C}$), which was assigned to the melting process.

HSM was also performed in order to visualize the thermal events described above. Although HSM and DSC/TGA experiments were performed under different atmospheres, the results are in good agreement to each other. From HSM images (Fig. 9), it is possible to see that INH–PNBA and INH–PCNBA crystals undergo fusion/degradation at around $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $165\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The images also show the beginning of melting of the INH–PABA crystals which occur at around $164\text{ }^{\circ}\text{C}$ for Form I and $136\text{ }^{\circ}\text{C}$ for Form II. It is worth to mention that, according to DSC curves, there is no evidence of any other peaks that could be associated with any phase transition.

The thermal stability can be understood in terms of rupture of the crystal structure upon exposure to the heating process in an inert environment (experimental conditions in DSC/TGA experiments). Considering the thermal behavior of the INH–PABA polymorphs, it was observed that: (i) the higher melting point of INH–PABA Form I (Fig. 8) indicates that this polymorph is more stable than INH–PABA Form II, at room temperature (about $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). (ii) No phase transition is observed in both polymorphs in the range between $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and their respective melting points. (iii) The lower

heat of fusion of the lower melting INH-PABA-II (77.66 J g^{-1} in INH-PABA-II vs. 145.31 J g^{-1} in INH-PABA-I) indicates that the crystal forms are monotropically related (Heat of Fusion Rule) [45,46]. From this perspective, the following thermal stability order was established for INH cocrystals: INH-PABA-I > INH-PNBA > INH-PCNBA > INH-PABA-II. The degradation of the cocrystals INH-PNBA and INH-PCNBA are events that provide the rupture of structure and occur at lower temperatures when compared to INH-PABA-I. This aspect can be related to the reactivity of the PNBA and PCNBA cofomers.

4. Conclusions

In this study, four cocrystals of the anti-tuberculosis drug Isoniazid (INH) were prepared and investigated using single crystal and powder X-ray diffraction, Hirshfeld surface analysis, FT-IR spectroscopy, thermogravimetry analysis, differential scanning calorimetry and Hot-Stage microscopy. These cocrystals were designed to explore the supramolecular synthons diversity between this API and aromatic carboxylic acids. Analysis of the crystal structures and packing revealed that the INH-PNBA and INH-PCNBA cocrystals are formed by acid...pyridine heterosynthons. In addition, their structures are also stabilized by hydrazide...hydrazide homosynthons and π - π stacking interactions. On the other hand, the INH-PABA polymorphs are formed through acid...pyridine and acid...hydrazide heterosynthons. This is a typical case of orientational polymorphism.

From the FT-IR spectra it was possible to confirm the cocrystal formation. The TGA/DSC results showed that the INH-PNBA and INH-PCNBA cocrystals undergo thermal degradation/fusion while INH-PABA polymorphs just melt and, according to the Heat of Fusion Rule, they are monotropically related. In relation to thermal stability, the following order was established for INH cocrystals: INH-PABA-I > INH-PNBA > INH-PCNBA > INH-PABA-II. As expected, these results are in good agreement with the HSM images. The present study shows that a better comprehension of the supramolecular features/interactions can be crucial for the development of more stable and efficient INH solid forms.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian funding agencies FAPESP (L.F.D. grant 15/25694-0 and P.S.C.-Jr. grant 12/05616-7), CAPES (M.S.S., C.C.P.S.) and CNPq for financial support. The authors would also like to thank Dra. Charlane C. Correa (Universidade Federal de Juiz de Fora) and Dr. Alejandro Pedro Ayala (Universidade Federal do Ceará) for allowing access to the X-ray diffraction and FT-IR facilities, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.115>.

References

- [1] J. Wouters, L. Quere, D.E. Thurston, *Pharmaceutical Salts and Co-crystals*, Royal Society of Chemistry, 2011.
- [2] D.P. Elder, R. Holm, H.L.d. Diego, Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 88–100.
- [3] N. Shan, M.J. Zaworotko, The role of cocrystals in pharmaceutical science, *Drug Discov. Today* 13 (2008) 440–446.
- [4] N.K. Duggirala, M.L. Perry, O. Almarsson, M.J. Zaworotko, Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines, *Chem. Commun.* 52 (2016) 640–655.
- [5] G.R. Desiraju, Crystal engineering: from molecule to crystal, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 9952–9967.
- [6] L.F. Diniz, P.S. Carvalho, C.C. de Melo, J. Ellena, Development of a salt drug with improved solubility: ethionamide nitrate, *J. Mol. Struct.* 1137 (2017) 119–125.
- [7] L.F. Diniz, P.S. Carvalho Jr., C.C. de Melo, J. Ellena, Reducing the hygroscopicity of the anti-tuberculosis drug (S, S)-ethambutol using multicomponent crystal forms, *Cryst. Growth & Des.* 17 (2017) 2622–2630.
- [8] J.W. Steed, The role of co-crystals in pharmaceutical design, *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (2013) 185–193.
- [9] A.V. Trask, An overview of pharmaceutical cocrystals as intellectual property, *Mol. Pharm.* 4 (2007) 301–309.
- [10] N. Jouini, L. BenHamada, A. Jouini, Crystal structure of a new organic condensed phosphate (C 6 H 9 N 3 O) H 2 P 2 O 7, *Mater. Res. Bull.* 42 (2007) 56–63.
- [11] A. Lemmerer, J. Bernstein, V. Kahlenberg, Hydrogen bonding patterns of the co-crystal containing the pharmaceutically active ingredient isoniazid and terephthalic acid, *J. Chem. Crystallogr.* 41 (2011) 991–997.
- [12] S. Cherukuvada, A. Nangia, Fast dissolving eutectic compositions of two anti-tubercular drugs, *CrystEngComm* 14 (2012) 2579–2588.
- [13] P. Grobelny, A. Mukherjee, G.R. Desiraju, Drug-drug co-crystals: temperature-dependent proton mobility in the molecular complex of isoniazid with 4-aminosalicylic acid, *CrystEngComm* 13 (2011) 4358–4364.
- [14] A. Lemmerer, J. Bernstein, V. Kahlenberg, One-pot covalent and supramolecular synthesis of pharmaceutical co-crystals using the API isoniazid: a potential supramolecular reagent, *CrystEngComm* 12 (2010) 2856–2864.
- [15] B. Lei, C.-J. Wei, S.-C. Tu, Action mechanism of antitubercular isoniazid activation by Mycobacterium tuberculosis KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 2520–2526.
- [16] S. Singh, B. Mohan, A pilot stability study on four-drug fixed-dose combination anti-tuberculosis products, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7 (2003) 298–303.
- [17] M.L. Bastos, H. Hussain, K. Weyer, L. Garcia-Garcia, V. Leimane, C.C. Leung, M. Narita, J.M. Penã, A. Ponce-de-Leon, K.J. Seung, Treatment outcomes of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis according to drug susceptibility testing to first-and second-line drugs: an individual patient data meta-analysis, *Clin. Infect. Dis.* 59 (2014) 1364–1374.
- [18] W. Hong-min, Z. Xiao-Hong, Association of drug susceptibility testing results for first-and second-line drugs with treatment outcomes in patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, *Clin. Infect. Dis.* 60 (2015) 1285–1286.
- [19] A. Haywood, M. Mangan, G. Grant, B. Glass, Extemporaneous isoniazid mixture: stability implications, *J. Pharm. Pract. Res.* 35 (2005) 181–182.
- [20] H. Bhutani, T. Mariappan, S. Singh, An explanation for the physical instability of a marketed fixed dose combination (FDC) formulation containing isoniazid and ethambutol and proposed solutions, *Drug Dev. ind. Pharm.* 30 (2004) 667–672.
- [21] C.S. Gautam, L. Saha, Fixed dose drug combinations (FDCs): rational or irrational: a view point, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65 (2008) 795–796.
- [22] H. Bhutani, S. Singh, K.C. Jindal, A.K. Chakraborti, Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 892–899.
- [23] H. Bhutani, T. Mariappan, S. Singh, The physical and chemical stability of anti-tuberculosis fixed-dose combination products under accelerated climatic conditions, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8 (2004) 1073–1080.
- [24] S. Aitipamula, A.B. Wong, P.S. Chow, R.B. Tan, Novel solid forms of the anti-tuberculosis drug, Isoniazid: ternary and polymorphic cocrystals, *CrystEngComm* 15 (2013) 5877–5887.
- [25] I. Sarcevic, L. Orola, M.V. Veidis, A. Podjava, S. Belyakov, Crystal and molecular structure and stability of isoniazid cocrystals with selected carboxylic acids, *Cryst. Growth & Des.* 13 (2013) 1082–1090.
- [26] B. Swapna, D. Maddileti, A. Nangia, Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: polymorphism, isostructurality, and stability, *Cryst. Growth & Des.* 14 (2014) 5991–6005.
- [27] S.M.A. Mashhadi, U. Yunus, M.H. Bhatti, M.N. Tahir, Isoniazid cocrystals with anti-oxidant hydroxy benzoic acids, *J. Mol. Struct.* 1076 (2014) 446–452.
- [28] R. Kaur, S. Perumal, A.J. Bhattacharyya, S. Yashonath, T. Guru Row, Structural insights into proton conduction in gallic acid–isoniazid cocrystals, *Cryst. Growth & Des.* 14 (2014) 423–426.
- [29] S.M.A. Mashhadi, U. Yunus, M.H. Bhatti, I. Ahmed, M.N. Tahir, Synthesis, characterization, solubility and stability studies of hydrate cocrystal of anti-tubercular Isoniazid with antioxidant and anti-bacterial Protocatechuic acid, *J. Mol. Struct.* 1117 (2016) 17–21.
- [30] M. Oruganti, P. Khade, U.K. Das, D.R. Trivedi, The hierarchies of hydrogen bonds in salts/cocrystals of isoniazid and its Schiff base—a case study, *RSC Adv.* 6 (2016) 15868–15876.
- [31] C.C. de Melo, P. de Sousa Carvalho, L.F. Diniz, R.F. D'Vries, A.P. Ayala, J. Ellena, Supramolecular synthesis and thermochemical investigations of pharmaceutical inorganic isoniazid salts, *CrystEngComm* 18 (2016) 6378–6388.
- [32] A. Technologies (Ed.), Agilent, CrysAlis PRO, 2010. Yarnton, England.
- [33] O.V. Dolomanov, L.J. Bourhis, R.J. Gildea, J.A.K. Howard, H. Puschmann, OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program, *J. Appl. Crystallogr.* 42 (2009) 339–341.
- [34] G. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. Sect. A* 64 (2008) 112–122.
- [35] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P.A. Wood, Mercury CSD 2.0: new features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 466–470.

- [36] F. Allen, The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallogr. Sect. B* 58 (2002) 380–388.
- [37] J.J. McKinnon, M.A. Spackman, A.S. Mitchell, Novel tools for visualizing and exploring intermolecular interactions in molecular crystals, *Acta Crystallogr. Sect. B* 60 (2004) 627–668.
- [38] W. Lund, *The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics*, The Pharmaceutical Press, London, 1994.
- [39] B.R. Bhogala, S. Basavoju, A. Nangia, Tape and layer structures in cocrystals of some di- and tricarboxylic acids with 4,4[prime or minute]-bipyridines and isonicotinamide. From binary to ternary cocrystals, *CrystEngComm* 7 (2005) 551–562.
- [40] S.L. Childs, G.P. Stahly, A. Park, The salt-cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state, *Mol. Pharm.* 4 (2007) 323–338.
- [41] C.C. da Silva, R.d.O. Pepino, C.C. de Melo, J.C. Tenorio, J. Ellena, Controlled synthesis of new 5-fluorocytosine cocrystals based on the p K a rule, *Cryst. Growth & Des.* 14 (2014) 4383–4393.
- [42] J.F. Remenar, M.L. Petersom, P.W. Stephens, Z. Zhang, Y. Zimenkov, M.B. Hickey, Celecoxib:nicotinamide dissociation: using excipients to capture the cocrystal's potential, *Mol. Pharm.* 4 (2007) 386–400.
- [43] A. Heinz, C.J. Strachan, K.C. Gordon, T. Rades, Analysis of solid-state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy, *J. Pharm. Pharmacol.* 61 (2009) 971–988.
- [44] G.A. Giffin, S. Boesch, D.N. Bopege, D.R. Powell, R.A. Wheeler, R. Frech, Vibrational spectroscopy of secondary amine salts: 1. Assignment of NH₂⁺ stretching frequencies in crystalline phases, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 15914–15920.
- [45] M.A. Burger, R. Ramberger, *Acta [Wien]* II, vol. 259, 1979.
- [46] J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, Clarendon Press, 2002.