



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CARLA LUZIA BORGES REIS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS BASEADOS EM
MONOETANOLAMINA E COLINA E APLICAÇÃO NA CRISTALIZAÇÃO DO
FÁRMACO ISONIAZIDA**

FORTALEZA

2021

CARLA LUZIA BORGES REIS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS BASEADOS EM
MONOETANOLAMINA E COLINA E APLICAÇÃO NA CRISTALIZAÇÃO DO
FÁRMACO ISONIAZIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar (DEQ/UFC).

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha (DEQ/UFC).

FORTALEZA

2021

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

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

- R299s Reis, Carla Luzia Borges.
Síntese e caracterização de líquidos iônicos baseados em monoetanolamina e colina e aplicação na cristalização do fármaco isoniazida / Carla Luzia Borges Reis. – 2021.
153 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar.
Coorientação: Prof. Dr. Maria Valdez Pontes Rocha.
1. Isoniazida. 2. Líquidos iônicos. 3. Toxicidade. 4. Cristalização. 5. Mycobacterium tuberculosis. I. Título.
CDD 660
-

CARLA LUZIA BORGES REIS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS BASEADOS EM
MONOETANOLAMINA E COLINA E APLICAÇÃO NA CRISTALIZAÇÃO DO
FÁRMACO ISONIAZIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Dávila de Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Ana Karine Pessoa Bastos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. Enrique Vilarrasa Garcia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Geormenny Rocha dos Santos
Universidade Federal do Pará (UFPA)

A Deus.

Aos meus pais, irmão e esposo.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora por me conduzirem na realização desse projeto, que apesar das dificuldades encontradas, Eles me mostravam a todo momento, nos pequenos e grandes detalhes seu amor por mim.

À minha mãe Valdelúcia e meu pai Carlos (*in memoriam*), por representarem minha fortaleza de amor, dedicação e por me motivarem a seguir meus sonhos e realizações. Ao meu irmão, Carlos, por todo amor e zelo por mim e cuidados com nossa mãe enquanto tive que me ausentar para realização dessa tese.

Ao meu esposo Emmanuel, meu grande incentivador e admirador, que tem minha admiração e amor. Obrigada por toda atenção e paciência diante das dificuldades que passei durante a realização dessa tese. Seu valioso e incansável apoio e carinho foi fundamental.

À minha família pelo incentivo e acolhida, em especial aos meus tios, primos, Rosana, Rosane, Eva, Everton, Vladia, Clarinha, Davi, Romulo, Remo, meus afilhados e sobrinhos. À minha sogra, Zélia, pelas orações e por ter tanto orgulho do meu trabalho.

À Professora Dra. Maria Valderez Ponte Rocha, por não medir esforços para a realização dessa tese. Muito obrigado por ter acreditado na proposta desse trabalho, pelas palavras de incentivo, por toda disponibilidade e atenção sempre que precisei.

À Professora Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar, pela orientação, ensinamentos e pela confiança. Além da oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa que me fez crescer ainda mais como profissional.

Aos meus amigos da UFC, Layanne, Paulinha, Edvan, Juliana, Carlos, Ravena, Camilla, Ticiane, Regiane, Priscilla, Aline, Jouciane, Tiago e Jessyca pelos gratos momentos, pelas boas conversas e todo o apoio. Aos colegas e amigos do GPTA por todo o apoio no decorrer do doutorado. Aos meus amigos da UFERSA por vibrarem pelas minhas conquistas e serem tão presentes, mesmo que distantes.

Aos laboratórios que viabilizaram as análises complementares como: Laboratório de Raios-X; CNPq (Processo: 402561/2007-4) Edital MCT/CNPq nº 10/2007, CENAUREM/UFC, à Central Analítica-UFC (financiada pelos programas Finep-CT-INFRA, Pró-Equipamentos CAPES, e MCTI-CNPq-SisNano2.0) e Laboratório de Materiais Avançados-UFC.

Ao Thales, Soraya e professora Cristiane por possibilitarem a análise de atividade antimicrobacteriana. Ao Samuel pela solicitude nas análises de TGA/DSC.

Aos funcionários do DEQ, em especial ao Sr. Luis, Jorjão, Jorginho e Danilo.

Aos professores Emilio de Castro Miguel, Alejandro Pedro Ayala, Filipe X. Feitosa e Hosiberto B. de Sant'Ana por toda ajuda fornecida.

À Lorena Mara Alexandre pelo auxílio nas análises de RMN, pela disponibilidade em todos os momentos que precisei.

Aos professores participantes da banca examinadora da qualificação, pelas valiosas colaborações e sugestões, professora Dávila Zampieri e Karine Bastos.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, em especial a FUNCAP pela concessão da bolsa de doutorado.

E a todos que de certa forma contribuíram para a concretização desse trabalho.

RESUMO

Os líquidos iônicos (LIs) são considerados uma alternativa atraente para aperfeiçoar processos com finalidades econômicas, ecológicas e podem oferecer uma nova perspectiva na cristalização de insumos farmacêuticos ativos (IFAs), devido a infinidade de possibilidade de sínteses dos LIs. Neste contexto, estudou-se a aplicação de LIs na cristalização da isoniazida (INH), um dos medicamentos mais utilizados e importantes no tratamento da tuberculose, com a finalidade de analisar os efeitos nas características do fármaco, como também a interação com os LIs, síntese de novos compostos e manipulação do hábito cristalino. Inicialmente, foram sintetizados e caracterizados cinco LIs baseados no cátion colina com ácido sulfúrico, acético, benzóico e cítrico, como também, dois LIs baseados no cátion monoetanolamina com ácido acético e fórmico. Posteriormente, os sete LIs obtidos foram caracterizados por meio de propriedades físico-químicas e utilizados na cristalização da INH pelo método de evaporação do solvente. Os ensaios de toxicidade aguda dos LIs demonstraram que o hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio; formiato de 2-hidroxi-etilamônio e acetato de 2-hidroxi-etilamônio não apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, enquanto o acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio, bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio apresentaram baixa toxicidade, com valores de DL_{50} de 529; 408 e 410 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na caracterização das novas formas de INH, verificou-se que a morfologia e estabilidade da INH pode ser manipulada de acordo com o LI escolhido, produzindo hábitos distintos dos encontrados na cristalização com os ácidos precursores dos LIs. As formas INH:[ChOH] e INH:[ChCit], mostraram aspecto de pó, baixa solubilidade e em relação a ação antimicrobacteriana sob a *Mycobacterium tuberculosis*, apresentaram valor de concentração inibitória mínima de 100 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O LI bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio provocou mudança conformacional na estrutura da isoniazida, formando o sulfato de 2-(4-piridiníocarbonil)-hidrazina, com solubilidade em água a 25 °C de 155,90 mg/mL , sendo aprimorada em relação a isoniazida padrão, que apresentou nas mesmas condições solubilidade de 137,90 mg/mL . Diante disso, a obtenção de novas formas sólidas do fármaco INH em LIs, bem como a caracterização e elucidação de sua estrutura após a cristalização, torna-se inovador e é considerado um passo inicial para a utilização de novos solventes na cristalização de fármacos.

Palavras-chave: Isoniazida. Líquidos iônicos. Toxicidade. Cristalização. *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

The ionic liquids (ILs) are considered an attractive alternative to improve processes with economic, ecological purposes and can offer a new perspective on the crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs), due to the infinity of possibilities of ILs syntheses. In this context, the application of ILs in the crystallization of isoniazid (INH), one of the most used and important drugs in the treatment of tuberculosis, was studied, with the purpose of analyzing the effects on the characteristics of the drug, as well as the interaction with the ILs, synthesis of new compounds and manipulation of the crystalline habit. Initially, five ILs based on the choline cation with sulfuric, acetic, benzoic and citric acid were synthesized and characterized, as well as two ILs based on the monoethanolamine cation with acetic and formic acid. Subsequently, the seven ILs obtained were characterized by physical-chemical properties and used in the crystallization of INH by the solvent evaporation method. The acute toxicity tests against the microcrustacean *Artemia salina* showed that (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium hydroxide; 2-hydroxyl ethylammonium formate and 2-hydroxyl ethylammonium acetate ILs did not show toxicity against the microcrustacean *A. salina*, while the (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium acetate, (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium bisulfate and (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium citrate ILs showed low toxicity, with values of LD₅₀ of 529; 408 e 410 µg/mL. In the characterization of the new forms of INH, it was verified that the morphology and stability of the INH can be manipulated according to the chosen IL, producing habits different from those found in the crystallization with the precursor acids of the ILs. The INH:[ChOH] and INH:[ChCit] forms showed a powdery appearance, low solubility and in relation to the antimycobacterial action against *Mycobacterium tuberculosis*, they presented a minimum inhibitory concentration value of 100 and 12.5 µg/mL, respectively. The (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium bisulfate IL caused a conformational change in the structure of isoniazid, led to the formation the 2-(4-pyridiniumcarbonyl)-hydrazine sulfate, with a solubility in water at 25 °C of 155.90 mg/mL, being improved compared to INH (137.90 mg/mL) under the same conditions. Therefore, the obtaining new solid forms of the drug INH in ILs, as well as the characterization and elucidation of its structure after crystallization, becomes innovative and it is considered an initial step for the use of new solvents in the crystallization of drugs.

Keywords: Isoniazid. Ionic liquids. Toxicity. Crystallization. *Mycobacterium tuberculosis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura química do cátion monoetanolamina ou 2-hidroxi-etilamônio.	23
Figura 2 – Representação química da estrutura do cátion colina ou (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio.....	23
Figura 3 – Esquema do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	26
Figura 4 – Estrutura química dos produtos de degradação da isoniazida.....	27
Figura 5 – Reação de síntese do líquido iônico hidróxido de colina [ChOH].....	41
Figura 6 – Esquema representativo das sínteses dos líquidos iônicos: benzoato de colina - [ChBenz], acetato de colina - [ChAcet], citrato de colina - [ChCit], bissulfato de colina (50%) - [ChBis](50%) e bissulfato de colina (100%) - [ChBis](100%).....	44
Figura 7 – Esquema representativo das sínteses dos líquidos iônicos: acetato de 2-hidroxi-etilamônio - 2-HEAA e formiato de 2-hidroxi-etilamônio - 2-HEAF.	46
Figura 8 – Aparato experimental na produção dos líquidos iônicos 2-HEAA e 2-HEAF.	46
Figura 9 – Fluxograma do ensaio de toxicidade dos líquidos iônicos frente a <i>Artemia salina</i>	49
Figura 10 – Espectro de FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados: líquido iônico hidróxido de colina [ChOH]; acetato de colina [ChAc], benzoato de colina [ChBenz] e citrato de colina [ChCit].....	62
Figura 11 – Espectros de FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados: a) acetato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAA) e b) formiato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAF).	64
Figura 12 – a) Espectro de RMN de ¹ H do líquido iônico hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes do líquido iônico hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (cloreto de colina e KOH).	65
Figura 13 – a) Espectro de RMN ¹ H do líquido iônico citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes do líquido iônico citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido cítrico).	67
Figura 14 – a) Espectro de RMN ¹ H do líquido iônico benzoato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes do líquido iônico benzoato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido benzoico).	68
Figura 15 – a) Espectro de RMN ¹ H do líquido iônico acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes do	

líquido iônico acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido acético).....	69
Figura 16 – a) Espectro de RMN ¹ H do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (100% v/v) obtido pela Síntese 1 e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido sulfúrico).....	70
Figura 17 – a) Espectro de RMN ¹ H do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (50% v/v) obtido pela Síntese 2 e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido sulfúrico).....	71
Figura 18 – a) Espectro de RMN ¹ H do líquido iônico formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF) e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes utilizados na síntese do líquido iônico formiato de 2-hidroxi-etilamônio (ácido fórmico e monoetanolamina).	74
Figura 19 – a) Espectro de RMN ¹ H do líquido iônico acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA) e b) Espectro de RMN ¹ H da mistura física dos componentes utilizados na síntese do líquido iônico acetato 2-hidroxi-etilamônio (ácido acético e monoetanolamina).	75
Figura 20 – Espectros de RMN ¹³ C em DMSO- <i>d</i> ₆ dos líquidos iônicos: a) [ChOH]; b) [ChAc]; c) [ChBenz]; d) [ChCit]; e) [ChBis]-50%; f) [ChBis]-100%; g) 2-HEAA e h) 2-HEAF.....	77
Figura 21 – Microscopia óptica e microscopia óptica de varredura dos náuplios de <i>Artemia salina</i> expostos ao teste de toxicidade aguda nos líquidos iônicos [ChAc], [ChCit] e [ChBis]. Ampliação de 100 vezes no microscópio óptico e 500 vezes no MEV.	82
Figura 22 – Espectro de infravermelho da isoniazida padrão.	84
Figura 23 – Espectros de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão, INH:[ChOH]; INH:[ChAc]; INH:[ChBenz] e INH:[ChCit].	86
Figura 24 – Espectros de infravermelho (FT-IR): a) isoniazida padrão; b) INH:[ChBis] e c) INH:ácido sulfúrico.	88
Figura 25 – Espectros de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão; INH:2-HEAA e INH:2-HEAF.	91
Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura da isoniazida padrão. Ampliação da imagem em: a ₁ = 150x; a ₂ = 500 x e a ₃ = 5000x.	94
Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura: a) isoniazida; b) INH:[ChBis] e c) INH:H ₂ SO ₄ . As ampliações nas imagens são: a ₁ = 150x; a ₂ = 500x; a ₃ = 5000x; b ₁ =150x; b ₂ =1000x; b ₃ =5000x; c ₁ =1000x; c ₂ =2000x e c ₃ =5000x.	95
Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura da a) INH:[ChOH]; b) INH:[ChBenz]; c) INH:ácido benzoico; d) INH:[ChAc]; e) INH:ácido acético; f) INH:[ChCit] e g) INH:ácido cítrico. Os subscritos 1, 2 e 3, correspondem à ampliação de x ₁ =150x;	

$x_2=500x$ e $x_3=5000x$, respectivamente.	96
Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura da a) INH:2-HEAA; b) INH:ácido acético; c) INH:2-HEAF e d) INH:ácido fórmico. Os subscritos 1, 2 e 3 nas imagens correspondem à ampliação de $x_1=200x$; $x_2=500x$ e $x_3=5000x$, respectivamente. .	98
Figura 30 – Curvas termogravimétricas (em preto) e curva termogravimetria derivada (em cinza) da a) isoniazida padrão; b) INH:[ChOH]; c) INH:[ChAc]; d) INH:[ChBenz]; e) INH:[ChCit] e f) INH:[ChBis].	100
Figura 31 – Curva termogravimétrica (preto) e curva termogravimétrica derivada (em cinza) da a) isoniazida padrão; b) INH:2-HEAA e c) INH:2-HEAF.	102
Figura 32 – Curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a) isoniazida padrão; b) INH:[ChOH]; c) INH:[ChAc]; d) INH:[ChBenz]; e) INH:[ChCit] e f) INH:[ChBis].	104
Figura 33 – Curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da a) isoniazida padrão; b) INH:2-HEAA e c) INH:2-HEAF.	106
Figura 34 – Difratoograma de raios-x da isoniazida padrão.	111
Figura 35 – Difratoograma de raios X em pó: a) isoniazida; b) INH:[ChOH], c) INH:[ChAc]; d) INH:[ChBenz]; e) INH:[ChCit] e f) INH:[ChBis]. Em cinza, ampliação na faixa de 10 a 50° dos difratogramas.	112
Figura 36 – Difratoograma de raios-X em pó da isoniazida padrão; INH:LI bissulfato de colina e INH:H ₂ SO ₄ . Em cinza, ampliação na faixa de 10 a 40°.....	113
Figura 37 – Difratoograma de raios-X em pó: a) isoniazida; b) INH:2-HEAA e c) INH:2-HEAF.	114
Figura 38 – Espectro de RMN de ¹ H da isoniazida padrão em DMSO- <i>d</i> ₆	117
Figura 39 – Estudo da estabilidade em atmosfera acelerada (40 °C e 75 % de umidade) nos intervalos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias, da isoniazida e INH:IL.	126
Figura 40 – Microplaca do ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) das formas INH:LI, INH:H ₂ SO ₄ e INH sobre os isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas das propriedades no estado sólido modificadas pelo processo de cristalização.	34
Tabela 2 – Nomenclatura das isoniazidas obtidas após a cristalização em líquidos iônicos utilizando a técnica de evaporação do solvente.	51
Tabela 3 – Descrição, estrutura química e abreviatura dos nomes dos cinco líquidos iônicos obtidos a partir da colina e dois obtidos pelo cátion monoetanolamina.	57
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos sintetizados.	58
Tabela 5 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H da mistura física dos componentes dos líquidos iônicos e dos líquidos iônicos sintetizados a partir do cátion colina.	73
Tabela 6 – Deslocamento químicos de RMN de ^1H da mistura simples dos precursores de LIs e dos LIs sintetizados a partir do cátion monoetanolamina.	76
Tabela 7 – Valores de DL_{50} para os líquidos iônicos frente a <i>Artemia salina</i> em 48 h de exposição.	80
Tabela 8 – Dados espectrais de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão; INH:[ChBis] e INH:H ₂ SO ₄	90
Tabela 9 – Dados espectrais de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão e das formas INH:[ChOH]; INH:[ChAc]; INH:[Benz]; INH:[ChCit]; INH:2-HEAA e INH:2-HEAF.	93
Tabela 10 – Temperatura de fusão ($T_{\text{fusão}}$) e temperatura inicial de degradação (T_{onset}) da isoniazida padrão e das formas obtidas após a cristalização com os diferentes líquidos iônicos sintetizados (INH:LI).	107
Tabela 11 – Estrutura química e dados obtidos por difração de raios X por monocristal para a isoniazida cristalizada no LI [ChBis] em diferentes solventes (etanol 70% v/v; etanol 99% v/v; metanol 50% v/v e acetonitrila 50% v/v).	109
Tabela 12 – Valores de pK_a (25 °C) e ΔpK_a calculados para a reação da isoniazida com os ácidos precursores dos líquidos iônicos.	109
Tabela 13 – Valores de solubilidade da isoniazida padrão e das formas INH:LI em água (25 °C).	115
Tabela 14 – Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da isoniazida padrão.	117
Tabela 15 – Deslocamentos químicos de ^1H dos líquidos iônicos na presença de isoniazida e deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da isoniazida na presença dos líquidos iônicos. (continua)	119
Tabela 16 – Diferença do deslocamento químico de hidrogênio da isoniazida ($\Delta\delta_{\text{INH}}$) e diferença do deslocamento químico de hidrogênio do LI ($\Delta\delta_{\text{LI}}$). (continua)	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[ChAc]	Líquido iônico acetato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
[ChBenz]	Líquido iônico benzoato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
[ChBis]	Líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio (50% v/v)
[ChBis]-(100%v/v)	Líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio (100% v/v)
[ChBis]-(50%v/v)	Líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio (50% v/v)
[ChCit]	Líquido iônico Citrato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
[ChOH]	Líquido iônico hidróxido de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
2-HEAA	Líquido iônico acetato de 2-hidroxi-etilamônio
2-HEAF	Líquido iônico formiato de 2-hidroxi-etilamônio
BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Preventins</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DFC	Dose Fixa Combinada
DMSO-d6	Dimetil-sulfóxido deuterado
DRXM	Difração de Raios-x por monocristal
DRXM	Difração de Raios-x de pó
DSC	Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC)
FAAA	<i>Food Additivos Amendment</i>
FDA	<i>Food and drug Administration</i>
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Regnized as Safe</i>
IFA	Insumo Farmaceutico Ativo
INH	Isoniazida
INH:[ChAc]	Isoniazida cristalizada no LI [ChAc]
INH:[ChBenz]	Isoniazida cristalizada no LI [ChBenz]
INH:[ChBis]	Isoniazida cristalizada no LI [ChBis]
INH:[ChCit]	Isoniazida cristalizada no LI [ChCit]

INH:[ChOH]	Isoniazida cristalizada no LI [ChOH]
INH:2-HEAA	Isoniazida cristalizada no LI 2-HEAA
INH:2-HEAF	Isoniazida cristalizada no LI 2-HEAF
INH:LI	Isoniazida cristalizada em líquido iônico
LI	Líquido iônico
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTFE	Polietrafluoroetileno
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
TB	Tuberculose
TGA	Análises de termogravimetria
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Líquidos iônicos.....	21
2.2	Um breve histórico dos líquidos iônicos.....	22
2.2.1	<i>Líquidos iônicos em pesquisas farmacêuticas</i>	24
2.3	Isoniazida	25
2.4	Insumos farmacêuticos ativos e modificações cristalinas.....	28
2.4.1	<i>Insumos farmacêuticos ativos</i>	29
2.4.2	<i>Tipos de sólidos farmacêuticos</i>	30
2.4.3	<i>Cristalização de IFAs</i>	33
2.5	Isoniazida: estratégias encontradas na literatura que visam seu aperfeiçoamento	35
2.5.1	<i>Solubilidade da isoniazida em líquidos iônicos</i>	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Escolha dos ácidos e bases para síntese dos líquidos iônicos	40
3.2	Síntese dos líquidos iônicos obtidos a partir do cátion colina.....	40
3.2.1	<i>Síntese do líquido iônico hidróxido de colina [ChOH]</i>	40
3.2.2	<i>Síntese do líquido iônico benzoato de colina [ChBenz]</i>	41
3.2.3	<i>Síntese do líquido iônico acetato de colina [ChAcet]</i>	42
3.2.4	<i>Síntese do líquido iônico citrato de colina [ChCit]</i>	42
3.2.5	<i>Síntese do líquido iônico bissulfato de colina [ChBis]</i>	43
3.3	Síntese dos líquidos iônicos obtidos a partir do cátion monoetanolamina.....	44
3.3.1	<i>Síntese do líquido iônico acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA)</i>	45
3.3.2	<i>Síntese do líquido iônico formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF)</i>	45
3.4	Caracterização dos líquidos iônicos	47
3.4.1	<i>Densidade, viscosidade e teor de água dos líquidos iônicos</i>	47
3.4.2	<i>FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados</i>	47
3.4.3	<i>Caracterização por RMN de ¹H e ¹³C dos líquidos iônicos</i>	47
3.5	Ensaio de toxicidade aguda dos líquidos iônicos com <i>Artemia salina</i>	48
3.6	Cristalização da isoniazida em líquidos iônicos (INH:LI).....	50
3.7	Caracterização da isoniazida após a cristalização com líquido iônico.....	51

3.7.1	<i>FT-IR da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos</i>	51
3.7.2	<i>Análises Térmicas da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos</i>	52
3.7.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da isoniazida após a cristalização com ácidos ou LIs em etanol 70% v/v</i>	52
3.7.4	<i>Difração de Raio-X de pó (DRX) da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos</i>	52
3.7.5	<i>Difração de raios X de monocristal (DRXM) da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos</i>	52
3.7.6	<i>Caracterização por RMN de ¹H e ¹³C da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos</i>	53
3.8	Estudo de solubilidade no equilíbrio da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos	53
3.8.1	<i>Determinação do comprimento de onda e curva de calibração</i>	53
3.8.2	<i>Solubilidade no equilíbrio da isoniazida padrão e dos INH:LIs em água a 25 °C</i>	53
3.9	Estudo da estabilidade das INH:LI e isoniazida padrão em atmosfera acelerada	54
3.10	Atividade antimicobacteriana	54
3.10.1	<i>Obtenção, manutenção e preparação do inóculo dos isolados clínicos Mycobacterium tuberculosis</i>	54
3.10.2	<i>Teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima</i>	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Caracterização dos líquidos iônicos	56
4.1.1	<i>Propriedades termodinâmicas dos líquidos iônicos sintetizados</i>	56
4.1.2	<i>Análise de FT-IR dos líquidos iônicos</i>	60
4.1.2.1	<i>Líquidos iônicos formados a partir do hidróxido de colina</i>	60
4.1.2.2	<i>Líquidos iônicos formados a partir da monoetanolamina</i>	63
4.1.3	<i>RMN de ¹H e ¹³C dos líquidos iônicos sintetizados</i>	65
4.1.4	<i>Ensaio de toxicidade aguda dos LIs frente ao microcrustáceo Artemia salina</i> ..	79
4.2	Caracterização da isoniazida após cristalização com líquidos iônicos	83
4.2.1	<i>Análise de FT-IR da isoniazida padrão e das formas de INH:LI</i>	84

4.2.2	<i>Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da isoniazida padrão e das formas de INH:LI</i>	93
4.2.3	<i>Análises termogravimétricas da isoniazida padrão e das novas formas obtidas</i> ..	99
4.2.4	<i>Difração de raios-X por monocristal (MDRX)</i>	108
4.2.5	<i>Difração de raios X de pó (PDRX)</i>	110
4.2.6	<i>Solubilidade em equilíbrio</i>	114
4.2.7	<i>Ressonância magnética nuclear de 1H da isoniazida padrão e das formas INH:LIs</i>	116
4.2.8	<i>Estabilidade em atmosfera acelerada da isoniazida padrão e das formas INH:LIs</i>	125
4.2.9	<i>Atividade antimicobacteriana das formas INH:LI, INH:H2SO4 e INH sobre os isolados clínicos de Mycobacterium tuberculosis</i>	128
5	CONCLUSÃO	129
	REFERÊNCIAS	131
	APÊNDICE A	145
	APÊNDICE B	146

1 INTRODUÇÃO

Líquidos iônicos (LIs) são sais orgânicos com pontos de fusão abaixo de 100 °C, compostos por íons, formados por cátions e ânions (RESENDE DE AZEVEDO *et al.*, 2014), apresentam baixa pressão de vapor e são considerados não voláteis. São geralmente líquidos viscosos e apresentam grande capacidade de dissolver substâncias orgânicas e inorgânicas (GOUVEIA *et al.*, 2014).

Com o aumento da percepção de toxicidade e biocompatibilidade, os LIs vêm despertando atenção como um conceito de formulação para IFAs (insumos farmacêuticos ativos), variando sua utilização entre: solventes e co-solventes para IFAs; conversão de IFA em formas líquidas como o IFA-LI; uso de LI como extratores de compostos farmacêuticos de soluções aquosas; como meio reacional alternativo e sustentável para várias transformações orgânicas, incluindo a preparação de medicamentos e ainda sistemas ternários mediados por líquidos iônicos como potenciais portadores de IFA (AZEVEDO *et al.*, 2018; BALK; HOLZGRABE; MEINEL, 2015; RESENDE DE AZEVEDO *et al.*, 2014; SMITH, 2015; VIÇOSA *et al.*, 2012; WEBER *et al.*, 2015).

O processo de cristalização dos IFAs é realizado predominantemente em solventes orgânicos, aquosos ou em ambos (SMITH, 2015). Existem cerca de 600 solventes convencionais que são amplamente utilizados na indústria, em comparação com pelo menos um milhão de líquidos iônicos que podem ser facilmente preparados em laboratório (GREER; JACQUEMIN; HARDACRE, 2020; PLECHKOVA; SEDDON, 2008). Esse foi um dos fatores que fez com que o uso de líquidos iônicos despertasse interesse na comunidade acadêmica e meio industrial.

A forma física do IFA modula importantes propriedades, como a solubilidade, estabilidade química e física, e também pode impactar na capacidade de fabricação dos medicamentos (SMITH, 2015). Na produção de um IFA, a etapa de cristalização é imprescindível para garantir que apresente alta pureza, forma polimórfica correta, como também o hábito e tamanho das partículas que permitam o isolamento e posterior processamento (SMITH, 2015).

Diante disso e compreendendo que a isoniazida (INH) é um dos fármacos mais importantes utilizados no tratamento da tuberculose e com base em sua capacidade de formar uma diversidade de formas sólidas, surge a necessidade do estudo da cristalização da INH em LIs. A cristalização de isoniazida em solventes convencionais vem sendo estudo de diversos trabalhos, como na formação de sais de isoniazida com ácidos inorgânicos, cocristais com

ácidos carboxílicos, complexos moleculares com ácido L(+)-tartárico, ou até mesmo o crescimento da isoniazida em metanol, etanol e isopropanol (HAN *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2016; SARCEVICA *et al.*, 2013; SEVUKARAJAN *et al.*, 2011).

A cristalização de isoniazida em LIs surge como algo inovador, diante da necessidade de estudos que possam auxiliar na determinação de LIs para verificar a influência na cristalização da isoniazida. Foram sintetizados nesta tese cinco líquidos iônicos contendo o cátion colina e dois utilizando o cátion monoetanolamina. A colina é considerada uma fonte de cátion segura e de baixo custo (PEDRO *et al.*, 2020), já LIs a base de monoetanolamina apresentam resultados promissores em relação à baixa toxicidade (ZANONI *et al.*, 2019), já os ânions utilizados pertencem a lista de reagentes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS).

Com base nessas considerações, na expectativa de contribuir, em especial, com o aumento das possibilidades de solventes viáveis para a cristalização da isoniazida, foi realizado um estudo sistemático da síntese e caracterização dos líquidos iônicos hidróxido de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, citrato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, benzoato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, acetato de 2-hidroxi-etilamônio e formiato de 2-hidroxi-etilamônio e estudo na cristalização da isoniazida. Propriedades importantes como densidade e viscosidade destes LIs foram analisadas em diferentes temperaturas servindo como referencial teórico para futura aplicação dos mesmos, além do estudo da toxicidade aguda frente a *Artemia salina*. As novas formas sólidas cristalizadas de isoniazida em LIs foram caracterizadas visando observar se houve variação na estabilidade e solubilidade.

Objetivo geral

O principal objetivo desse trabalho foi sintetizar e caracterizar líquidos iônicos de baixa toxicidade. Após, utilizá-los no processo de cristalização de isoniazida e avaliar a influência dos mesmos nas características da isoniazida obtida.

Objetivos específicos

- Sintetizar líquidos iônicos a partir dos cátions colina e monoetanolamina;
- Fornecer dados de densidade e viscosidade em diferentes temperaturas;
- Analisar a síntese dos LIs por FT-IR e RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Estudar a toxicidade dos LIs sintetizados frente a *Artemia salina*;
- Analisar a cristalização da isoniazida nos LIs sintetizados;
- Caracterizar a isoniazida após a cristalização nos LIs por FT-IR, RMN de ^1H e ^{13}C , MEV, DSC, TGA, DRX e DRXM;
- Investigar a morfologia e hábito cristalino da isoniazida após a cristalização nos LIs;
- Determinar a solubilidade, estabilidade da isoniazida obtida e analisar como essas características foram modificadas;
- Avaliar a atividade antimicrobacteriana das formas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são sais que se fundem abaixo de 100 °C e apresentam potencial de minimizar o impacto ambiental induzido por alguns solventes orgânicos (KRISHNAN *et al.*, 2020). Os LIs são compostos por íons que consistem em um cátion orgânico e um ânion, este último pode ser orgânico ou inorgânico (ABBASI *et al.*, 2020). Os ânions nos LIs controlam propriedades e interações químicas, ao passo que os cátions são responsáveis por propriedades físicas, tais como: ponto de fusão, viscosidade e densidade (ABBASI *et al.*, 2020). Podendo assim, serem projetados para uma função específica, por isso são descritos como os “*designer solvents*” (AGHAEI; SOBATI, 2022).

Líquidos iônicos são uma classe de solventes com propriedades ajustáveis e têm sido amplamente utilizados como substituto para solventes orgânicos tóxicos, perigosos, inflamáveis e altamente voláteis (COSTA; FILETI, 2018), devido à sua resistência à vaporização, estabilidade térmica e capacidade de serem modificados em nível estrutural (KRISHNAN *et al.*, 2020).

Os líquidos iônicos podem ser próticos ou apróticos. Os líquidos iônicos próticos são produzidos através da transferência de prótons de um ácido Brønsted para uma base Brønsted (REIS, C. L. B. *et al.*, 2017). A principal característica que diferencia os líquidos iônicos próticos (LIPs) dos apróticos (LIAs) é a presença de um próton ativo nos cátions do líquido iônico prótico (NASRABADI; GANESAN, 2019). Entretanto, alguns experimentos já mostraram que nos LIP secos (com teor de água inferior a 20 ppm) o próton instável no cátion não é "livre" e o cátion não está sujeito a protonação-desprotonação reversível (NASRABADI; GANESAN, 2019).

Alguns líquidos iônicos, dependendo da sua natureza, podem ser candidatos potenciais a solventes, ou mesmo como veículos, pois são substâncias que podem ser introduzidos em água, óleos ou soluções alcoólicas (JÚLIO, 2017). As possibilidades de combinação de um único cátion e ânion (embora existam exemplos mais complexos) fornece 10^6 combinações possíveis de LIs (SMITH, 2015). Ou seja, existem cerca de 600 solventes convencionais usados na indústria, em comparação com pelo menos um milhão (10^6) de líquidos iônicos que podem ser facilmente preparados em laboratório (PLECHKOVA; SEDDON, 2008; SMITH, 2015).

É notório ressaltar que as potenciais aplicações técnicas e comerciais de LIs estão principalmente ligadas às suas propriedades físico-químicas únicas, como baixa pressão de vapor, múltiplas interações de solvatação com compostos orgânicos e inorgânicos, excelente estabilidade química e térmica, relativa condutividade iônica e ampla janela eletroquímica (COSTA; FILETI, 2018).

Os LIs podem apresentar baixa biodegradabilidade e devido a gama de estruturas possíveis, dados de propriedades termodinâmicas e o impacto no meio ambiente ainda são limitados, como também a preparação pode ser cara e demorada. Sendo assim,

2.2 Um breve histórico dos líquidos iônicos

O primeiro estudo sobre LIs foi relatado em 1914, quando Paul Walden sintetizou o nitrato de etilamônio, a partir da reação de neutralização entre a etilamina e o ácido nítrico concentrado (GADILOHAR; SHANKARLING, 2017). A primeira geração de LIs, proposta em meados de 1970 e 1980, baseados em cátions alquil-imidazólio e piridínio, com ânions haleto ou tetrahalogenoaluminato, foram utilizados como potenciais eletrólitos em baterias (GADILOHAR; SHANKARLING, 2017). Uma segunda geração de LIs permitiu manipular propriedades físicas e químicas através da substituição de um ânion inorgânico por uma classe de ânions orgânicos funcionais ou pela substituição do cátion, promovendo características diferenciadas quanto à hidrofobicidade e à solvatação (COSTA; FILETI, 2018).

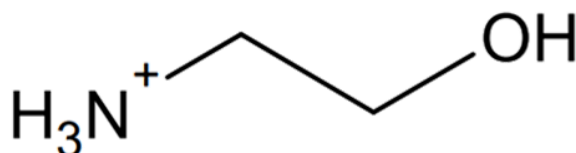
Já no início do século 21, o conceito de “*task specific ionic liquids*” como LIs de terceira geração foi introduzido por Davis e colaboradores, no qual é possível formar qualquer composição de líquido iônico específico, dependendo das propriedades químicas, físicas e biológicas requeridas (DAVIS; FORRESTER, 1999; GADILOHAR; SHANKARLING, 2017).

Já foi demonstrado que alguns LIs, como os baseados no imidazólio, apresentam maior toxicidade do que compostos orgânicos voláteis já utilizados na indústria química, como o metanol e o diclorometano (Garcia et al., 2005). Em busca de LIs ecologicamente corretos, nessa tese foram sintetizados líquidos iônicos contendo o cátion colina e monoetanolamina.

Os líquidos iônicos a base de monoetanolamina exibem na literatura resultados promissores em relação a baixa citotoxicidade (MUHAMMAD *et al.*, 2012). As vantagens da monoetanolamina, por exemplo, são o baixo custo, estabilidade térmica razoável e baixa taxa de degradação térmica (PINKERT *et al.*, 2011). As propriedades gerais dos líquidos iônicos de monoetanolamina têm sido objeto de muitos estudos no grupo de pesquisa em diferentes áreas, seja em sua capacidade de dissolver materiais lignocelulósicos (REIS, C. L. B. *et al.*, 2017) ou

na extração de ficobiliproteínas (RODRIGUES *et al.*, 2020). Na Figura 1 está representada a estrutura química do cátion monoetanolamina.

Figura 1 – Representação da estrutura química do cátion monoetanolamina ou 2-hidroxi-etilamônio.

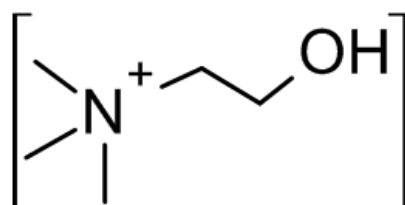


Fonte: elaborada pela autora (2021).

Já o cloreto de colina é um sal de amônio quaternário, não tóxico, barato, não inflamável e considerado benigno ambientalmente (KALLA *et al.*, 2017). Devido a essas propriedades, como também por se comportarem como solventes verdes e apresentarem excelentes desempenhos em catálise, polimerização e métodos *eco-friendly*, os pesquisadores têm desenvolvido diversos líquidos iônicos a base de colina (KALLA *et al.*, 2017).

Assim, os líquidos iônicos à base de colina poderão ser substitutos para os líquidos iônicos à base de imidazólio nas mais diversas áreas, devido a sua natureza não tóxica e biodegradável (GADILOHAR; SHANKARLING, 2017). Na Figura 2 está representada a estrutura química do cátion colina.

Figura 2 – Representação química da estrutura do cátion colina ou (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

No Tópico 2.2.1 são apontadas áreas relevantes para o uso de LIs em pesquisas farmacêuticas.

2.2.1 Líquidos iônicos em pesquisas farmacêuticas

A partir do projeto do LI a ser formado, surge a possibilidade de modificar as propriedades físico-químicas, sem a necessidade de modificar estruturalmente o próprio ingrediente farmacêutico ativo (BALK; HOLZGRABE; MEINEL, 2015). Uma área que está em grande ascensão é na aplicação de LIs na produção e entrega de insumos farmacêuticamente ativos (IFA) e no desenvolvimento de LIs projetados para serem um IFA (SMITH, 2015).

Nessa abordagem em busca da melhoria de algumas características do fármaco, o IFA é combinado com líquido iônico para criar um novo líquido iônico denominado IFA-IL (SHEKAARI *et al.*, 2019). Essa nova forma apresentada do IFA pode melhorar a solubilidade, administração de medicamentos e a biodisponibilidade devido às naturezas de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade (SHEKAARI *et al.*, 2019).

Shekaari *et al.*, 2019 estudaram o comportamento termodinâmico de glicina e L-alanina em um líquido iônico de segunda geração, o salicilato de 1-hexil-3-metilimidazólio. De acordo com os dados termodinâmicos obtidos, os autores concluíram que o LI salicilato de 1-hexil-3-metilimidazólio apresenta processo mais espontâneo de associação de íons em solução de glicina em relação à L-alanina.

Shi *et al.* (2020) descreveram o potencial de líquidos iônicos, em particular o sintetizado com bicarbonato de colina e ácido gerânico, para administração oral de um medicamento hidrofóbico, utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer, o sorafenibe (SHI *et al.*, 2020).

Com a finalidade de alterar a biodisponibilidade da rifampicina, partículas ultrafinas do fármaco foram preparadas utilizando líquido iônico (1-etil-3-metilimidazólio metil-fosfonato) como solvente alternativo e tampão de fosfato como anti-solvente (VIÇOSA *et al.*, 2012).

Existem inúmeras possibilidades de líquidos iônicos e algumas drogas são pouco solúveis em solventes convencionais, com isso, a cristalização utilizando LI se torna pertinente. Tem-se o caso do LASSBio-294, uma droga pouco solúvel em solventes orgânicos convencionais, limitando a operação (AZEVEDO *et al.*, 2018). Azevedo *et al.* (2018) utilizaram o LI 1-etil-3-metilimidazólio metilfosfonato como solvente e água como anti-solvente com o intuito de possibilitar novas perspectivas para melhorar a taxa de dissolução do LASSBio-294.

Weber *et al.* (2015) analisaram o uso de LI bis(trifluorometanossulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidazólio na cristalização por resfriamento de uma variedade de IFAs (acetaminofeno, fenofibrato, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, itraconazol, griseofulvina, ácido

salicílico, naproxeno, amoxicilina, etomidato, dentre outros). As curvas de solubilidade dos IFAs nesse LI, o estabeleceu como potencial solvente para cristalização (WEBER *et al.*, 2015).

Outra vertente da utilização de LIs em fármacos está no controle de polimorfismo. An *et al.* (2016) utilizaram os LIs tetrafluoroborato de 1-alil-3-etilimidazólio, tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetilimidazólio e tetrafluoroborato de 1,3-dialilimidazólio como co-solventes, utilizando o método de cristalização “*drowning-out*” para controlar o fenômeno que induz a rápida transformação de fase da forma I para a forma II do polimorfo do bissulfato de clopidogrel (AN *et al.*, 2016), o “*drowning-out*” consiste em adicionar um segundo solvente (antissolvente) reduzindo a solubilidade do soluto.

Frizzo e colaboradores têm estudado a autoassociação de líquido iônico com líquido iônico e heteroassociação de líquido iônico com fármaco (FRIZZO *et al.*, 2015b, 2015a, 2016, 2018). Os dados obtidos no estudo de agregação, como a concentração de agregação crítica (CAC) e parâmetros termodinâmicos, como entalpia, entropia e energia livre de Gibbs, permitem determinar a contribuição das interações de van der Waals e também os efeitos eletrostáticos da estrutura do líquido iônico no processo de agregação, comparando assim a autoassociação de líquido iônico com líquido iônico em solvente, como também a heteroassociação do líquido iônico com o fármaco em solvente (BENDER, 2018).

Não foi encontrado na literatura estudo da associação de líquidos iônicos com isoniazida (fármaco escolhido para os estudos de cristalização em LIs), nem cristalização de isoniazida em LIs. Apenas o estudo da solubilidade da isoniazida em líquidos iônicos comerciais, que será discutido mais a frente, no Tópico (2.5.2).

2.3 Isoniazida

A isoniazida (ácido isonicotínico; hidrazida do ácido isonicotínico; hidrazida do ácido 4-piridinocarboxílico; INH) é um dos mais importantes fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. Trata-se de uma droga bactericida potente que tem como alvo a parede celular micobacteriana (ARBEX *et al.*, 2010; PERDIGÃO; PORTUGAL, 2019).

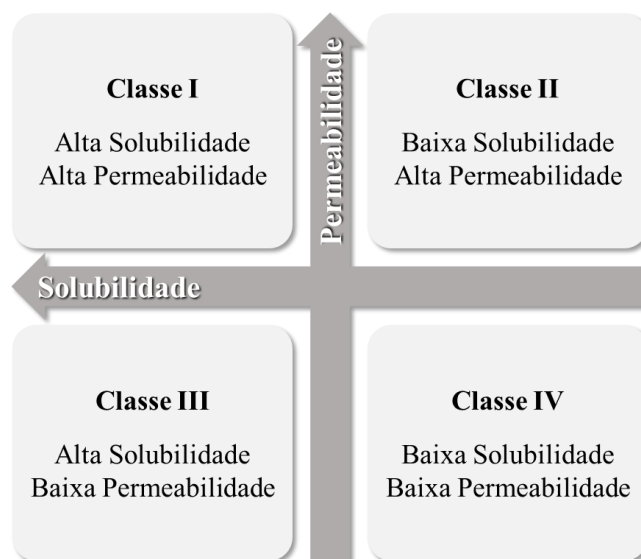
A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica, que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como Bacilo de Koch, identificado pela primeira vez pelo cientista alemão Robert Koch (1843-1910) em 1882 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A tuberculose é uma doença transmissível e uma das principais causas de morte em todo o mundo, até pandemia de coronavírus (COVID-

19), a tuberculose era a principal causa de morte em um único agente infeccioso, ultrapassando HIV/AIDS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Estima-se que em 2019, aproximadamente 10 milhões de pessoas adoeceram de tuberculose no mundo e 1,2 milhão de pessoas morreram em decorrência dela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). No Brasil, em 2019, foram diagnosticados 73.864 novos casos de tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020), já em 2020 registrou 66.819 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O sistema de classificação biofarmacêutica (BCS-*Biopharmaceutics Classification System*) é uma ferramenta do FDA (*Food and Drug Administration*), proposta em 1995 por Amidon *et al.*, que categoriza os fármacos em quatro classes de acordo com a sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal (Figura 3) (AMIDON *et al.*, 1995; CHARALABIDIS *et al.*, 2019). A isoniazida apresenta solubilidade em água a 25 °C de 137,96 mg/mL (DINIZ *et al.*, 2018a). É um fármaco de classe I ou III do sistema de classificação, sendo considerado um fármaco que não há problema de taxas de solubilidade/dissolução em água (DINIZ *et al.*, 2018a).

Figura 3 – Esquema do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

De acordo com as diretrizes da FDA, um IFA (insumo farmacêutico ativo) é considerado altamente solúvel se sua maior dose administrada oralmente de uma só vez, como uma formulação de liberação imediata, puder ser dissolvida em ≤ 250 mL de meio aquoso a um

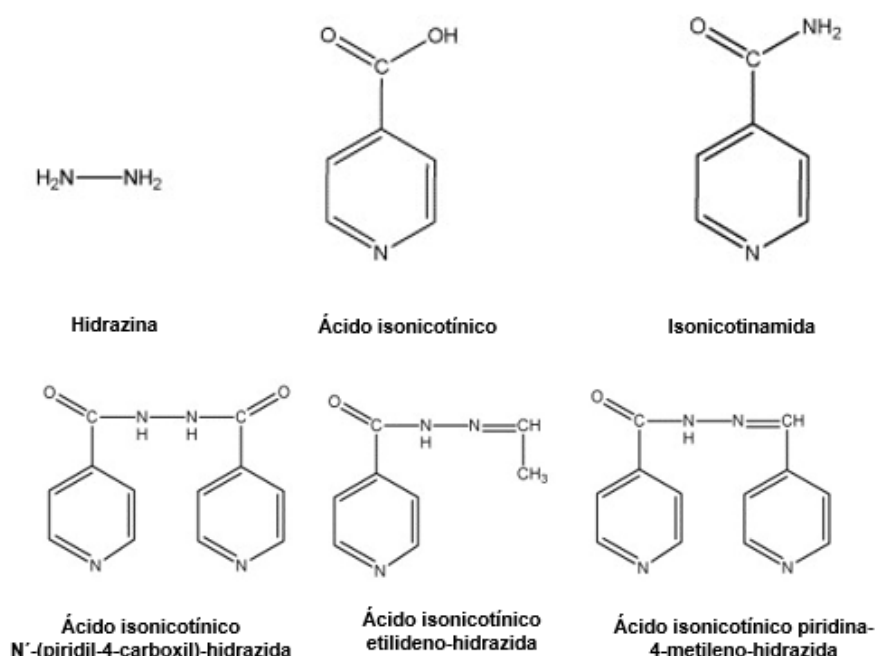
pH de 1 a 6,8 e uma temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018; ANVISA, 2018; CHARALABIDIS *et al.*, 2019).

Designa-se alta permeabilidade de um IFA, se a fração absorvida atingir 85% ou mais da dose administrada, na ausência de instabilidade do trato gastrointestinal (ANVISA, 2018; CHARALABIDIS *et al.*, 2019). Já para o IFA ser considerado como rapidamente dissolvido, tem que se dissolver $\geq 85\%$ dentro de 30 minutos, nos meios de dissolução utilizados,; HCl 0,1 N ou fluido gástrico simulado especificado pela USP (*United States Pharmacopeia*) sem enzimas, tampão de pH 4,5 e tampão de pH 6,8 ou fluido intestinal simulado especificado pela USP sem enzimas (CHARALABIDIS *et al.*, 2019).

Tendo em vista o objeto de estudo dessa tese, a isoniazida, um das limitações enfrentados com seu uso é que com o tempo e em condições inadequadas de armazenamento, ela se hidrolisa, resultando na formação de hidrazina (DOS REIS, F. D. *et al.*, 2014).

A hidrazina é conhecida por ser tóxica e cancerígena (DOS REIS, F. D. *et al.*, 2014). Alguns dos produtos de degradação da isoniazida demonstrado no trabalho de Bhutani *et al.* são mostrados na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura química dos produtos de degradação da isoniazida.



Fonte: adaptado de Bhutani *et al.*, 2007.

Outro fator que merece atenção é que na presença de outros fármacos tuberculostáticos, como no caso das formulações em doses fixas combinadas, a isoniazida sofre

reações cruzadas, ocasionando assim a degradação da molécula, acarretando perdas significativas da concentração dos princípios ativos nos comprimidos (CHERUKUVADA; NANGIA, 2012; DINIZ, 2017).

Como também, devido à alta higroscopicidade do etambutol, a isoniazida e rifampicina sofrem degradação, por meio da formação de metabólitos inativos, podendo ocasionar a diminuição da biodisponibilidade da rifampicina e isoniazida no organismo (BHUTANI; SINGH; JINDAL, 2005). Diniz, 2017, relata que a tendência dos sais de etambutol de serem higroscópicos é devido aos arranjos cristalinos que permitem que haja uma interação muito pronunciada com moléculas de água, levando na maioria das vezes ao colapso da estrutura.

Shishoo *et al.* (1999) determinaram a estabilidade da rifampicina em formulações que continham isoniazida e compararam com formulações sem isoniazida, a partir da degradação de rifampicina em 3-formil-rifamicina SV. Foi possível observar que a taxa de degradação da rifampicina na presença de isoniazida foi quase duas vezes maior que a da rifampicina sozinha. A degradação da rifampicina sozinha após ensaio de 45 min foi de 12,4%, enquanto na presença da isoniazida aumentou para 21,5% de degradação nas mesmas condições (SHISHOO *et al.*, 1999). Mediante isso, são necessárias novas formulações farmacêuticas de antibióticos para a tuberculose com atividade prolongada e melhores propriedades (GAO *et al.*, 2016).

São inúmeras as pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos para tratar a tuberculose, enquanto essas pesquisas estão em andamento, surgem tentativas de aumentar a eficácia dos medicamentos já existentes (AITIPAMULA *et al.*, 2013). Então, torna-se de fundamental importância o estudo do comportamento da isoniazida cristalizada em líquidos iônicos. No Tópico 2.4 será abordado o conceito de IFAs e os tipos de modificações cristalinas.

2.4 Insumos farmacêuticos ativos e modificações cristalinas

Os sólidos farmacêuticos podem se apresentar em distintas formas sólidas e cada umas dessas formas podem exibir propriedades físico-químicas únicas, como por exemplo a morfologia, biodisponibilidade, dissolução e estabilidade.

Mediante isso, nos subtópicos 2.4.1, 2.4.2 e 2.4.3 serão abordados o conceito de insumos farmacêuticos ativos, os tipos de sólidos farmacêuticos existentes e cristalização de IFAs, respectivamente.

2.4.1 *Insumos farmacêuticos ativos*

Geralmente as formulações farmacêuticas industriais podem ser encontradas na forma de comprimidos, cápsulas e pós, constituídas de ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) e excipientes (ou mistura de excipientes), correspondentes à matriz do comprimido, ou a solução em que o IFA está suspenso, ou outro material que seja farmacologicamente inerte (HONG; MANJUNATHA REDDY; NISHIYAMA, 2020). O IFA é uma substância química ativa, fármaco, droga ou matéria-prima com ação farmacológica e finalidade medicamentosa, ou seja, trata-se do princípio ativo do medicamento (ANVISA, 2018).

Garantir a segurança dos produtos farmacêuticos é uma responsabilidade primordial dos químicos, engenheiros farmacêuticos e de quem está envolvido em sua fabricação, sejam os produtos destinados para fins comerciais ou para investigação clínica (ROBINSON, 2010). É requerida atenção especial em relação à qualidade e pureza das matérias-primas, especialmente dos IFAs (ROBINSON, 2010). É notório ressaltar que uma substância medicamentosa conterà uma série de compostos com baixo nível de impurezas, oriundas, por exemplo, de resíduos de solventes e catalisadores, intermediários ou produtos secundários gerados pelos processos sintéticos ou reações de degradação, com isso, precisam ser identificadas e controladas dentro de limites rígidos (ANVISA, 2019; ROBINSON, 2010).

Geralmente a fase de desenvolvimento e otimização de qualquer produto do gênero farmacêutico é governada por farmacopeias (no caso de produtos bem estabelecidos) ou por agência específica (ALAM; KAUR; PORWAL, 2018).

Para tornar a formulação estável, o procedimento de avaliação deve ser adequadamente justificado e controlado com eficiência. Portanto, parâmetros críticos de teste de qualidade devem ser definidos com prioridade (ALAM; KAUR; PORWAL, 2018; SHUREN, 2006). Existe uma grande pressão sob as agências reguladoras para acelerar o desenvolvimento, revisão e aprovação de medicamentos para doenças graves (JOPPI *et al.*, 2020).

Aproximadamente dois terços dos IFAs são administrados em formas sólidas, tendo em vista que a estrutura afeta fortemente a estabilidade, solubilidade e também a eficácia (ZHAO *et al.*, 2018). Com isso, os IFAs são frequentemente preparados em diferentes formas sólidas, com o intuito de identificar as formas mais adequadas para a formulação (ZHAO *et al.*, 2018). Cada forma farmacêutica apresenta propriedades únicas e que podem influenciar expressivamente na biodisponibilidade, solubilidade, estabilidade, processo de manufatura, purificação e outras características de desempenho dos fármacos (OLIVEIRA; LIMA, 2017; PRADO; ROCHA, 2015).

2.4.2 Tipos de sólidos farmacêuticos

Dentro do campo farmacêutico, os IFAs podem existir numa variedade de formas sólidas distintas, dentre elas, sólidos amorfos, polimorfos, solvatos, hidratos, sais e cocristais (ANVISA, 2017).

Os sólidos amorfos consistem em arranjos desordenados de moléculas do insumo farmacêutico ativo que não possuem uma estrutura de cristal. O fármaco na sua forma amorfa torna favorável o aumento da solubilidade, tendo em vista que esse tipo de forma sólida apresenta elevada energia e uma maior área de superfície em contato com o meio que haverá a dissolução (SOPHIE ISABELLE COELHO REY, 2017). Já os polimorfos são IFAs com mesma fórmula molecular, no entanto, apresentam diferentes estruturas cristalinas (ANVISA, 2017; GIONDA *et al.*, 2018; SOPHIE ISABELLE COELHO REY, 2017).

A existência de IFAs altamente funcionais possibilita a vários modos de auto-organização, fazendo com que esse recurso e a flexibilidade conformacional sejam as principais causas para a existência de polimorfismo de cristal (ALMARSSON; ZAWOROTKO, 2004; FLEISCHMAN *et al.*, 2003).

Os IFAs são por sua vez predispostos à auto-organização e ao aumento da possibilidade de rearranjo supramolecular, devido ao elevado número de grupos funcionais (ANDRE; TERESA, 2011; FLEISCHMAN *et al.*, 2003). Contudo, o empacotamento de cristais de IFAs proporciona uma menor previsibilidade quando comparados com produtos orgânicos, devido ao fato de possuir vários caminhos para auto-organização, tornando-os predispostos a exibir polimorfismo (FLEISCHMAN *et al.*, 2003).

Os principais mecanismos pelos quais moléculas orgânicas podem se empacotar em rede cristalina são os polimorfismos orientacionais e os conformacionais. Esse primeiro ocorre quando mudanças no ordenamento das moléculas são responsáveis pela diferença na estrutura do sólido (DINIZ, 2017). Já o polimorfismo conformacional é obtido quando moléculas conformacionalmente flexíveis podem se contorcer de tal forma que são capazes de se empacotarem de diferentes formas na rede cristalina (DAS; ENGEL; BARBOUR, 2010; DINIZ, 2017; NANGIA, 2008).

A solubilidade é um das propriedades que mais é afetada pelo polimorfismo, sendo que este é um fator determinante para a dissolução e absorção do fármaco, é notório ressaltar que um sólido farmacêutico, com boa solubilidade em determinada forma polimórfica, pode apresentar uma nova forma polimórfica, com redução na solubilidade ou até mesmo ausente, resultando em perda de atividade biológica, ou com solubilidade aumentada, resultando em

toxicidade no organismo (ANTONIO, 2010; ANVISA, 2017). A ocorrência de polimorfos pode ocorrer na matéria prima (princípio ativo), na produção e/ou no armazenamento do fármaco (ARAUJO GLB *et al.*, 2012).

Os IFAs podem ser ainda pseudopolimorfos, que são complexos moleculares com moléculas de solventes/água agregados a sua estrutura cristalina (NIE; MO; BYRN, 2018). Os solventes tem a capacidade de se associar com o sólido cristalino de diversas maneiras, podendo ligar tanto a superfície, quanto a rede do sólido por meio de interações intermoleculares, sejam elas ligações de hidrogênio, van der Waals ou dipolo-dipolo, podendo ser fisicamente aprisionado pelo cristal em crescimento ou ainda ser absorvido por regiões desordenadas do cristal (ANVISA, 2017).

A água é uma molécula pequena e com alta capacidade de ligação de hidrogênio, podendo então fazer parte da estrutura cristalina do princípio ativo, este tipo de pseudopolimorfismo recebe o nome de hidrato, assim, quando solventes são incorporados a estrutura cristalina do princípio ativo, esse tipo de pseudopolimorfismo denomina-se solvato (PROHENS; PUIGJANER, 2007; SEVILLANO, 2019).

As propriedades físico-químicas de um dado composto que apresenta diferentes polimorfos, preconizam sua aplicabilidade como, também, os benefícios propostos pelo IFA, sendo elas: solubilidade, perfil de dissolução, ponto de fusão, fluidez, espectro molecular, dureza, cristalinidade, cor, estabilidade, higroscopicidade, ponto de ebulição, índice de refração, densidade, volume, condutividade elétrica ou térmica, difração de raio X, estabilidade química e reações no estado sólido (NARDINO, 2018; VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001).

Têm-se ainda os cristais do tipo multicomponente (ou seja, um cocrystal ou sal), que para a sua formação deve haver algum tipo de interação entre as moléculas ou íons que compõe o cristal. Essas interações devem ser não covalentes e, portanto, supramoleculares (BERRY; STEED, 2017).

Com o intuito de melhorar as propriedades físico-químicas dos IFAs como a biodisponibilidade, solubilidade e estabilidade surgiram pesquisas na formação de sais e cocrystal farmacêuticos, visando melhorar tais propriedades no estado sólido sem alterar o comportamento terapêutico (DELLING, 2016).

Um sal é obtido a partir de uma reação ácida entre um IFA e uma substância com caráter ácido ou básico (IWATA; KARASHIMA; IKEDA, 2017), na qual ocorre uma transferência de cargas entre o IFA e o ácido ou base incorporado à unidade constituinte do cristal, ou seja, há a transferência de um próton (H^+) de um ácido para uma base, sendo essa

transferência de cargas que caracteriza a formação de um sal (ANVISA, 2017; IWATA; KARASHIMA; IKEDA, 2017).

Tem-se datado que o primeiro cocrystal foi relatado em 1844 pelo químico alemão Friedrich Wöhler, que formou um cocrystal de quinona e hidroquinona, porém, o termo foi criado por MT Etter *et al.* em 1992 (ROSS; LAMPROU; DOUROUMIS, 2016). Diante dessa descoberta, surgiu o conceito de cocrystal, que são materiais monofásicos cristalinos neutros compostos por dois ou mais compostos moleculares e/ou iônicos diferentes, geralmente em uma razão estequiométrica que não são solvatos e nem sais simples (KARIMI-JAFARI *et al.*, 2018).

Os guias da *Food and Drug Administration* (FDA) definem cocrystal como sendo materiais cristalinos compostos de duas ou mais moléculas diferentes, tipicamente fármacos e formadores de cocrystal ("coformadores"), na mesma estrutura cristalina (ANVISA, 2017). A principal diferença entre cocrystal e sais está na posição do próton, em que nos sais o próton está completamente transferido, já nos cocrystal seus componentes estão em um estado neutro e não interagem ionicamente (ANVISA, 2017; DELLING, 2016).

Com a expansão das pesquisas em relação a cocrystal, surgiram as mais diversas áreas de aplicação com intuito de melhoria de propriedades físicas, que são elas: a melhoria na solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade, ponto de fusão, propriedades mecânicas e como também em mascaramento de sabor (KARIMI-JAFARI *et al.*, 2018).

É bem estabelecido na literatura a possibilidade de prever a formação do sal ou cocrystal e uma das formas utilizada é "a regra do pKa", que estipula que quando a diferença de unidades de pKa (ΔpK_a) entre uma base e um ácido, ou seja, $\Delta pK_a = pK_a(\text{ácido}) - pK_a(\text{base})$, na reação química for maior que três, resulta na formação de um sal (DINIZ, 2017; LEMMERER *et al.*, 2015; RAHEEM THAYYIL *et al.*, 2020; ROCHA, A. B. O. *et al.*, 2016). Contudo, se essa mesma diferença assumir valores menores ou iguais a zero, poderá ser formado um cocrystal como produto da reação, se o ΔpK_a estiver entre o intervalo de 0 a 3, pode-se formar sais ou cocrystal, ficando imprescindível a utilização de outras análises para confirmar a natureza química do produto formado (DINIZ, 2017; LEMMERER *et al.*, 2015; RAHEEM THAYYIL *et al.*, 2020; ROCHA, A. B. O. *et al.*, 2016).

A morfologia do cristal desempenha um papel crucial na modulação das propriedades físicas e químicas dos materiais relevantes para a indústria farmacêutica (HAN *et al.*, 2019). Sabendo que a etapa de cristalização é importante no desenvolvimento de um IFA, no próximo tópico será abordado os conceitos e influências da cristalização.

2.4.3 *Cristalização de IFAs*

A cristalização é um processo que permite a formação e purificação de muitos ingredientes farmacêuticos ativos promovendo partículas sólidas com a morfologia desejada, forma e pureza de cristais, que são cruciais para o controle das propriedades físico-químicas de um composto (JONES; BIMBO, 2020). Propriedades moleculares específicas (polimorfismo) e particuladas (hábito do cristal e o tamanho de partícula) de produtos farmacêuticos podem ser obtidas a partir da cristalização controlada (LEMANOWICZ *et al.*, 2021).

Essas propriedades moleculares e particuladas governam a capacidade de fabricação, estabilidade e desempenho biofarmacêutico dos medicamentos (LEMANOWICZ *et al.*, 2021). É possível mudar a forma externa de um cristal, ou seja, o hábito do cristal, que é consequência da taxa na qual as faces crescem (EL-ZHRY EL-YAFI; EL-ZEIN, 2014). As mudanças no empacotamento interno geralmente fornecem uma variação facilmente distinguível no hábito do cristal (EL-ZHRY EL-YAFI; EL-ZEIN, 2014).

A cristalização é altamente sensível às condições do processo, tais como a temperatura, nível de supersaturação, contaminação, vibrações ou agitação (ARTUSIO; PISANO, 2018) e ao tipo de solvente utilizado. Uma pequena variação em apenas uma dessas condições pode ocasionar propriedades físico-químicas diferentes do produto final (ARTUSIO; PISANO, 2018). Com isso, o hábito do cristal, a morfologia descontrolada de cristais ou mudanças indesejadas entre formas polimórficas são algumas das questões mais preocupantes da indústria farmacêutica (ARTUSIO; PISANO, 2018). Tais efeitos acarretam em distribuição não homogênea de medicamentos na forma de dosagem, o que afeta a uniformidade do sistema, bem como, a cinética de liberação de medicamentos e a estabilidade física durante o armazenamento (SEIF; FRANZEN; WINDBERGS, 2015; SHEKUNOV; YORK, 2000).

A Tabela 1 apresenta algumas características consideradas importantes de administração de medicamentos no estado sólido que são afetadas pela cristalização.

Tabela 1 – Algumas das propriedades no estado sólido modificadas pelo processo de cristalização.

Propriedades do estado sólido	Efeito na substância e/ou medicamento
Estrutural	
Cristalinidade (existência de formas amorfas e semicristalinas)	Estabilidade física e química.
Polimorfos	Umidade relativa (%) - higroscopicidade.
Solvatos (hidratos)	Perfil de solubilidade e taxa de dissolução.
Sais	Todos os aspectos do processamento.
Defeitos no cristal	
Dimensional	
Distribuição de tamanho de partícula	Comportamento do processamento: densidade aparente, aglomeração, fluxo/reologia, compactação
Morfologia de partículas	Permeabilidade de partículas (adsorção de partículas);
Estrutura da superfície das partículas	Biodisponibilidade (absorção do medicamento); Consistência e uniformidade da forma de dosagem.
Químico	
Impurezas orgânicas e inorgânicas, solventes residuais e produtos de decomposição.	Toxicidade.
Formas quirais e separação quiral.	Estabilidade química, física e enantiomérica.
Esterilidade (limites microbianos).	
Mecânico	
Transições quebradiças/dúcteis, tensão de fratura, relaxamento de tensão / tensão, pressão de escoamento, módulo de Young.	Comportamento de fresagem e compressão.
Elétrico	
Distribuição de carga eletrostática	Propriedades de aglomeração e fluxo.

Fonte: Shekunov e York (2000).

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para a obtenção de diferentes formas cristalinas, como cristalização a partir da fusão, sublimação, cristalização a partir de um solvente ou de uma mistura de solventes, alteração do pH da solução, adição ou presença de aditivos, secagem, moagem, dentre outros (PRADO; ROCHA, 2015).

A técnica de cristalização da isoniazida utilizada nessa tese foi por evaporação do solvente e baseia-se na indução da saturação da solução pela evaporação do solvente, até que o soluto (isoniazida) cristalize. Nessa solução foi adicionada uma quantidade equimolar de líquido iônicos afim de observar a influência na cristalização da isoniazida.

2.5 Isoniazida: estratégias encontradas na literatura que visam seu aperfeiçoamento

A isoniazida é considerada um reagente supramolecular muito útil para sintetizar novas estruturas supramoleculares, devido ao anel piridínico e o grupo carbohidrazida da isoniazida atuarem como aceitadores de ligações de hidrogênio para ácidos carboxílicos na forma de átomos de O e N e doadores na forma de três átomos de H, respectivamente (BABU *et al.*, 2013; MASHHADI *et al.*, 2016).

Aitipamula *et al.* (2013) estudaram a formação de polimorfos e cocristais a partir de conformadores farmacologicamente aceitáveis, como a nicotinamida, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido fumárico e ácido succínico. Nos ensaios de solubilidade e dissolução, o cocrystal INH-NA-SA (isoniazida com nicotinamida e ácido succínico) apresentou maior solubilidade e a taxa de dissolução é comparável a isoniazida padrão. Todos os outros cocristais obtidos nesse estudo se dissolveram mais lentamente e a solubilidade de equilíbrio foram menor que a solubilidade da INH padrão (AITIPAMULA *et al.*, 2013).

Babu *et al.* (2013) sintetizaram cocristais de isoniazida com conformadores que possuem um grupo funcional de ácido carboxílico, no caso, o metil-parabeno (BABU *et al.*, 2013).

Outros novos cocristais desse medicamento antituberculose foram propostos por Diniz *et al.* (2018a) com ácidos carboxílicos aromáticos, como o ácido *p*-nitrobenzoico, ácido *p*-cianobenzoico e ácido *p*-aminobenzoico, e os autores observaram que a formação do cocrystal é principalmente impulsionada pelos sítions formados pelas porções piridina e hidrazida (DINIZ *et al.*, 2018b). Esse termo sítion supramolecular foi introduzido por Corey em 1967 e mais tarde designado por Desijaru 1995 como "unidade estrutural dentro das supermoléculas que pode ser formada e/ou montadas por operações sintéticas conhecidas envolvendo interações intermoleculares" (DESIRAJU, 1995; SANDHU *et al.*, 2021).

Verificou-se a formação de dois polimorfos de isoniazida com o ácido *p*-aminobenzoico, no qual os grupos ácidos COOH são ligados por ligações de hidrogênio aos grupos piridina e hidrazida, dando origens aos heterosítions de ácido / piridina e ácido / hidrazida (DINIZ *et al.*, 2018b). Já os cocristais obtidos de isoniazida com *p*-cianobenzoico e isoniazida com *p*-nitrobenzoico, os grupos ácidos COOH são relacionados apenas à fração piridina (DINIZ *et al.*, 2018b).

Com o objetivo de expandir a possibilidade de sítions supramoleculares da isoniazida, a formação de sais com ácido oxálico, ácido maleico e ácido metanossulfônico,

exibindo estruturas estabilizadas pelas interações N-H \cdots O, C-H \cdots O e $\pi\cdots\pi$ também foram estudadas por Diniz *et al.* (DINIZ *et al.*, 2018a).

Bhat *et al.* 2016 sintetizaram cocrystal a partir de uma mistura equimolar de isoniazida com piridina-4-carbohidrazida e isotiocianato de *p*-clorofenilo, a formação do cocrystal foi confirmada por raios X por monocristal.

Danylyuk *et al.* (2015) demonstraram o papel do solvente na cocrystalização da droga anti-tuberculose isoniazida com hospedeiro *p*-sulfonato calix[4]areno C4S (DANYLYUK *et al.*, 2015). Já Gao *et al.* (2016) investigaram a síntese de um novo complexo supramolecular hospedeiro-hóspede da isoniazida com $\alpha,\alpha',\delta,\delta$ -tetramethyl-cucurbit[6]uril (TMeQ[6]) (GAO *et al.*, 2016).

Dragostin *et al.* (2019) estudaram a reação de condensação entre a isoniazida e três tipos de benzaldeídos aromáticos, como o benzaldeído, 2-nitro-benzaldeído e 4-bromo-benzaldeído (DRAGOSTIN *et al.*, 2019). Kamalakaran (2018) relatou a formação de um sal (com ácido γ -resorcilico) e dois cocristais (com floroglucinol e ácido gálico) de isoniazida (KAMALAKARAN, 2018). Estudos relataram também a síntese de duas formas de cocristais de isoniazida com ácido gálico, obtidas por evaporação lenta da mistura 1:1 molar dos dois componentes em solução de metanol:água e etanol:água (KAUR *et al.*, 2014).

Outros pesquisadores que também analisaram a síntese de cocristais com ácido gálico e outros tipos de ácidos hidroxibenzoicos como o ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido 3,5-dihidroxibenzoico e ácido 3-hidroxibenzoico foram Mashhadi *et al.* (2014). Na análise da estrutura do cocrystal, foi confirmada a existência de sinton piridina – ácido carboxílico nos cocristais de isoniazida com ácido gálico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico e ácido 3-hidroxibenzoico e sinton piridina – grupo hidroxila em cocrystal obtido a partir de ácido 3,5-dihidroxibenzoico (MASHHADI *et al.*, 2014).

Mashhadi e colaboradores (2016) relataram ainda a síntese de cocrystal de isoniazida, utilizando dessa vez o ácido protocatecúico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico). A análise da estrutura do cocrystal confirmou a existência de sinton de piridina - ácido carboxílico, com a utilização desse agente antioxidante o cocrystal obtido apresentou estabilidade melhorada numa atmosfera a 80 °C por um período de 24 horas, quando comparado com a isoniazida padrão (MASHHADI *et al.*, 2016).

Melo *et al.* (2016) analisaram a formação de novos sais de isoniazida com ácidos inorgânicos, os ácidos hidrobromídrico, nítrico e sulfúrico, e eles observaram que a reação de isoniazida com ácido sulfúrico dá origem a duas formas, um sal de sulfato de isoniazida e sal de sulfato de isoniazida hemi-hidratado. Nas formas de sulfato, os cátions aparecem cercados

pelos ânions, sendo conectados a eles através de seus grupos piridínio e hidrazida (MELO *et al.*, 2016). O perfil térmico demonstrou-se distinto da isoniazida, apresentando temperatura de fusão de 203-205 °C para o sulfato de isoniazida (sulfato de 2-(4-piridiníocarboxil)hidrazina) (MELO *et al.*, 2016).

Sais e cocristais de isoniazida também foram sintetizados utilizando ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 2,6-, dihidroxibenzoico, ácido 3-aminobenzoico e ácido *o*-ftálico (ORUGANTI *et al.*, 2016).

O nível de degradação da isoniazida depende das condições de armazenamento e composição da formulação, com o intuito de aumentar a sua estabilidade, Sarcevic *et al.* (2013) propuseram a formação de cocristais utilizando ácido benzoico, ácido sebáico, ácido subérico e ácido cinâmico (SARCEVICA *et al.*, 2013). No estudo, os cocristais de isoniazida com ácido benzoico e isoniazida com ácido malônico se decompõem após 2 e 4 semanas de armazenamento, respectivamente. Já os obtidos com ácido cinâmico e outros ácidos dicarboxílicos são estáveis por longos períodos a 30 °C e 75% de umidade relativa (SARCEVICA *et al.*, 2013).

Existem trabalhos ainda que utilizam isoniazida como conformador, com a finalidade de aumentar a solubilidade em água ou tampões que simulem os fluídos gástricos simulado de um medicamento pouco solúvel. Por exemplo, como estudado por Pessoa *et al.* (2019), que utilizaram a técnica de gás anti-solvente para a síntese de cocristais de resveratrol, utilizando a isoniazida e nicotinamida como seus coformadores (PESSOA *et al.*, 2019).

No trabalho de Sevukarajan *et al.* (2011), a inserção de ácido L (+) tartárico na isoniazida formou complexos moleculares, que foi comprovado pela análise de FT-IR. Contudo, a caracterização farmacêutica mostrou que o complexo formado apresentou menor atividade antituberculosa quando comparada à isoniazida padrão (SEVUKARAJAN *et al.*, 2011).

Han *et al.* (2019) propuseram a formação de cristais de isoniazida em diferentes tipos de solventes usando a técnica de cristalização (HAN *et al.*, 2019). Diferentemente dos trabalhos já supracitados nesse tópico, Han *et al.* não usaram conformadores, ou seja, não obtiveram cocristais ou sais, eles observaram o crescimento da isoniazida nos solventes. Foi observado que em água, os cristais crescem em forma de agulha enquanto em álcoois como metanol, etanol e isopropanol, os cristais se apresentam em forma de bastão (HAN *et al.*, 2019).

Alguns fatores podem ser influenciados pela morfologia do cristal, que são eles a densidade, fluidez e compressibilidade de uma droga, podendo afetar assim o processamento a jusante, como armazenamento, moagem e comprimidos, bem como a biodisponibilidade dos

produtos finais (HAN *et al.*, 2019). Geralmente, o crescimento do cristal é governado por fatores termodinâmicos e cinéticos (HAN *et al.*, 2019).

É notório ressaltar que a gama de solventes disponíveis para a cristalização é limitada e as propriedades do solvente nem sempre são ideais para um determinado processo (SMITH, 2015). Além disso, o uso de solventes em grande quantidade tem um impacto, ambiental e no custo, significativo no processo (SMITH, 2015).

A substituição de solventes nocivos e voláteis que são tradicionalmente utilizados em processos industriais é um tema que tem gerado grande interesse nos últimos anos (HEJAZIFAR; LANARIDI; BICA-SCHRÖDER, 2020).

Diante desse cenário, surge também a possibilidade de utilizar líquidos iônicos na cristalização de novas substâncias e formulações.

2.5.1 Solubilidade da isoniazida em líquidos iônicos

Para selecionar o solvente apropriado e projetar a técnica de cristalização ideal da isoniazida é de suma importância a determinação sistemática de dados físico-químicos, como solubilidade e entalpia de dissolução em diferentes sistemas de solventes (HAN *et al.*, 2019). Estudos da triagem de solventes são essenciais para otimizar características fundamentais de compostos farmacêuticos (solubilidade, polimorfismo, cristalinidade e hábito cristalino).

Conseguir eficiente solubilidade de isoniazida em solventes alternativos, como o líquido iônico, pode abrir novas perspectivas no processamento farmacêutico, por serem mais vantajosos que os solventes convencionais em termos de volatilidade, inflamabilidade e além do que podem abrir novas possibilidades (FORTE *et al.*, 2012). Líquidos iônicos têm comprovado aplicações sustentáveis em reações e separações, principalmente devido às propriedades serem ajustáveis, como estabilidade térmica e alto poder de solvente (FARIA; BOGEL-LUKASIK, 2015; FORTE *et al.*, 2012).

Diante das amplas aplicações dos LIs, principalmente como substitutos de solventes tradicionais em processos industriais, muitas vezes tóxicos, inflamáveis e altamente voláteis, os LIs foram considerados em 2003 “solventes do futuro” (FORTE *et al.*, 2012; GREER; JACQUEMIN; HARDACRE, 2020). Além disso, os líquidos iônicos são promissores na área farmacêutica, devido à sua grande versatilidade em termos de desenho de estruturas químicas voltadas para uma aplicação alvo (PEDRO *et al.*, 2020).

Dados de solubilidade de isoniazida em líquidos iônicos ainda são muito limitados. Um grupo de pesquisa estudou a solubilidade de isoniazida em líquidos iônicos comerciais

baseados em imidazólio, como o: 1-etil-3-metimidazólio bis(trifluorometilsufonil)-imidato; 1-butil-3-metimidazólio bis(trifluorometilsufonil)-imidato; 1-hexil-3-metimidazólio bis(trifluorometilsufonil)-imidato; 1-metil-3-octilimidazólio bis(trifluorometilsufonil)-imidato; 1-decil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsufonil)-imidato e 1-decil-3-metilimidazólio bis(trifluorometanosulfonato) (FORTE *et al.*, 2012). E líquidos iônicos de amina, como: nitrato de didecildimetilamina; etil(2-hidroxi-1-etil)-dimetilamina bis(trifluorometilsufonil)-imidato e nitrato de (benzil)-dimetilalquilamina.

Diante disso, esse trabalho surge como inovador no estudo do comportamento de líquidos iônicos obtidos a partir do cátion colina e monoetanolamina na cristalização da isoniazida, além do estudo da interação isoniazida:líquido iônico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos deste trabalho está dividido na síntese e caracterização dos líquidos iônicos estudados (Tópicos 3.1 a 3.5), síntese e caracterização das formas LI:INH (Tópicos 3.6 a 3.7), estudo da solubilidade no equilíbrio (Tópico 3.8), estabilidade em atmosfera acelerada (Tópico 3.9) e atividade antimicobacteriana (Tópico 3.10).

3.1 Escolha dos ácidos e bases para síntese dos líquidos iônicos

Nesta tese, buscou-se utilizar ácidos e bases afirmados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para sintetizar os líquidos iônicos, sendo estes: ácido sulfúrico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico e cloreto de colina. Também, teve-se o cuidado de verificar se são caracterizados como aditivos alimentares regulamentados pelo FAA (*Food Additives Amendment*), como é o caso da monoetanolamina.

3.2 Síntese dos líquidos iônicos obtidos a partir do cátion colina

3.2.1 Síntese do líquido iônico hidróxido de colina [ChOH]

A síntese do hidróxido de colina foi conduzida pela reação do cloreto de colina com hidróxido de potássio, de acordo com Fan *et al.* (2013) com algumas modificações. O líquido iônico hidróxido de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio, ou hidróxido de colina [ChOH], foi produzido através da reação equimolar de 0,82 mol (108,74 g) de cloreto de colina com 0,82 mol (46,28) de hidróxido de potássio. Os reagentes foram diluídos separadamente em etanol 99,5% (v/v), adicionados a um reator de vidro (volume reacional de 1 L), equipado com agitador mecânico e conectado a um banho termostático. A reação foi conduzida a 60 °C, 600 rpm por 24 horas.

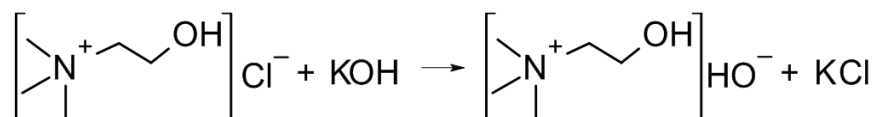
Após 24 horas, a solução foi filtrada a vácuo utilizando um filtro Millipore e uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,45 µm de porosidade à temperatura ambiente (25 °C). O procedimento de filtração foi repetido por três vezes, visando remover totalmente o KCl formado. Após a filtração, a mistura foi submetida ao processo de evaporação a vácuo a 60 °C por 24 h utilizando evaporador rotativo (QUIMIS, modelo Q344B2).

O produto formado, após secagem, foi armazenado em vidro âmbar e acondicionado na geladeira para posterior utilização. Para ser utilizado, tendo em vista que

possivelmente ganhou umidade, o [ChOH] foi seco novamente seguindo o mesmo procedimento (60 °C/ 24 h).

Na Figura 5 é demonstrada a reação de síntese do líquido iônico [ChOH].

Figura 5 – Reação de síntese do líquido iônico hidróxido de colina [ChOH].



Fonte: elaborada pela autora (2021).

O aparato experimental para a síntese do líquido iônico hidróxido de colina pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Aparato experimental na produção do líquido iônico hidróxido de colina [ChOH].



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Os líquidos iônicos relatados nos tópicos 3.2.2-3.2.5 foram sintetizados utilizando o hidróxido de colina.

3.2.2 Síntese do líquido iônico benzoato de colina [ChBenz]

A síntese do líquido iônico benzoato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, ou benzoato de colina [ChBenz] foi adaptada da síntese citada por Moriel *et al.* (2010). A metodologia consistiu em reagir 0,1 mol (12,12 g) do hidróxido de colina e 0,1 mol (12,21 g) do ácido

benzóico com agitação constante (150 rpm) durante 24 h a 25 °C. A reação foi conduzida em um balão de três furos, acoplado a um banho termostático e termômetro.

Ao término do tempo reacional, a mistura foi evaporada a vácuo a 60 °C por 24 h, utilizando um evaporador rotativo (QUIMIS, modelo Q344B2). A fim de remover possíveis impurezas foi realizada uma etapa de purificação, utilizando-se metanol a quente para solubilização e carvão ativado para adsorção das partículas. Posteriormente, a solução foi filtrada a vácuo utilizando uma membrana politetrafluoretileno (PTFE) com 0,45 µm de porosidade e submetida a processo de evaporação a vácuo a 60 °C por 24 h utilizando evaporador rotativo (QUIMIS, modelo Q344B2).

3.2.3 Síntese do líquido iônico acetato de colina [ChAcet]

O líquido iônico acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, ou acetato de colina [ChAc] foi sintetizado a partir de uma mistura equimolar de ácido acético e hidróxido de colina em balão de três bocas, equipado a um condensador, termômetro e um funil de destilação. Primeiramente, adicionou-se 0,1 mol (12,12 g) de hidróxido de colina num balão de três bocas de 200 mL e posteriormente acrescido de 0,1 mol (6,02 g) de ácido acético 99,7% v/v foi gotejado lentamente com o auxílio de um funil de destilação. A solução foi mantida sob agitação vigorosa por 24 h. Após, o líquido iônico obtido foi submetido ao processo de evaporação a vácuo a 60 °C por 24 h utilizando evaporador rotativo (QUIMIS, modelo Q344B2). O líquido iônico foi armazenado em vidro âmbar para posterior uso.

3.2.4 Síntese do líquido iônico citrato de colina [ChCit]

A síntese do líquido iônico citrato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio ou citrato de colina [ChCit] foi a partir da reação equimolar de ácido cítrico 99,5% v/v e hidróxido de colina, conduzida em um balão de três bocas, equipado a um condensador, termômetro e funil de destilação. Inicialmente, dissolveu-se 0,0434 mol (8,39 g) de ácido cítrico 99,5% em 40 mL de água deionizada. Essa solução foi gotejada lentamente a 0,0434 mol (5,27 g) de hidróxido de colina e posteriormente, mantida sob agitação vigorosa por 24 h. Após este período, a secagem e armazenamento do LI foram conduzidos de forma análoga aos demais líquidos iônicos sintetizados (Tópicos 3.2.1 a 3.2.3).

3.2.5 Síntese do líquido iônico bissulfato de colina [ChBis]

A metodologia de síntese desse líquido iônico foi baseada no estudo de Kim *et al.* (2010), com algumas modificações.

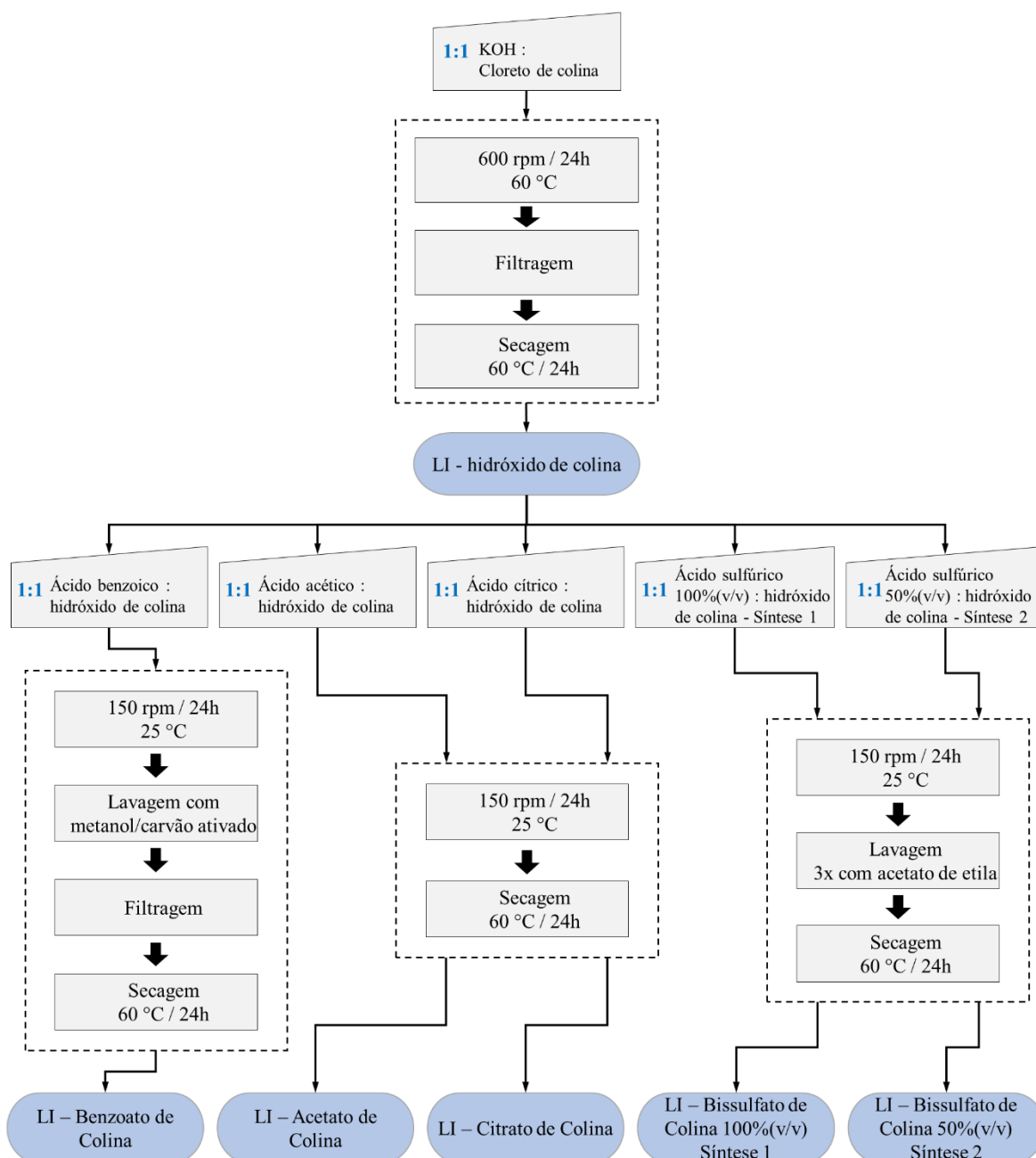
Primeiramente foi sintetizado o LI [ChBis] utilizando o ácido sulfúrico concentrado, observando-se que a reação foi muito exotérmica, promoveu-se a síntese utilizando ácido sulfúrico diluído. Os líquidos iônicos bissulfato de (2-hidroxi-1-etil)-trimetilamônio foram denominados: bissulfato de colina (100%) - [ChBis](100%) e bissulfato de colina (50%) - [ChBis](50%) obtidos a partir da reação do hidróxido de colina com ácido sulfúrico 98% (v/v) ou 50% (v/v), respectivamente.

Síntese 1: Para o líquido iônico obtido a partir da reação com ácido sulfúrico 98% (v/v), [ChBis](100%), foi gotejado lentamente 0,2 mol do ácido (20,02 g) a 0,2 mol (24,23 g) do hidróxido de colina e agitado (150 rpm) por 24 h. Devido à reação ser muito exotérmica, além do condensador já acoplado ao balão, o balão foi mantido em um banho de gelo.

Síntese 2: Para o líquido iônico obtido a partir da reação com ácido sulfúrico 50% (v/v), [ChBis](50%), foi gotejado lentamente 0,2 mol (39,23 g) do ácido sulfúrico 50% a 0,2 mol (24,23 g) do hidróxido de colina. Os procedimentos foram realizados de forma análoga ao da síntese do LI [ChBis](100%).

Em ambas as sínteses, após 24 h de agitação, os líquidos iônicos foram lavados com 13,6 mL de acetato de etila, com posterior secagem no sistema de evaporação a vácuo a 60 °C por 24 h. A Figura 6 apresenta um fluxograma de síntese dos líquidos iônicos relatados nesse Tópico (3.2).

Figura 6 – Esquema representativo das sínteses dos líquidos iônicos: benzoato de colina - [ChBenz], acetato de colina - [ChAcet], citrato de colina - [ChCit], bissulfato de colina (50%) - [ChBis](50%) e bissulfato de colina (100%) - [ChBis](100%).



Fonte: elaborada pela autora (2021).

3.3 Síntese dos líquidos iônicos obtidos a partir do cátion monoetanolamina

Os líquidos iônicos obtidos nesse tópico, acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA) e formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF), foram sintetizados utilizando como

cátion a monoetanolamina por uma reação de neutralização ácido-base, descritas nos tópicos 3.3.1 e 3.3.2.

3.3.1 Síntese do líquido iônico acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA)

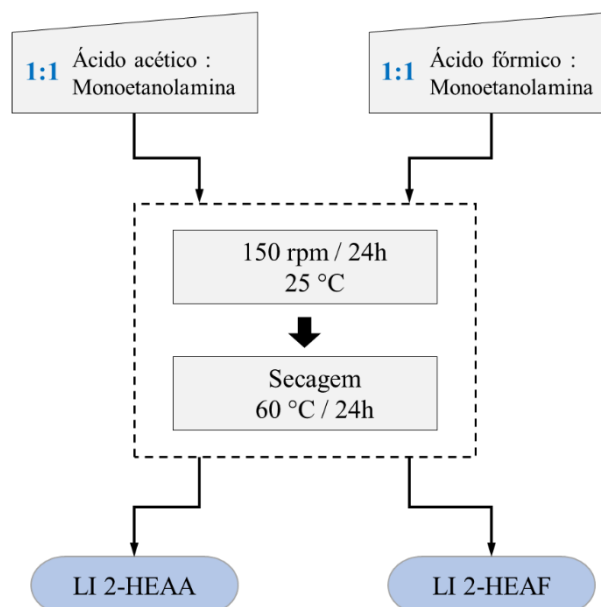
O líquido iônico acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA) foi obtido a partir de uma reação equimolar do ácido acético e da base monoetanolamina, de acordo com metodologia descrita por Reis *et al.* (2017). Adicionou-se 0,5 mol da monoetanolamina (30,54 g) em um balão de três bocas, equipado com um condensador de refluxo e um termômetro e foi acrescido lentamente de 0,5 mol de ácido acético (30,02 g) com o auxílio de um funil. O sistema foi mantido em agitação (150 rpm) a 35 °C por 24 h. O líquido iônico foi submetido ao processo de evaporação a vácuo a 60 °C por 24 h utilizando evaporador rotativo (QUIMIS, modelo Q344B2) e armazenado a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) em frasco âmbar para posterior uso.

3.3.2 Síntese do líquido iônico formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF)

O líquido iônico formiato 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF) foi sintetizado de forma similar ao 2-HEAA, e obtido a partir de uma mistura equimolar do ácido fórmico e da base monoetanolamina, seguindo o protocolo de Rodrigues *et al.*, 2020. Na reação, 0,5 mol de monoetanolamina (30,54 g) foi adicionado em um balão de três bocas, equipado com um condensador de refluxo e um termômetro. E 0,5 mol de ácido fórmico (27,08 g) foi adicionado gota a gota a monoetanolamina, o sistema foi mantido em agitação a 35 °C por 24 h. O armazenamento e secagem foi seguindo o mesmo protocolo do LI 2-HEAA.

A Figura 7 apresenta um esquema que ilustra as etapas realizadas nas sínteses dos líquidos iônicos relatados nesse tópico 3.3.

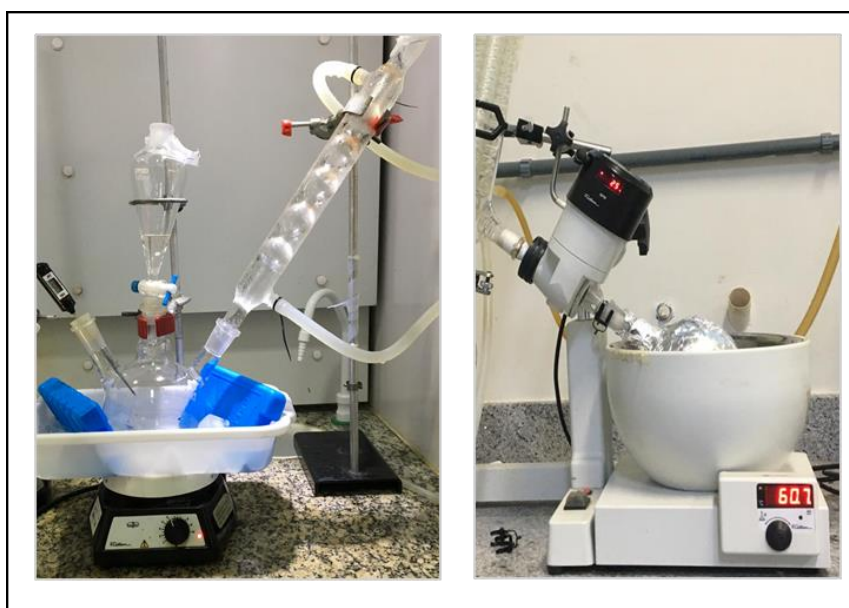
Figura 7 – Esquema representativo das sínteses dos líquidos iônicos: acetato de 2-hidroxi-etilamônio - 2-HEAA e formiato de 2-hidroxi-etilamônio - 2-HEAF.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Na Figura 8 pode ser observado o aparato experimental utilizado na síntese dos líquidos iônicos 2-HEAA e 2-HEAF.

Figura 8 – Aparato experimental na produção dos líquidos iônicos 2-HEAA e 2-HEAF.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

3.4 Caracterização dos líquidos iônicos

Visando averiguar a qualidade dos líquidos iônicos produzidos e devido à limitação de dados encontrados na literatura, analisou-se a densidade e viscosidade dos LIs obtidos e foram feitas ainda análises de FT-IR, RMN ^1H e ^{13}C e toxicidade aguda frente a *Artemia salina*.

3.4.1 Densidade, viscosidade e teor de água dos líquidos iônicos

A densidade e viscosidade dos líquidos iônicos sintetizados nesse trabalho foram mensuradas utilizando um densímetro (Anton Paar /DAS-5000) e um viscosímetro digital (SVM 3000 – Anton Paar), em que foi injetada uma amostra de 5 mL do líquido iônico para cada análise. O pH do LI foi analisado utilizando papel de pH. Para a determinação do teor de água foi utilizado um titulador automático Karl Fischer Coulométrico (Metrohm, modelo titrino).

3.4.2 FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados

As análises de FT-IR foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho por Transformada de Fourier utilizando um equipamento Cary 630 da Agilent Technologies, que possibilita análises de sólidos e líquidos. As amostras foram inseridas diretamente no espectrômetro com auxílio de uma pipeta Pasteur. Os espectros de transmitância foram coletados número de onda na faixa de 650-4000 cm^{-1} , com resolução espectral de 1 cm^{-1} e 32 scans.

3.4.3 Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C dos líquidos iônicos

Utilizou-se das análises de RMN ^1H e ^{13}C para observar a formação dos líquidos iônicos sintetizados nesse trabalho, em que os espectros foram obtidos em um equipamento Bruker (Avance DRX 500). Para avaliar a formação do líquido iônico, foi analisada a mistura física de ambos os compostos que dão origem ao LI (com proporção equimolar do ácido e da base), sendo: cloreto de colina e hidróxido de potássio, hidróxido de colina e ácido sulfúrico, hidróxido de colina e ácido benzoico, hidróxido de colina e ácido acético, hidróxido de colina e ácido cítrico, monoetanolamina e ácido acético, ou monoetanolamina e ácido fórmico, e os líquidos iônicos sintetizados. As amostras foram dissolvidas em 500 μL de dimetil-sulfóxido

deuterado (DMSO-d₆, Cambridge Isotope Laboratories) e analisadas em tubos de 5 mm (Wilmad).

Os dados foram processados utilizando o programa VNMRJ™ 4.0. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados através do sinal do resíduo não deuterado do solvente 2,50 (¹H).

3.5 Ensaio de toxicidade aguda dos líquidos iônicos com *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade dos líquidos iônicos foram realizados de acordo com o método descrito por Meyer *et al.* (1982) e Miguel *et al.* (2021) utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Primeiramente foi realizada a eclosão dos cistos de *Artemia salina*, incubando-se aproximadamente 0,2 g de cistos em 200 mL de água do mar artificial (solução de 38 g/L de sal marinho comercial, pH 8), por 48 h a 24 °C ± 2 °C, com aeração e iluminação constante. Os náuplios eclodidos foram separados dos cistos não eclodidos com base em sua fototaxia positiva.

O teste de toxicidade foi realizado em microplacas de 24 poços e preparadas concentrações de 10, 100 e 1000 mg/L dos LIs [ChOH], [ChBis], [ChAc], [ChCit], 2-HEAA e 2-HEAF em água do mar artificial, com volume final de 2 mL. A cada um dos poços foi adicionado 10 náuplios do microcrustáceo e incubados por 24 h e 48 h. Após este tempo, o número de microcrustáceos vivos e mortos foi contado, sendo consideradas como mortas as *Artemias salinas* que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos. Foram realizados também dois ensaios nas mesmas condições, apenas com água do mar artificial (controle negativo) e outro com dicromato de potássio 0,5 mol/L (controle positivo). Todo experimento foi conduzido em triplicata. Não foi realizado o ensaio de toxicidade aguda do LI [Ch][Benz] pois houve a formação de precipitado em água.

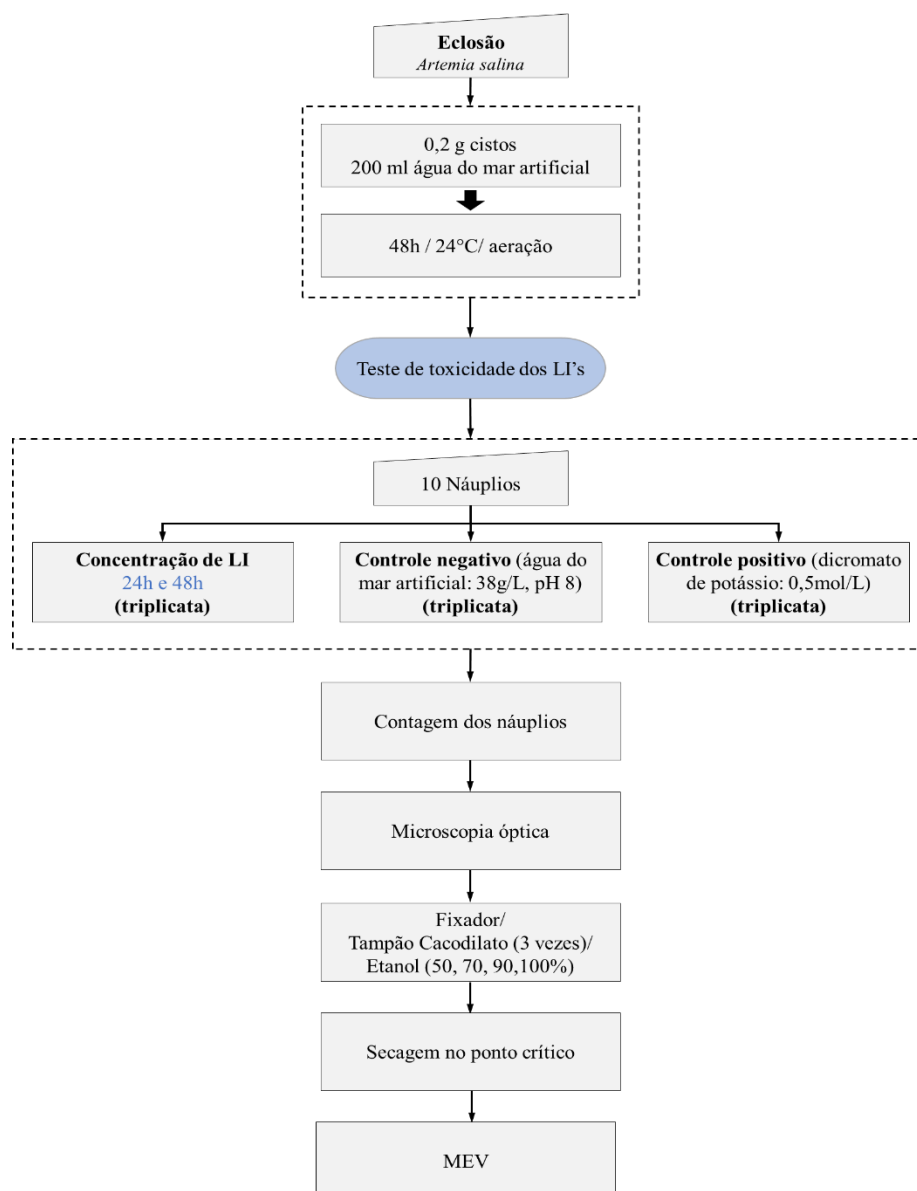
As mudanças morfológicas e o acúmulo de solução de LI nos náuplios de *Artemia salina* foram observados por microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica (microscópio Zeiss).

As *Artemias salinas*, após 48 h submetidas às concentrações de LIs, foram transferidas para lâmina de vidro e observadas em ampliação de 100 vezes no microscópio óptico. As imagens foram capturadas pela câmera do microscópio, através do programa Zen 2.3 lite.

Para análise de MEV, as *Artemias salinas* foram colocadas em solução de fixador Karnovsky modificado e deixadas em repouso por 3 horas. Posteriormente, lavadas com tampão

cacodilato de sódio 0,05 M (três vezes), desidratadas em série crescente de etanol (50, 70, 90, 100 % v/v) e feita a secagem no ponto crítico (Ponto crítico EMS 850). Por fim, as amostras foram fixadas em stubs com fita de carbono, metalizadas (Quorum QT150ES) e analisadas em MEV (Quanta FEG 450) operado a 20 kV e 0,7 torr.

Figura 9 – Fluxograma do ensaio de toxicidade dos líquidos iônicos frente a *Artemia salina*.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

3.6 Cristalização da isoniazida em líquidos iônicos (INH:LI)

Na cristalização da isoniazida com líquidos iônicos e isoniazida com ácidos precursores dos líquidos iônicos foi utilizado como solvente o etanol 70 % (v/v), aplicando a técnica de evaporação lenta do solvente.

A cristalização foi conduzida em Erlenmeyer de 250 mL, adicionando uma mistura equimolar da isoniazida com o líquido iônico. Primeiramente a isoniazida (2,2 mmol) foi dissolvida em 20 mL de etanol 70 % (v/v), depois acrescida de uma quantidade equimolar de líquido iônico (2,2 mmol) ou ácido (2,2 mmol). Logo após, a mistura foi incubada num agitador orbital a 150 rpm e 50 °C por 24 h. Posteriormente, o solvente foi evaporado naturalmente a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

Após o processo de cristalização foram obtidos 13 sólidos, sendo oito a partir dos LIs sintetizados (INH:LI) e cinco obtidas a partir dos ácidos precursores dos líquidos iônicos (INH:ácido), vide Tabela 2.

Tabela 2 – Nomenclatura das isoniazidas obtidas após a cristalização em líquidos iônicos utilizando a técnica de evaporação do solvente.

LI	Composto formado
Hidróxido de colina	INH:[ChOH]
Acetato de colina	INH:[ChAc]
Benzoato de colina	INH: [ChBenz]
Citrato de colina	INH:[ChCit]
Bissulfato de colina- 50%	INH:[ChBis] 50% (v/v)
Bissulfato de colina- 100%	INH:[ChBis] 100% (v/v)
2-HEAA	INH:2-HEAA
2-HEAF	INH:2-HEAF
Ácido	Composto formado
Ácido acético	INH:ácido acético
Ácido benzoico	INH:ácido benzoico
Ácido cítrico	INH:ácido cítrico
Ácido fórmico	INH:ácido fórmico
Ácido sulfúrico	INH:ácido sulfúrico

Fonte: elaborada pela autora (2021).

3.7 Caracterização da isoniazida após a cristalização com líquido iônico

3.7.1 FT-IR da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos

As análises de FT-IR da isoniazida cristalizada em líquidos iônicos e ácidos foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho por Transformada de Fourier utilizando um equipamento Cary 630 da Agilent Technologies. Foi feita uma etapa de lavagem prévia com etanol 70% (v/v) dos sólidos, antes da análise de FT-IR, posteriormente, foram secas e inseridas diretamente no espectrômetro. Os espectros de transmitância foram coletados no comprimento de onda na faixa de $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, com resolução espectral de 1 cm^{-1} e 32 scans.

3.7.2 Análises Térmicas da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos

Para essas análises, foi feita uma etapa de lavagem prévia com etanol 70% (v/v) dos sólidos. As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análises de termogravimetria (TGA) foram realizadas em um analisador térmico simultâneo DSC/TGA (NETZSCH STA 449F3). Aproximadamente 1 mg da amostra foi colocada em painéis de alumínio, fechadas e aquecidas dentro de uma faixa de temperatura de 25-500 °C, com taxa de aquecimento de 10 K/min, sob atmosfera de nitrogênio (vazão = 50 mL/ min).

3.7.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da isoniazida após a cristalização com ácidos ou LIs em etanol 70% v/v

A morfologia e alterações na estrutura física da isoniazida padrão e das novas formas obtidas pelo processo de cristalização, usando líquido iônico ou ácido, em etanol 70 % v/v foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nesta análise utilizou-se o microscópio Quanta FEG 450 operado a 20 kV e 0,7 torr. As amostras foram secas a 50 °C por 24 horas e, em seguida, depositadas em fita de carbono e metalizadas com prata metálica pelo Metalizador Quorum QT150ES. Foram aplicados 10 Pa de pressão na câmara MEV, com um feixe de elétrons incidente de 20 kV.

3.7.4 Difração de Raio-X de pó (DRX) da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos

A técnica de DRX foi realizada a alto ângulo para determinar o arranjo estrutural e para identificar as possíveis fases cristalinas dos sólidos sintetizados. Para tal, utilizou-se um difratômetro automático X'Pert Pro MPD equipado com detector X'Celerator. Foram obtidas medidas para 2θ entre 10° a 100°, passo de 0,013° e tempo de 200 s por passo.

3.7.5 Difração de raios X de monocristal (DRXM) da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos

Para a cristalografia, foram selecionados monocristais com auxílio de um microscópio ótico. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, utilizando um

difratômetro Bruker D8 Venture equipado com fonte monocromática de Mo K α ($\lambda = 0.71073$ Å) e um detector Photon II Kappa CMOS.

3.7.6 Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um equipamento Bruker (Avance DRX 500). Para esse ensaio, foram dissolvidas 30 mg das amostras em 500 μL de dimetil-sulfóxido deuterado (DMSO-d₆, Cambridge Isotope Laboratories) e analisadas em tubos de 5 mm (Wilmad). Os dados foram processados utilizando o programa VNMRJ™ 4.0. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, referenciados pelo sinal do solvente DMSO-d₆ 2,50 (^1H).

3.8 Estudo de solubilidade no equilíbrio da isoniazida após a cristalização com líquidos iônicos

3.8.1 Determinação do comprimento de onda e curva de calibração

A fim de identificar a máxima absorvância da isoniazida e da isoniazida após a cristalização em LIs em água, foram preparadas “soluções estoques” de isoniazida e INH:LI em água com concentração de 0,2 mg/mL. Posteriormente, foi realizada uma varredura na faixa de comprimento de onda de 200-500 nm, com intervalo de 1 nm, em um espectrofotômetro (Thermo Fisher), utilizando cubeta de quartzo de 1 cm.

Posteriormente, como o comprimento de onda já identificado, foram realizadas curvas de calibração por diluição das soluções estoques, em concentrações de 0,002 mg/mL a 0,05 mg/mL. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.8.2 Solubilidade no equilíbrio da isoniazida padrão e dos INH:LIs em água a 25 °C

A solubilidade em equilíbrio da isoniazida e INH:LI foi determinada a 25 °C em água deionizada pelo método miniaturizado de agitação em frasco “*shake-flask*” (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005). Foram preparadas soluções saturadas de isoniazida e INH:LI em tubos de ensaio de 20 mL, contendo 2 mL de água deionizada. Em seguida, a mistura foi agitada sob 250 rpm por 48 h permitindo atingir o equilíbrio termodinâmico. Ao término das 48 h, as

misturas foram filtradas em filtro (Millipore®) de 0,45 nm. A solução obtida foi diluída no solvente utilizado (água deionizada) até obter uma concentração adequada para as leituras de absorvância. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.9 Estudo da estabilidade das INH:LI e isoniazida padrão em atmosfera acelerada

Foram pesadas 15 mg da isoniazida e INH:LI em vials de vidro e mantidos em dessecador a 40 °C, com umidade relativa de aproximadamente 75 %, a qual foi alcançada fazendo uso de solução saturada de cloreto de sódio. O dessecador de vidro foi colocado em estufa a 40 °C.

Para indicar a formação de novos compostos de degradação ou concentração da isoniazida e INH:LI nos dados intervalos de tempo foi utilizado um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, E.U.A.), equipado com um detector ultravioleta Waters 2487 e uma coluna Waters (Symmetry C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm), com absorvância de 254 nm, injeção manual de 20 µL. Tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,5) e acetonitrila na proporção de 40:60 foram usados como fase móvel (vazão 0,8 mL/min). Periodicamente, as amostras (INH e INH:LI) eram retiradas, pesadas em uma balança analítica para calcular a absorção de umidade e analisadas em CLAE. Os intervalos analisados foram: dia zero, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias.

3.10 Atividade antimicrobiana

3.10.1 Obtenção, manutenção e preparação do inóculo dos isolados clínicos *Mycobacterium tuberculosis*

Os isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* foram obtidos em parceria com o Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, Fortaleza-Ce, o cultivo foi realizado em meio Löweinstein-Jensen (LJ) e incubados a 37 °C. As culturas bacterianas foram mantidas em fase exponencial, com repiques a cada 21 dias e mantidos em estufa a 37 °C.

As colônias das culturas de *M. tuberculosis* do meio LJ foram transferidas com auxílio de uma alça bacteriológica para tubo de ensaio estéril contendo 2,5 mL da solução bacteriana que continha solução fisiológica (0,9 % v/v) esterilizada, com 0,04 % (v/v) de Tween 80 e 0,2 % (v/v) de albumina bovina, conforme descrito por Franzblau *et al.* (1998), Palomino *et al.* (2002) e Mota (2017).

A solução foi deixada em repouso por 5 minutos para que o sedimento depositasse no fundo do tubo de ensaio e, em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de ensaio estéril e deixado em repouso por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e a suspensão foi acrescida de caldo 7H9-S (Sigma- caldo Middlebrook suplementado com ADC – albumina, dextrose e catalase) até atingir o nível de turbidez semelhante a escala número 1,0 de McFarland, contendo aproximadamente 3×10^8 UFC/mL.

Os inóculos utilizados nos testes foram preparados diluindo a solução descrita acima na proporção 1:10, utilizando como diluente caldo 7H9-S, que forneceu a concentração de 3×10^7 UFC/mL.

3.10.2 Teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima

Os testes para determinação da concentração inibitória mínima (*minimum inhibitory concentration* - MIC) foram realizados através do ensaio de microdiluição, utilizando o corante resazurina como indicador de viabilidade micobacteriana, denominado de *Resazurim Assay* (REMA), conforme os trabalhos realizados por Flanzblau *et al.* (1998) e Palomino *et al.* (2002).

As MICs das formas INH, INH:LI e INH:H₂SO₄ sobre a cepa *M. tuberculosis* foram determinadas em duplicata em microplacas de 96 poços de fundo chato, analisando as concentrações de 6,25 a 200 µg/mL das formas. Nos poços que não foram realizados os testes de diluições seriadas, adicionou-se 300 µL de água destilada estéril, com o intuito de evitar a evaporação do meio de cultura. Fez-se também um controle positivo (inóculo e meio 7H9-S) e o controle negativo (apenas meio 7H9-S). As microplacas foram celadas com a tampa e incubadas por 7 dias a 37 °C.

Após 7 dias de incubação, foram adicionados 30 µL da solução de resazurina a 0,02 % (m/v) a todos os poços das linhas testes, para a leitura de viabilidade bacteriana. As microplacas foram seladas e incubadas novamente a 37 °C, realizando-se a leitura em 24 e 48 horas após adição do corante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os líquidos iônicos utilizados nessa pesquisa foram todos sintetizados no laboratório e os critérios para a escolha foram: apresentar estudos promissores de toxicidade ou fazer uso de cátions e ânions que estejam na lista de substâncias GRAS ou caracterizados como aditivos alimentares regulamentados pelo FAA.

Com um conceito que visa superar as preocupações econômicas, citotóxicas, ambientais e energéticas dos LIs de imidazólio convencionais, surgiu uma nova geração de LIs contendo íons derivados de bases naturais (como por exemplo, a colina) e ácidos (são exemplos: aminoácidos e ácidos carboxílicos) (NINOMIYA *et al.*, 2013). Estes, devido ao valor da colina, são menos caros (PLECHKOVA; SEDDON, 2008) e menos tóxicos (PETKOVIC *et al.*, 2009) do que os LIs de imidazólio, além do seu caráter biodegradável (AZIZI; EDRISI, 2016).

Diante disso, foram sintetizados sete líquidos iônicos, sendo cinco desses produzidos a partir da colina e dois a partir da monoetanolamina com ácidos de cadeia curta. Para os LIs obtidos, analisou-se a influência na cristalização da isoniazida.

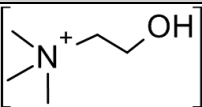
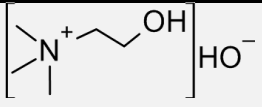
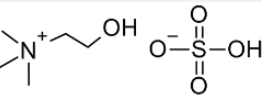
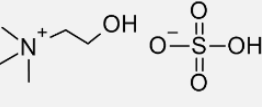
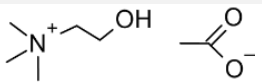
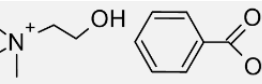
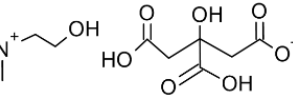
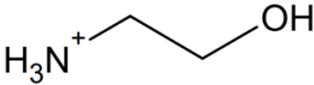
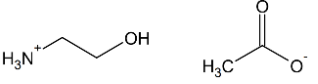
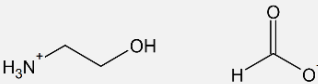
Os resultados da tese foram divididos em caracterização dos líquidos iônicos sintetizados (Tópico 4.1) e caracterização das formas de isoniazida cristalizadas nos diferentes LIs (Tópicos 4.2 e 4.3)

4.1 Caracterização dos líquidos iônicos

4.1.1 *Propriedades termodinâmicas dos líquidos iônicos sintetizados*

Na Tabela 3 estão descritos os sete líquidos iônicos sintetizados a partir do cátion colina e monoetanolamina.

Tabela 3 – Descrição, estrutura química e abreviatura dos nomes dos cinco líquidos iônicos obtidos a partir da colina e dois obtidos pelo cátion monoetanolamina.

Cátion: colina			
			
Fonte do ânion	Nome	Abreviatura	Estrutura química
Hidróxido de potássio	(2-hidroxietil)-trimetilamônio	[ChOH] ou de colina	
Ácido sulfúrico diluído 50% v/v	Bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio	[ChBis]-50% v/v ou Bissulfato de colina 50% (v/v)- síntese 2	
Ácido sulfúrico com pureza 98% v/v	Bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio	[ChBis]-100% v/v Bissulfato de colina 100% (v/v)- síntese 1	
Ácido acético	Acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio	[ChAc] ou acetato de colina	
Ácido benzoico	Benzoato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio	[ChBenz] ou de colina	
Ácido cítrico	Citrato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio	[ChCit] ou citrato de colina	
Cátion: monoetanolamina			
			
Fonte do ânion	Nome	Abreviatura	Estrutura química
Ácido acético	Acetato de 2- hidroxietilamônio	2-HEAA	
Ácido fórmico	Formiato de 2-hidroxietilamônio	2-HEAF	

Fonte: elaborada pela autora (2021).

As propriedades termodinâmicas, como densidade e viscosidade, dos LIs sintetizados utilizando o cátion colina e monoetanolamina, foram determinadas para diferentes temperaturas, e os resultados estão apresentados na Tabela 4. Devido às limitações do equipamento, não foi possível determinar as referidas propriedades para os líquidos iônicos contendo o ânion sulfato.

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos sintetizados.

Líquido Iônico	Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade (mPa·s)
[ChOH]	20	0,9830	154,10
	25	0,9799	111,75
	30	0,9767	82,722
	35	0,9736	62,410
	40	0,9704	47,981
[ChAc]	20	1,0845	37,885
	25	1,0813	30,117
	30	1,0781	24,349
	35	1,0750	19,966
	40	1,0718	16,586
[ChBenz]	25	1,1442	1083,5
	30	1,1411	709,16
	35	1,1379	480,95
	40	1,1347	336,81
[ChCit]	20	-	-
	25	-	-
	30	1,3744	31829
	35	1,3707	17815
	40	1,3671	10312
2-HEAA	20	1,1547	4539
	25	1,1519	2940,6
	30	1,1491	1927
	35	1,1465	1299,8
	40	1,1436	903,54
	50	1,1381	462,09
2-HEAF	20	1,1954	103,19
	25	1,1929	79,299
	30	1,1904	62,17
	35	1,1878	49,60
	40	1,1851	40,22

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Os valores obtidos para a densidade e a viscosidade decrescem com o aumento da temperatura, seguindo um comportamento esperado. Com o aumento da temperatura, as forças de atração entre as moléculas diminuem, diminuindo também a viscosidade.

Em relação aos LIs com cátion colina, observou-se que o ânion influenciou significativamente na viscosidade, o LI citrato de colina, com maior cadeia alquílica, apresentou maior viscosidade entre os LIs analisados. O aumento no tamanho da cadeia do ânion possivelmente levou ao aumento da viscosidade dos LIs, devido às forças atrativas como forças de Van der Waals (BONHÔTE *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 2017).

Os LIs [ChBenz] e [ChCit] apresentaram viscosidade a 40 °C de 336,81 mPa.S e 10.312 mPa.S, respectivamente, sendo muito superior a apresentada pelos LIs [ChOH] e [ChAc], cujos valores de viscosidade foram 47,981 mPa.S e 16,586 mPa.S, respectivamente, nas mesmas condições. Segundo Uddin *et al.* (2020) uma possível explicação para isso é que ânions muito simétricos ou quase esféricos são comparativamente mais viscosos.

O líquido iônico hidróxido de colina apresentou menor viscosidade que a reportada no trabalho de Bessa (2015), por possuir ainda etanol que não foi totalmente rotoevaporado, comprovado na análise de RMN (Vide Figura 11).

As propriedades encontradas para o LIs 2-HEAA e 2-HEAF estão coerentes com os valores encontrados por Rocha (2016) e Reis *et al.* (2017). Como também dados já reportados por Hosseini *et al.*, 2018 e Hosseini; Hosseinian; Aparicio, 2019.

Analisando os LIs que possuem o mesmo ânion, 2-HEAA e [ChAc], observa-se que o LI 2-HEAA apresenta 3 hidrogênios ligados ao nitrogênio, fazendo com que consiga realizar mais ligações cruzadas, aumentando assim sua viscosidade quando comparado ao [ChAc].

Essas diferenças significativas na viscosidade dos LIs em função do tipo de ânion mostram que a força das interações ânion-cátion tem um papel fundamental em sua viscosidade.

A viscosidade de um líquido iônico é uma propriedade importante para aplicações industriais, útil para a avaliação teórica de outras propriedades de transporte e para aplicações práticas em capacidade calorífica e outras propriedades físicas mensuradas (HARRIS, 2020). E diante da vasta possibilidade de sínteses de líquidos iônicos, a catalogação de propriedades se torna fundamental para futuras aplicações.

As diferentes viscosidades para os LIs sintetizados sugeriram que um grande número de LIs a base de colina com diferentes viscosidades e propriedades podem ser obtidos modificando o ânion.

4.1.2 Análise de FT-IR dos líquidos iônicos

4.1.2.1 Líquidos iônicos formados a partir do hidróxido de colina

A análise de FT-IR é considerada uma ferramenta importante para determinação de ligações químicas em uma molécula, fornecendo um espectro de absorção infravermelho semelhante a uma impressão digital da molécula (VAJEKAR; SHANKARLING, 2020).

Na Figura 10 estão demonstrados os espectros de FT-IR dos LIs: [ChOH], [ChAc], [ChBenz] e [ChCit]. Devido às limitações do equipamento, as análises de FT-IR dos líquidos iônicos com ânion sulfato não foram realizadas, contudo, as sínteses foram comprovadas por RMN (Tópico 4.1.3).

A banda referente ao estiramento OH da colina apresenta uma ampla absorção de infravermelho entre 3200-3400 cm^{-1} devido à ampla distribuição de ligações de hidrogênio intermoleculares e conformações de colina (TANZI *et al.*, 2016) e sobrepõem parcialmente bandas de ligação C-H e vibrações N-H, como observados nas Figuras a-d ([ChOH], [ChAc], [ChBenz] e [ChCit]).

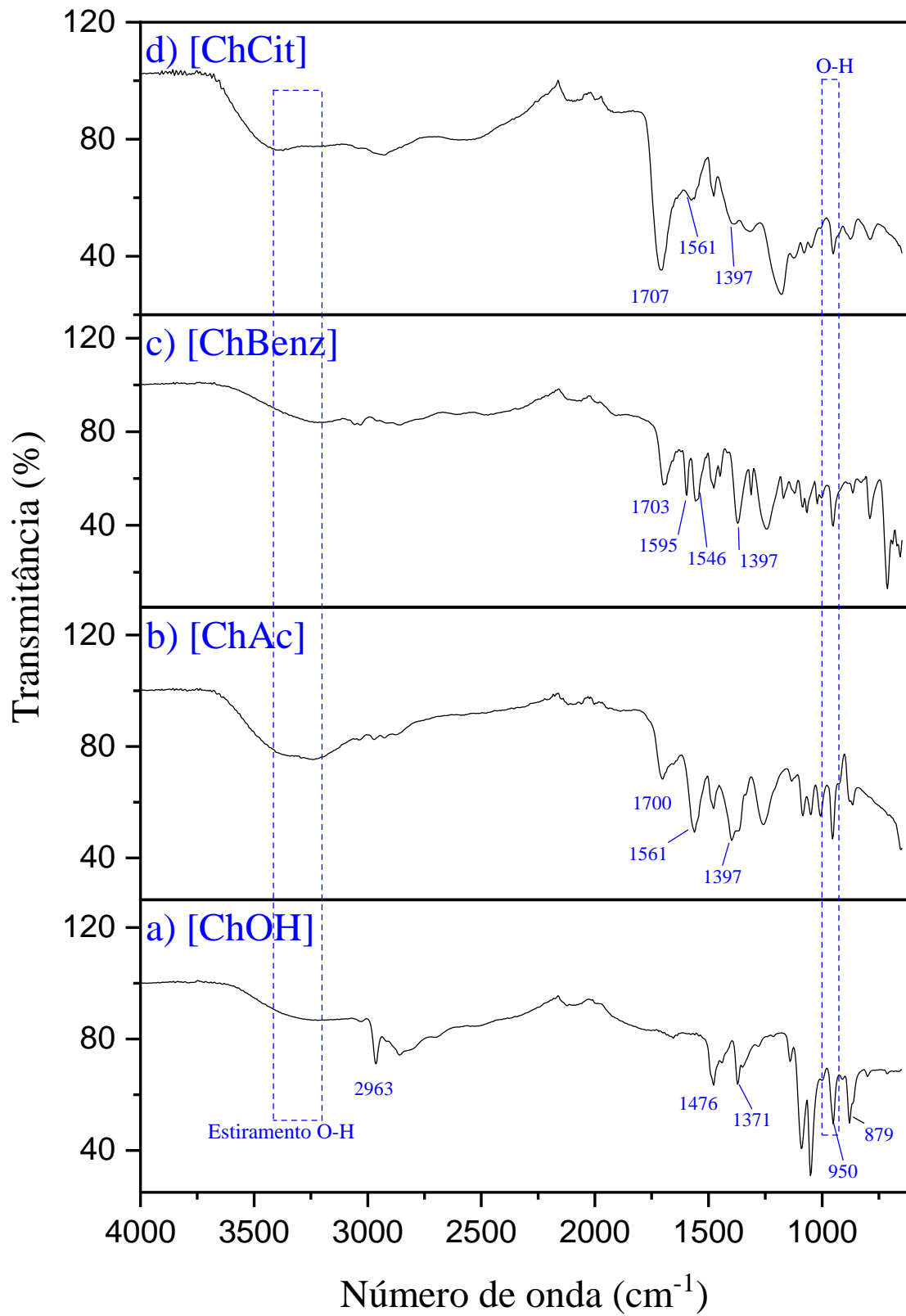
A vibração de grupo funcional C-H (alifático) é significativo para a colina (POHLE *et al.*, 2001) e foi detectada em 2963 cm^{-1} para o [ChOH] (Figura 10a). Essa banda apareceu deslocada, com menor intensidade nos espectros dos demais LIs que foram sintetizados a partir do hidróxido de colina, podendo ser indício de ligações de hidrogênio da colina com os ácidos carboxílicos. Em 1476 cm^{-1} foi observada banda referente à deformação de grupos metila, e em 1371 cm^{-1} banda que corresponde à vibração de alongamento C–N para o [ChOH] (Figura 10 a).

A banda característica da deformação C-H do grupamento $-\text{CH}_2-$ apareceu em 950 cm^{-1} e 879 cm^{-1} (Figura 10a). Os ácidos carboxílicos apresentam ainda uma banda muito forte do estiramento C=O em aproximadamente 1700 cm^{-1} . Esse pico foi possível observar em 1700 cm^{-1} para o LI [ChAc] (Figura 10b), 1703 cm^{-1} para [ChBenz] (Figura 10c) e 1793 cm^{-1} para [ChCit] (Figura 10d).

A presença de modos vibracionais assimétricos e simétricos referentes ao grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$) apresentado em 1561 cm^{-1} e 1397 cm^{-1} para o LI [ChAc], 1595 cm^{-1} e 1397 cm^{-1} para [ChBenz] e 1561 cm^{-1} e 1397 cm^{-1} para [ChCit], acabaram sobrepondo a banda referente à vibração de alongamento da ligação C–N em torno de 1371 cm^{-1} , dando indícios da existência de ligações hidrogênio que podem ser do tipo: $\text{NH}\cdots\text{NH}$, $\text{NH}\cdots\text{OH}$, $\text{HO}\cdots\text{HO}$ e $\text{OH}\cdots\text{NH}$ (YUE *et al.*, 2012).

No líquido iônico [ChBenz] é possível observar a banda referente ao estiramento C=C do anel aromático (1546 cm^{-1}) (TANZI *et al.*, 2016), já as ligações carbono-hidrogênio do anel são responsáveis pelo surgimento de bandas de absorção angular C-H fora do plano em torno de $711\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. A banda presente em todos os LIs analisados em aproximadamente 933 cm^{-1} (Figura 10 a-d) está relacionada ao grupamento O-H (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2018).

Figura 10 – Espectro de FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados: líquido iônico hidróxido de colina [ChOH]; acetato de colina [ChAc], benzoato de colina [ChBenz] e citrato de colina [ChCit].



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Diante dos resultados observados, comprovou-se que os ânions dos ácidos existem em todos os LI obtidos a partir do hidróxido de colina, indicando a formação de ligação do tipo COO-N^+ . A influência dessa banda em torno de 1760 cm^{-1} - 1560 cm^{-1} também foi demonstrada por Ju *et al.* (2020) para a confirmação do ânion do ácido ricinoleico no LI hidróxido de colina após a formação do LI.

4.1.2.2 Líquidos iônicos formados a partir da monoetanolamina

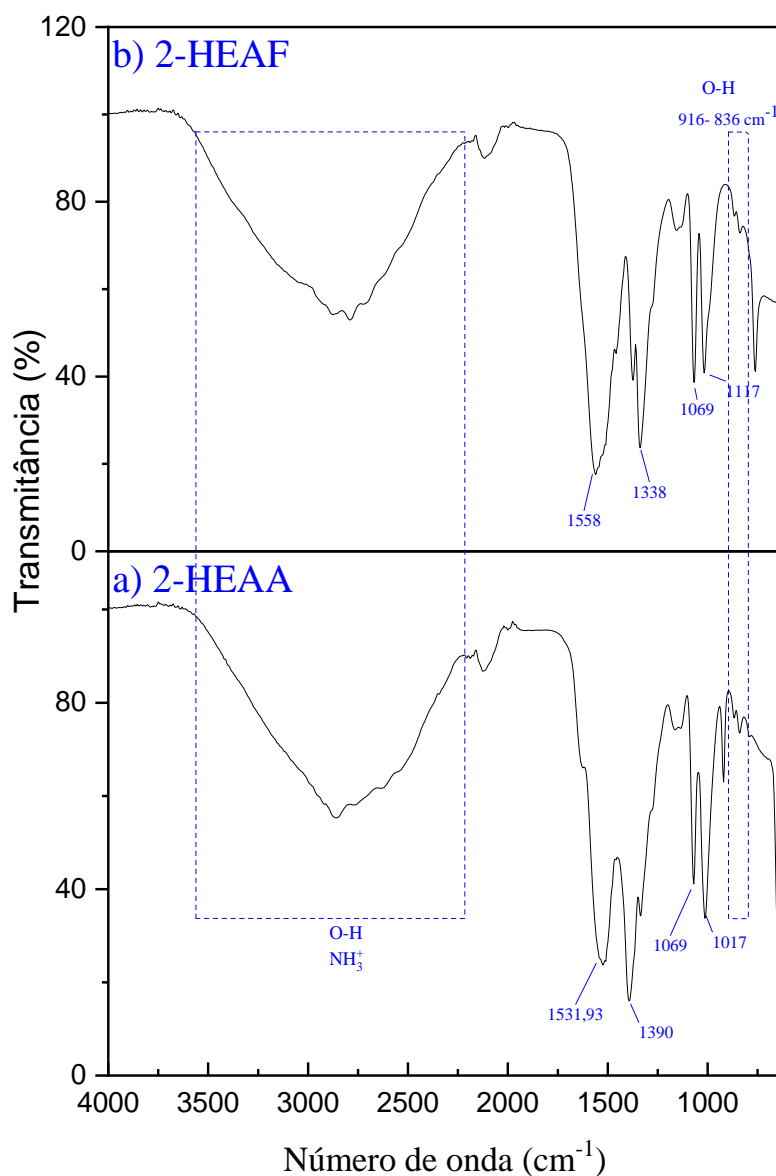
Na Figura 11 é possível observar os espectros de FT-IR dos LIs 2-HEAA e 2-HEAF. Sabe-se que a banda de absorção larga revelada na faixa de frequência entre 2232 cm^{-1} - 3600 cm^{-1} (Figura 11 a e b) é associada também às vibrações de estiramento N-H e em aproximadamente 2970 cm^{-1} - 2930 cm^{-1} aos grupos metil e metileno. Com isso, pode haver o surgimento de picos em forma conjugada (ROCHA, 2016), como foi observado nas Figura 10a e 10b.

Pode ser observado nos FT-IR dos dois líquidos iônicos (2-HEAA e 2-HEAF) bandas na faixa de 1300 cm^{-1} - 800 cm^{-1} que estão associadas às vibrações de estiramento que estão geralmente associadas às ligações C-C, C-O e C-N.

Estando localizados nos intervalos de 1327 cm^{-1} - 1221 cm^{-1} (trecho C=O) e 916 – 836 cm^{-1} (ligações de hidrogênio OH), bandas que podem ser associadas aos grupos C=O e O–H tendem a ser menos pronunciadas, podendo assim, serem sobrepostas com outras “*fingerprints*” da molécula.

As vibrações do $-(\text{CH}_2)-$ são observadas em 1017 cm^{-1} (LI 2-HEAF), 1066 cm^{-1} (LI 2-HEAF), 1010 cm^{-1} (LI 2-HEAA) e 1069 cm^{-1} (LI 2-HEAA). Os espectros de infravermelho do 2-HEAA e 2-HEAF confirmam a presença de modos vibracionais assimétricos referentes ao grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$) em 1558 cm^{-1} (Figura 11b) e 1531 cm^{-1} (Figura 11a) e simétricos em 1338 cm^{-1} (Figura 11b) e 1390 cm^{-1} (Figura 11a). Os picos em aproximadamente 2970 e 2930 cm^{-1} correspondem ao grupo metil e metileno desses LIs.

Figura 11 – Espectros de FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados: a) acetato de 2- hidroxietanolamina (2-HEAA) e b) formiato de 2- hidroxietanolamina (2-HEAF).



Fonte: elaborada pela autora (2021).

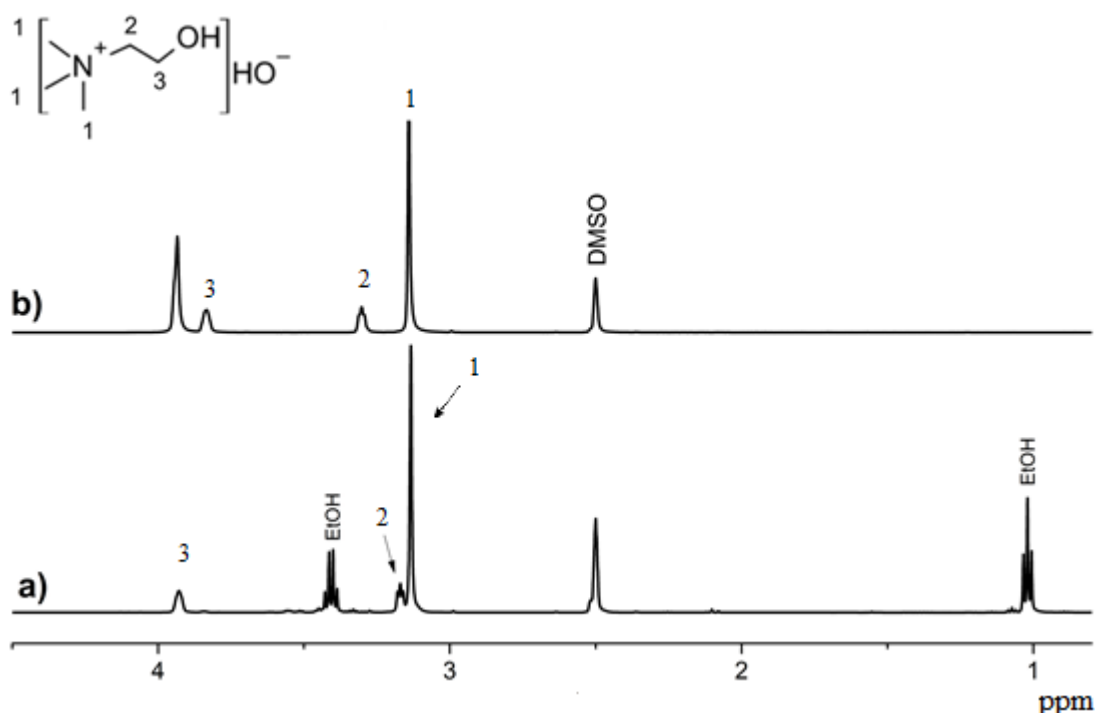
Portanto, pode-se perceber que os grupos funcionais presentes nas estruturas das amostras observadas nos espectros (Figuras 10 e 11) são consistentes com as estruturas dos líquidos iônicos sintetizados, reforçando a síntese dos LIs e confirmando a estrutura, os mesmos foram analisados por RMN de ¹H e ¹³C (Tópico 4.1.3).

4.1.3 RMN de ^1H e ^{13}C dos líquidos iônicos sintetizados

Os LIs sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética baseada na identificação dos hidrogênios (RMN de ^1H). Primeiramente foi caracterizado o líquido iônico hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio ou [ChOH], tendo em vista que ele é precursor dos demais LIs que utilizam o cátion colina. A Figura 12 mostra o espectro de RMN de ^1H obtido para o líquido iônico hidróxido de colina e a mistura física do mesmo.

O RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o LI [ChOH]: (1) 3,13 ppm (9 H, s, $3 \times \text{CH}_3\text{N}$); (2) 3,17 ppm (2 H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) e 3,93 ppm (2 H, t, CH_2OH).

Figura 12 – a) Espectro de RMN de ^1H do líquido iônico hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes do líquido iônico hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (cloreto de colina e KOH).



Fonte: elaborada pela autora (2021).

No espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio, verificou-se a presença de um singlete em 3,14 ppm na mistura física do LI, deslocado para 3,13 ppm na formação do líquido iônico [ChOH], referente ao hidrogênio do grupo metil ($-\text{CH}_3$). Dois tripletos referentes aos hidrogênios do grupo ($-\text{CH}_2$) da mistura física em 3,30 ppm (hidrogênio 2) e 3,83 ppm (hidrogênio 3), apareceram em 3,17 ppm e 3,93 ppm

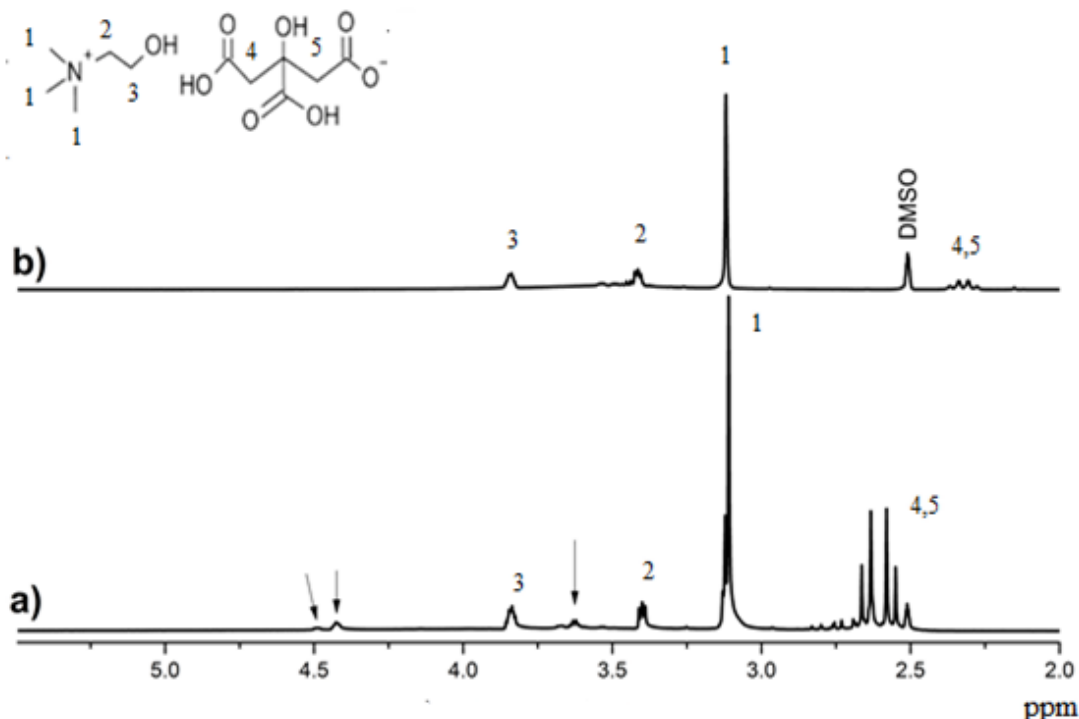
no líquido iônico hidróxido de colina. Foi observado ainda a presença de etanol como contaminante, o que pode influenciar na viscosidade (resultado demonstrado na Tabela 4). Todas essas descobertas observadas nas análises de RMN ^1H e FT-IR sugerem a formação do líquido iônico [ChOH].

As Figuras 13a a 17a mostram a comparação dos espectros de RMN ^1H dos LIs produzidos a partir do hidróxido de colina: citrato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio; benzoato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio; acetato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio; bissulfato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio (Sínteses 1 e 2); e da mistura física dos componentes dos líquidos iônicos (Figuras 13b a 17b).

No espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do líquido iônico citrato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio ([ChCit], Figura 13), observou-se mudanças dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da mistura física dos componentes quando comparados com o LI. Na colina, os hidrogênios do grupo $-\text{CH}_2$ estão bem próximos da porção iônica do nitrogênio, que os tornam importantes sondas para monitorar a formação de interações iônicas. O singlete em 3,13 ppm atribuída aos hidrogênios dos grupos metil ($-\text{CH}_3$) da colina (hidrogênio 1), o tripleto em 3,24 ppm (hidrogênio 2) e em 3,84 ppm (hidrogênio 3) atribuídas ao hidrogênio do grupo CH_2 ambos do LI citrato de colina, apareceram em 3,12 ppm, 3,42 ppm e 3,84 na mistura física, respectivamente.

Também ocorreu modificação nos sinais dos hidrogênios do ânion (índices 4 e 5 da Figura 13), que foram modificados de 2,60 ppm (na mistura física) para 2,32 ppm (no LI citrato de colina), além de aparecerem vários outros sinais (setas na Figura 13).

Figura 13 – a) Espectro de RMN ^1H do líquido iônico citrato de (2-hidroxi-*etil*)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes do líquido iônico citrato de (2-hidroxi-*etil*)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido cítrico).



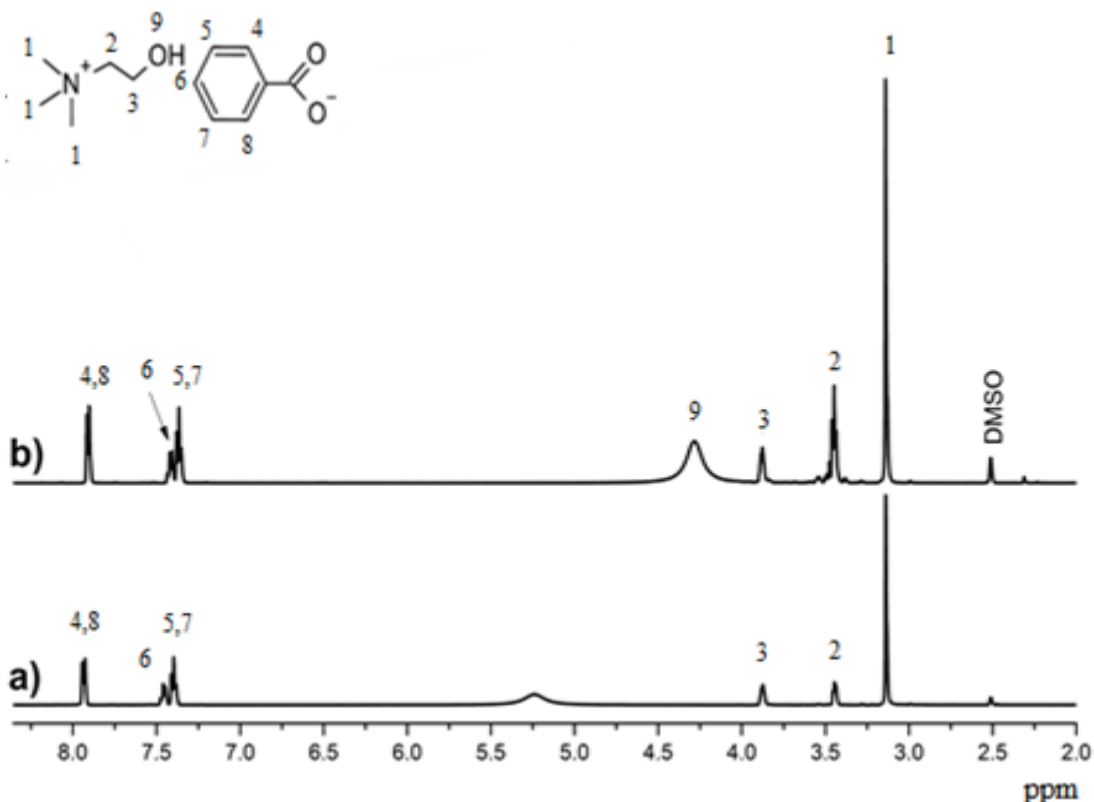
Fonte: elaborada pela autora (2021).

O RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o [ChCit]: (1) 3,13 ppm (9 H, s, $3 \times \text{CH}_3\text{N}$); (2) 3,24 ppm (2 H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) 3,84 ppm (2 H, t, CH_2OH) e (4)/(5) 2,6 ppm (4 H, m, CH_2).

Para o benzoato de (2-hidroxi-*etil*)-trimetilamônio (benzoato de colina, Figura 14) a singlete em 3,14 ppm é atribuída aos três hidrogênios do grupo metil do cátion (identificado como 1 na estrutura da molécula e no espectro). Os tripletos observados em 3,45 ppm e 3,87 ppm representam os hidrogênios do grupo metilênicos do cátion, identificados pelos números 2 e 3, respectivamente. Os hidrogênios que compõem o anel aromático são mostrados como dupletos em 7,93 ppm (para os hidrogênios mais próximos da extremidade negativa da molécula, identificados na Figura 14 por 4 e 8), em 7,40 ppm (para os hidrogênios 5 e 7 da Figura 14) e 7,46 ppm (para os hidrogênios mais distantes da extremidade negativa da molécula, representado na Figura 14 por 6).

Os deslocamentos químicos foram obtidos a partir do espectro RMN ^1H do líquido iônico benzoato de colina e da mistura física dos seus componentes a partir da Figura 14.

Figura 14 – a) Espectro de RMN ^1H do líquido iônico benzoato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes do líquido iônico benzoato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido benzoico).

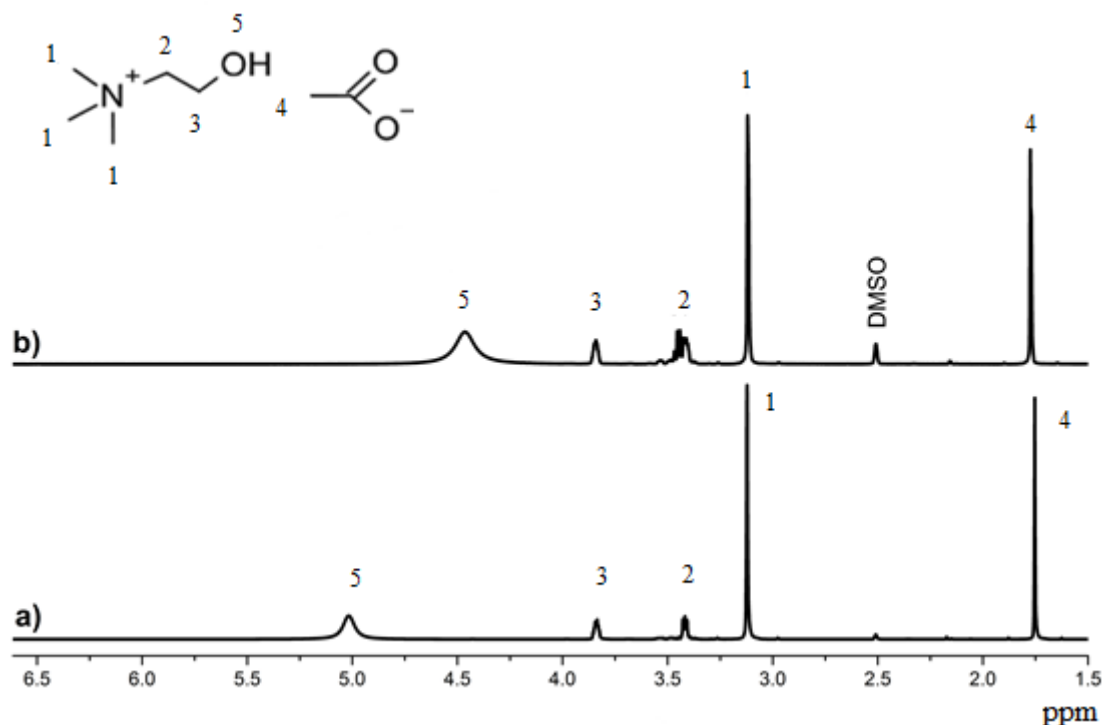


Fonte: elaborada pela autora (2021).

O RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o líquido iônico [ChBenz]: (1) 3,14 ppm (9 H, s, $3 \times \text{CH}_3\text{N}$); (2) 3,45 ppm (2 H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) 3,87 ppm (2 H, t, CH_2OH); (4)/(8) 7,93 ppm (1 H, d, H do anel benzênico); (5)/(7) 7,40 ppm (1 H, t, H do anel benzênico) e (6) 7,46 ppm (1 H, t, H do anel benzênico).

Para o LI acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (Figura 15), algumas alterações foram observadas quando comparada com a mistura física de seus constituintes. Da colina, o hidrogênio 2 apresentou a ocorrência de dois sinais em 3,42 ppm/3,44 ppm na mistura física, já quando houve a formação do LI observou-se a presença de um tripleto em 3,42 ppm referentes ao sinal do hidrogênio do grupo metilênico. O hidrogênio do grupo hidroxila (hidrogênio 5 na Figura 15) variou de 4,45 ppm (mistura física) para 5,02 ppm (LI acetato de colina). Por último, observou-se variação no hidrogênio do grupo metil do acetato (hidrogênio 4 na Figura 15) de 1,77 ppm (na mistura física) para 1,75 ppm (no LI acetato de colina).

Figura 15 – a) Espectro de RMN ^1H do líquido iônico acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes do líquido iônico acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido acético).

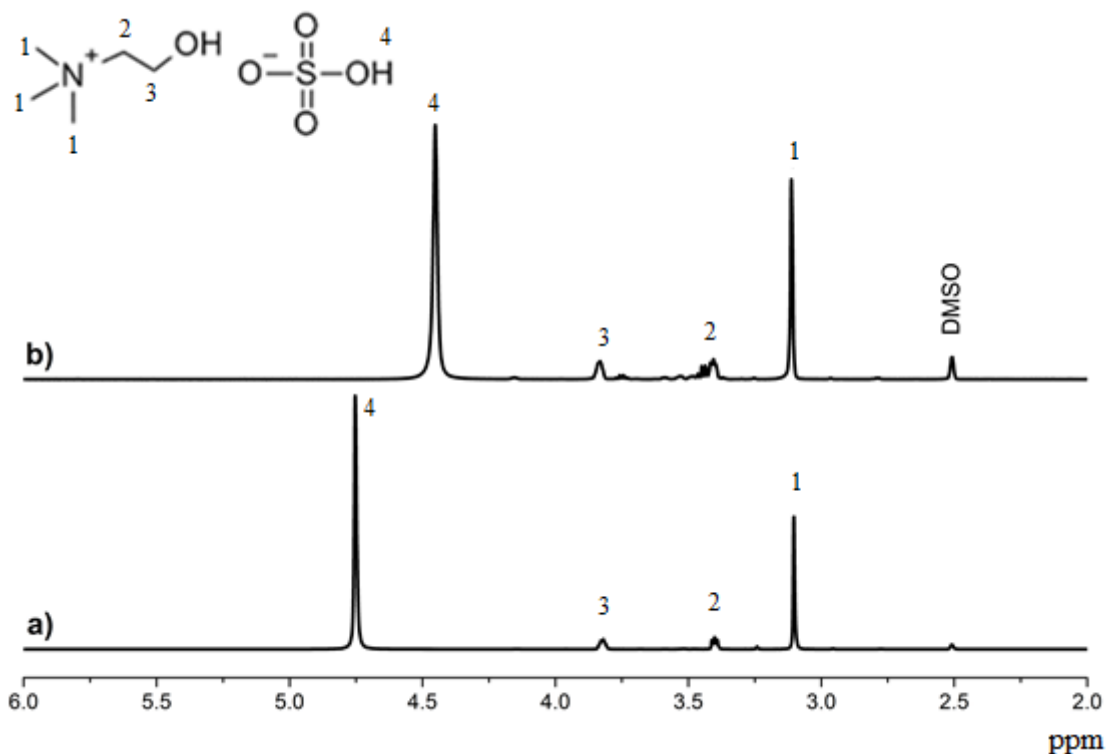


Fonte: elaborada pela autora (2021).

O RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o líquido iônico [ChAc]: (1) 3,12 ppm (9 H, s, $3 \times \text{CH}_3\text{N}$); (2) 3,42 ppm (2 H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) 3,84 ppm (2 H, t, CH_2OH); (4) 1,75 ppm (3 H, s, CH_3COO^-) e (5) 5,02 ppm (1H, t, OH). Os deslocamentos químicos de hidrogênio obtidos a partir da Figura 15 para o líquido iônico acetato de colina apresentaram semelhanças aos encontrados no trabalho de Fukaya *et al.* (2007) e Li *et al.* (2012), reforçando assim a síntese do líquido iônico acetato de colina.

Na Figura 16 o LI bissulfato de (2-hidroxi-etil)- trimetilamônio (100% v/v) produzido com ácido sulfúrico concentrado, demonstrou no espectro de RMN ^1H que os grupos metil da colina variam de 3,12 ppm (na mistura física) para 3,10 ppm (LI), o sinal do hidrogênio (2) variou de 3,41 ppm (mistura física) para 3,40 ppm (LI), já o sinal do hidrogênio (3) variou de 3,84 ppm (para a mistura física) para 3,82 ppm (LI). Da mesma forma, o singlete do grupo hidroxila do ácido sulfúrico se desloca de 4,45 ppm para 4,75 ppm (Tabela 5 e Figura 16).

Figura 16 – a) Espectro de RMN ^1H do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (100% v/v) obtido pela Síntese 1 e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido sulfúrico).



Fonte: elaborada pela autora (2021).

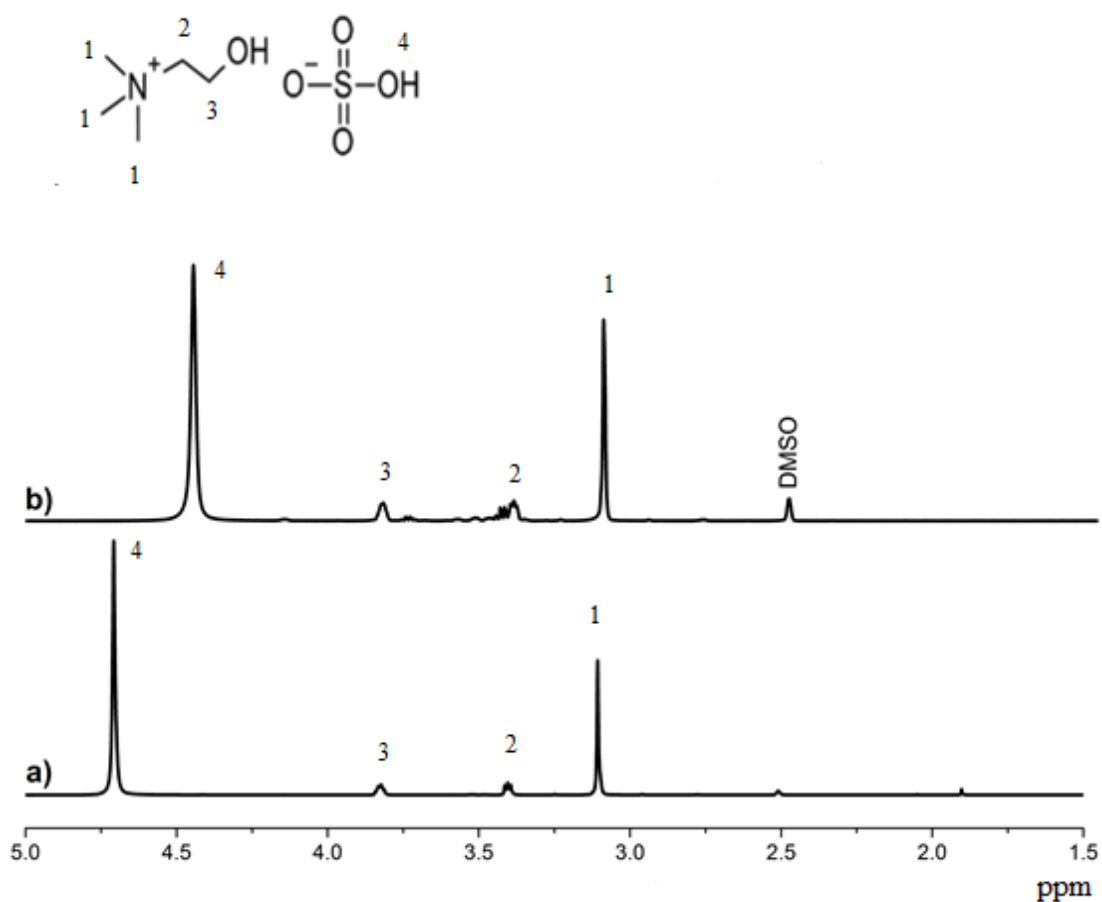
O RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o líquido iônico [ChBis]-100% v/v: (1) 3,10 ppm (9 H, s, $3 \times \text{CH}_3\text{N}$); (2) 3,40 ppm (2 H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) 3,82 ppm (2 H, t, CH_2OH) e (4) 4,75 ppm (1 H, s, OH).

O líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (Síntese 1) apresentou espectro de RMN ^1H semelhante ao espectro do LI bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (Síntese 2), representado na Figura 17. Ou seja, a diluição do ácido sulfúrico em água não interferiu na interação do cátion com o ânion.

Na Figura 17 é apresentado o espectro de RMN de ^1H do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (Síntese 2) obtido a partir da reação equimolar do hidróxido de colina com o ácido sulfúrico diluído 50% v/v. Os sinais dos hidrogênios do grupo metil da colina foram observados em 3,11 ppm para o LI bissulfato de colina (Síntese 2) e em 3,12 ppm na mistura física dos componentes usados para sintetizar este LI, o tripleto referente ao hidrogênio metilênico 2 modifica de 3,41 ppm (na mistura física) para 3,40 ppm (no LI) e o hidrogênio metilênico 3 é deslocado de 3,84 ppm para 3,82 ppm após a formação deste LI.

Também é observado que no sinal do grupo hidroxila do ácido sulfúrico ocorre variação de deslocamento químico do hidrogênio da hidroxila do ânion de 4,45 ppm (mistura física) para 4,71 ppm (LI).

Figura 17 – a) Espectro de RMN ^1H do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (50% v/v) obtido pela Síntese 2 e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes do líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (hidróxido de colina e ácido sulfúrico).



Fonte: elaborada pela autora (2021).

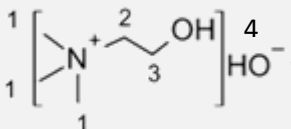
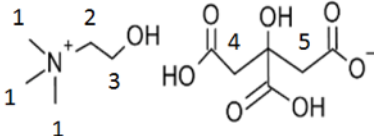
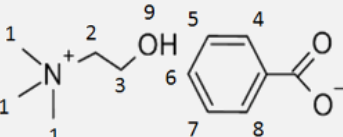
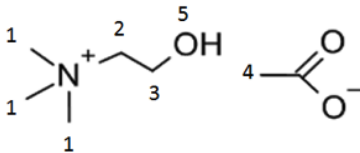
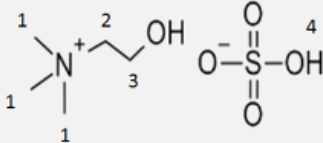
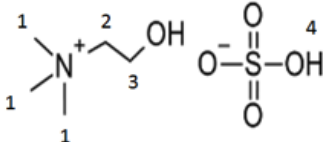
De forma sucinta, o RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o líquido iônico [ChBis]- 50% v/v: (1) 3,11 ppm (9 H, s, $3 \times \text{CH}_3\text{N}$); (2) 3,40 ppm (2 H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) 3,82 ppm (2 H, t, CH_2OH) e (4) 4,71 ppm (1 H, s, OH).

Tendo em vista que ambas as sínteses (Sínteses 1 e 2) resultaram no líquido iônico bissulfato de colina, optou-se por dar continuidade aos experimentos com a utilização do líquido iônico bissulfato de colina 50% (v/v) devido à reação ser um pouco menos exotérmica, com

isso, torna-se mais fácil controlar a temperatura do sistema com o banho de gelo quando comparado com a síntese que utiliza ácido sulfúrico 98% v/v (Síntese 1).

A Tabela 5 apresenta os deslocamentos químicos da mistura física dos precursores dos LIs (uma mistura equimolar do ácido com a base) e dos LIs a base de colina demonstrados nas Figuras 12-17.

Tabela 5 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H da mistura física dos componentes dos líquidos iônicos e dos líquidos iônicos sintetizados a partir do cátion colina.

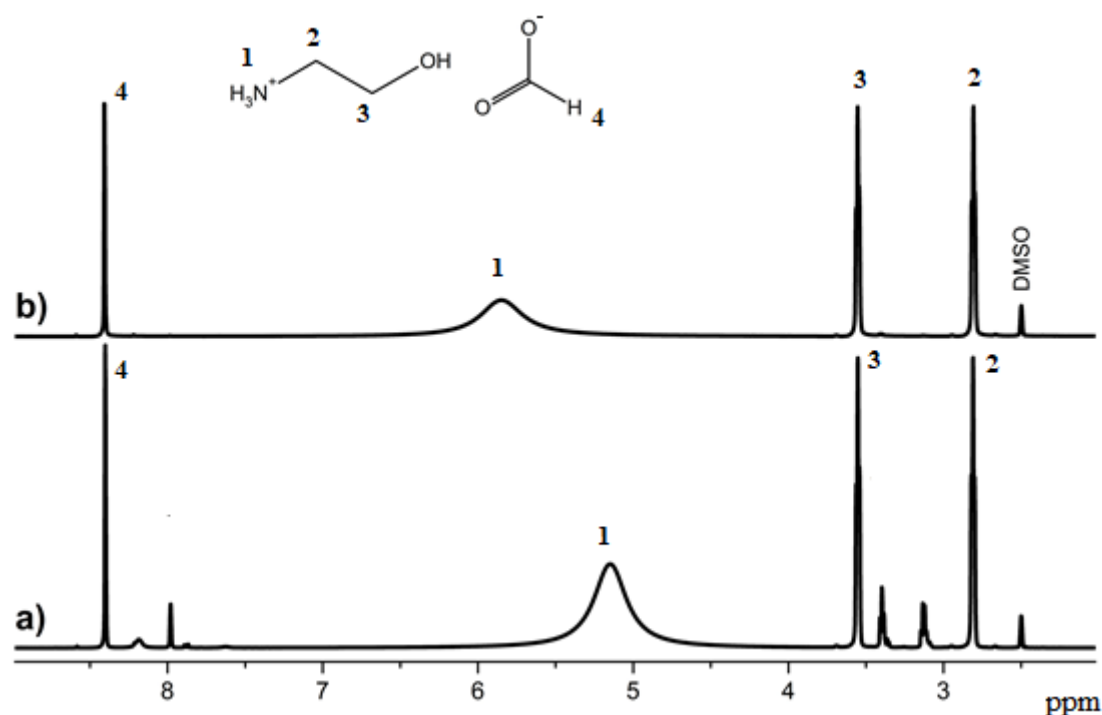
Molécula	δ ^1H (ppm) da mistura física dos líquidos iônicos	δ ^1H (ppm) do líquido iônico
Hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio 	1 – 3,14 2 – 3,30 3 – 3,83 4 – 3,93	1 – 3,13 2 – 3,17 3 – 3,93 4 – não observado
Citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio 	1 - 3,12 2 - 3,42 3 - 3,84 4 - 2,32 5 - 2,32	1 - 3,13 2 - 3,24 3 - 3,84 4 - 2,60 5 - 2,60
Benzoato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio 	1 - 3,14 2 - 3,45 3 - 3,87 4 - 7,90 5 - 7,36 6 - 7,41 7 - 7,36 8 - 7,90	1 - 3,14 2 - 3,45 3 - 3,87 4 - 7,93 5 - 7,40 6 - 7,46 7 - 7,40 8 - 7,93
Acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio 	1 - 3,12 2 - 3,42 e 3,44 3 - 3,84 4 - 1,77 5 - 4,46	1 - 3,12 2 - 3,42 3 - 3,84 4 - 1,75 5 - 5,02
Bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (H_2SO_4 50 % (v/v) - síntese 1) 	1 - 3,12 2 - 3,41 3 - 3,84 4 - 4,45	1 - 3,10 2 - 3,40 3 - 3,82 4 - 4,75
Bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio (H_2SO_4 P.A - síntese 2) 	1 - 3,12 2 - 3,41 3 - 3,84 4 - 4,45	1 - 3,11 2 - 3,40 3 - 3,82 4 - 4,71

Fonte: elaborada pela autora (2021).

De forma análoga aos líquidos iônicos obtidos a partir do cátion colina, os líquidos iônicos obtidos a partir do cátion monoetanolamina foram caracterizados por RMN ^1H .

O hidrogênio 1 do NH_3^+ da mistura física do LI 2-HEAF apresenta um singlete largo em 5,85 ppm e no LI 2-HEAF propriamente dito, apresenta-se deslocado para uma região menos desblindada em 5,15 ppm (Figura 18). Além dos hidrogênios do grupo metilênicos (2) e (3) foram observados em tripletos 2,81 ppm e 3,55 ppm na mistura física e no LI. O hidrogênio do ânion formiato é observado em 8,41 ppm para ambos, LI 2-HEAF e mistura física.

Figura 18 – a) Espectro de RMN ^1H do líquido iônico formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF) e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes utilizados na síntese do líquido iônico formiato de 2-hidroxi-etilamônio (ácido fórmico e monoetanolamina).



Fonte: elaborada pela autora (2021).

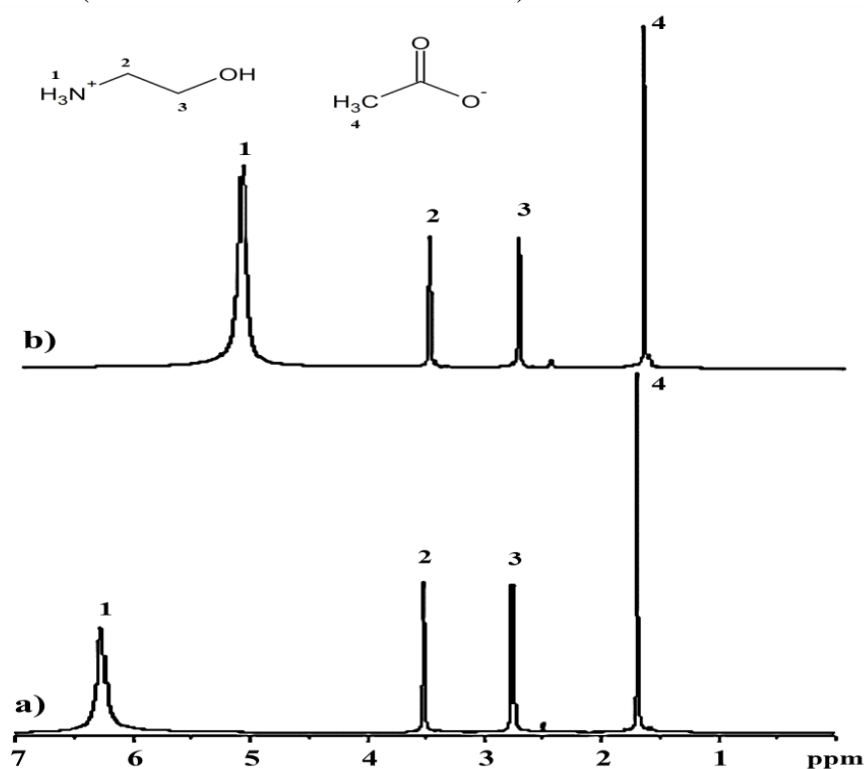
O RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o líquido iônico 2-HEAF (1) 5,15 ppm (3 H, s, NH_3^+); (2) 2,81 ppm (2H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) 3,55 ppm (2 H, t, CH_2OH) e (4) 8,41 ppm (1 H, s, CHCOO^-).

Na Figura 19 está apresentado o espectro de RMN de ^1H do líquido iônico acetato 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA) e da mistura física dos componentes utilizados na síntese deste líquido iônico (ácido acético e monoetanolamina).

Não houve variações significativas de deslocamentos químicos dos hidrogênios metílicos 2 do ácido acético, quando se compara a mistura física com o líquido iônico 2-HEAA

(Figuras 19a e 19b). Contudo, observou-se modificação considerável do deslocamento químico do hidrogênio do grupo amina da monoetanolamina, representado no sinal em 5,12 ppm na mistura física e em 6,28 ppm no espectro do líquido iônico sintetizado (2-HEAA), indicando assim a formação do líquido iônico acetato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAA).

Figura 19 – a) Espectro de RMN ^1H do líquido iônico acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2 HEAA) e b) Espectro de RMN ^1H da mistura física dos componentes utilizados na síntese do líquido iônico acetato 2-hidroxi-etilamônio (ácido acético e monoetanolamina).

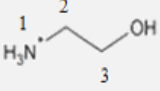
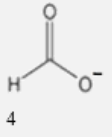
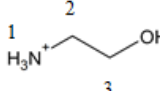
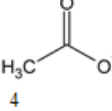


Fonte: elaborada pela autora (2021).

O RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o líquido iônico 2-HEAA (1) 6,28 ppm (3 H, s, NH_3^+); (2) 2,77 ppm (2H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); (3) 3,53 ppm (2 H, t, CH_2OH) e (4) 1,70 ppm (1 H, s, CH_3COO^-).

A Tabela 6 apresenta os deslocamentos químicos da mistura física dos precursores dos LIs e os LIs obtidos (2-HEAF e 2-HEAA).

Tabela 6 – Deslocamento químicos de RMN de ^1H da mistura simples dos precursores de LIs e dos LIs sintetizados a partir do cátion monoetanolamina.

Molécula	δ ^1H (ppm) da mistura física dos líquidos iônicos	δ ^1H (ppm) do líquido iônico
Formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF) <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>	1 – 5,85 2 – 2,81 3 – 3,55 4 – 8,41	1 – 5,15 2 – 2,81 3 – 3,55 4 – 8,41
Acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA) <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>	1 – 5,12 2 – 2,77 3 – 3,53 4 – 1,70	1 – 6,28 2 – 2,77 3 – 3,53 4 – 1,70

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Na Figura 20 são demonstradas as contribuições de cada átomo de carbono ligado à estrutura da molécula dos LIs. Essa análise é importante para ratificar a síntese e estrutura dos mesmos.

Figura 20 – Espectros de RMN ^{13}C em DMSO- d_6 dos líquidos iônicos: a) [ChOH]; b) [ChAc]; c) [ChBenz]; d) [ChCit]; e) [ChBis]-50%; f) [ChBis]-100%; g) 2-HEAA e h) 2-HEAF. (Continua)

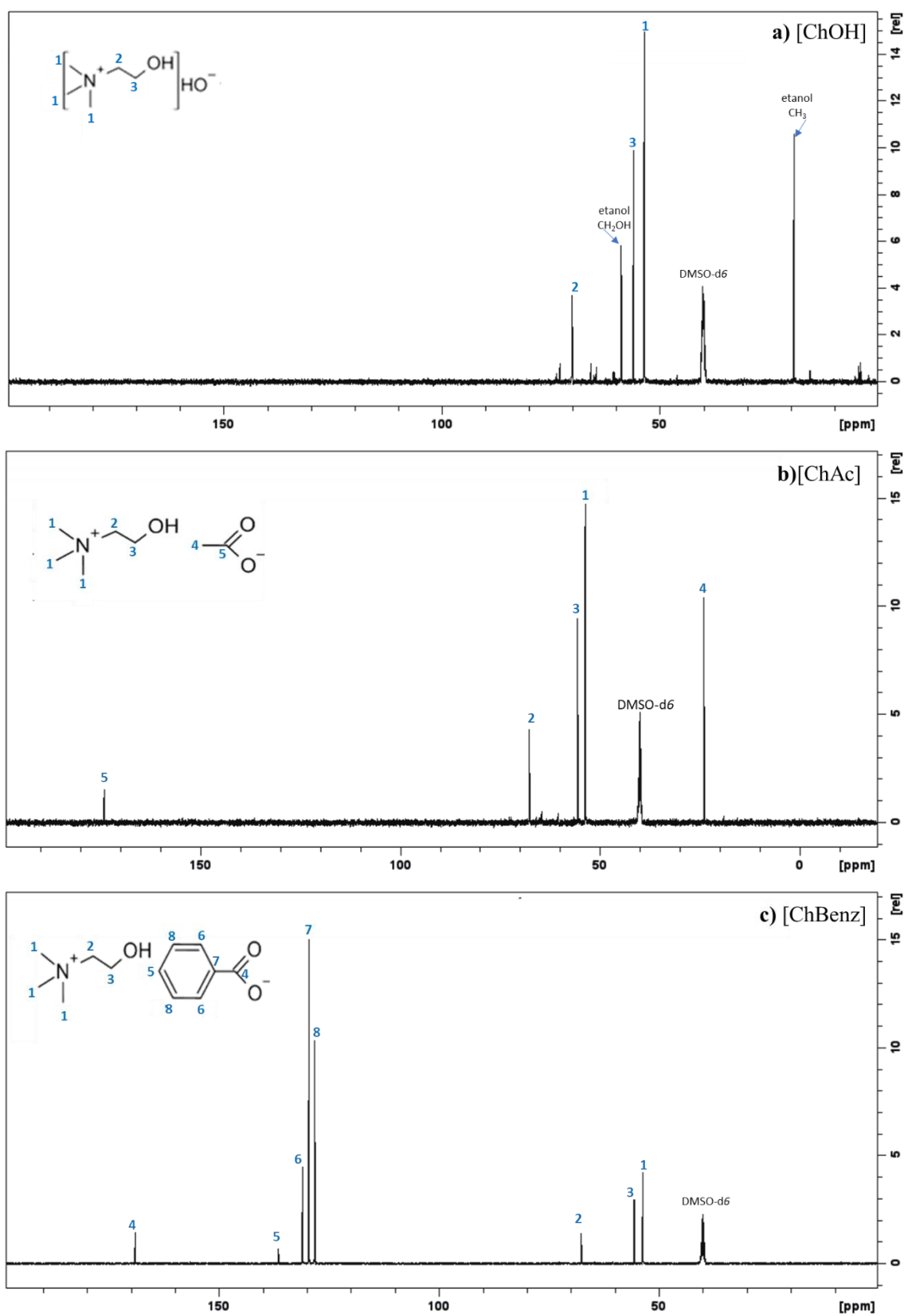


Figura 20 – Espectros de RMN ^{13}C em DMSO- d_6 dos líquidos iônicos: a) [ChOH]; b) [ChAc]; c) [ChBenz]; d) [ChCit]; e) [ChBis]-50%; f) [ChBis]-100%; g) 2-HEAA e h) 2-HEAF. (Continuação)

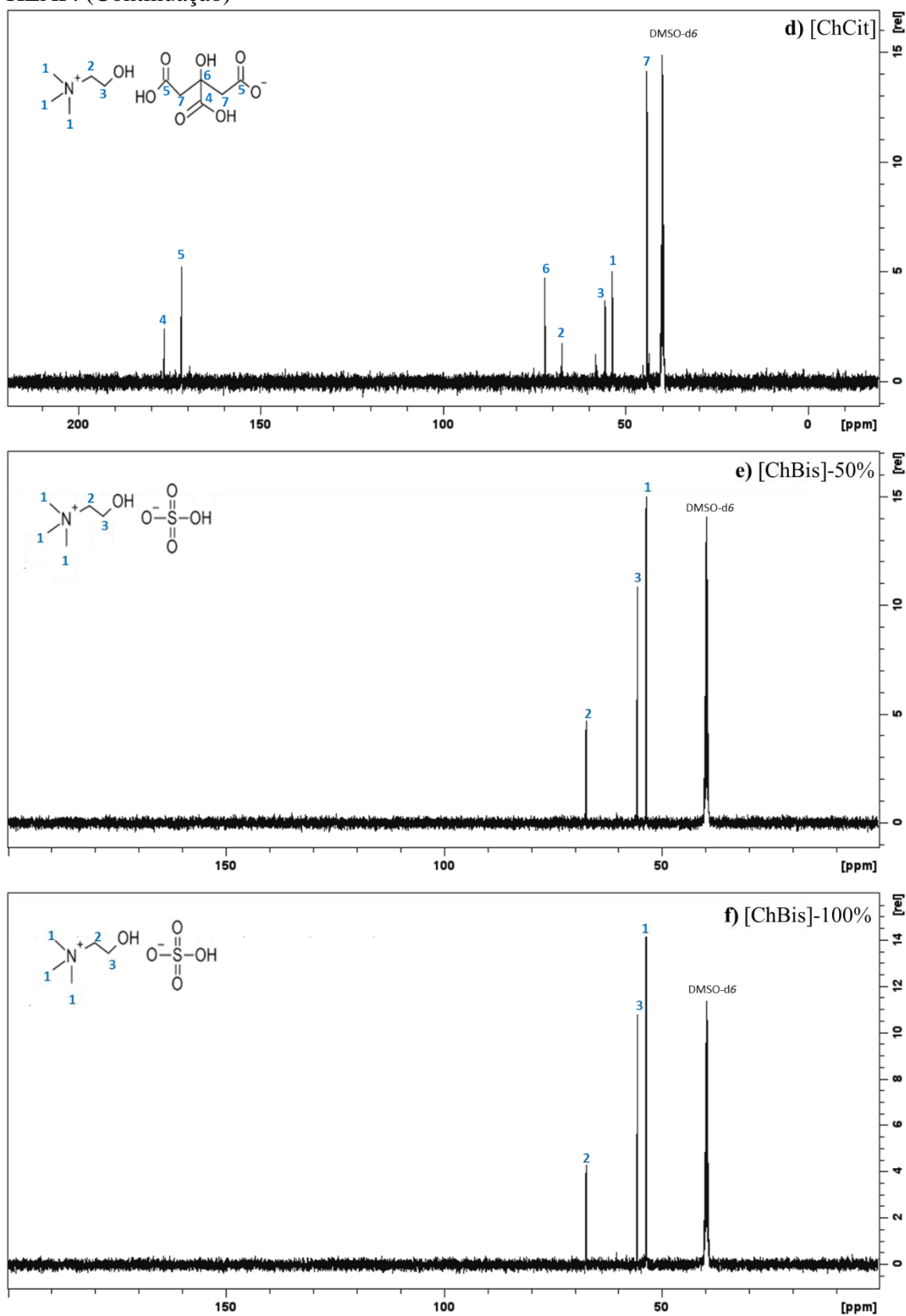
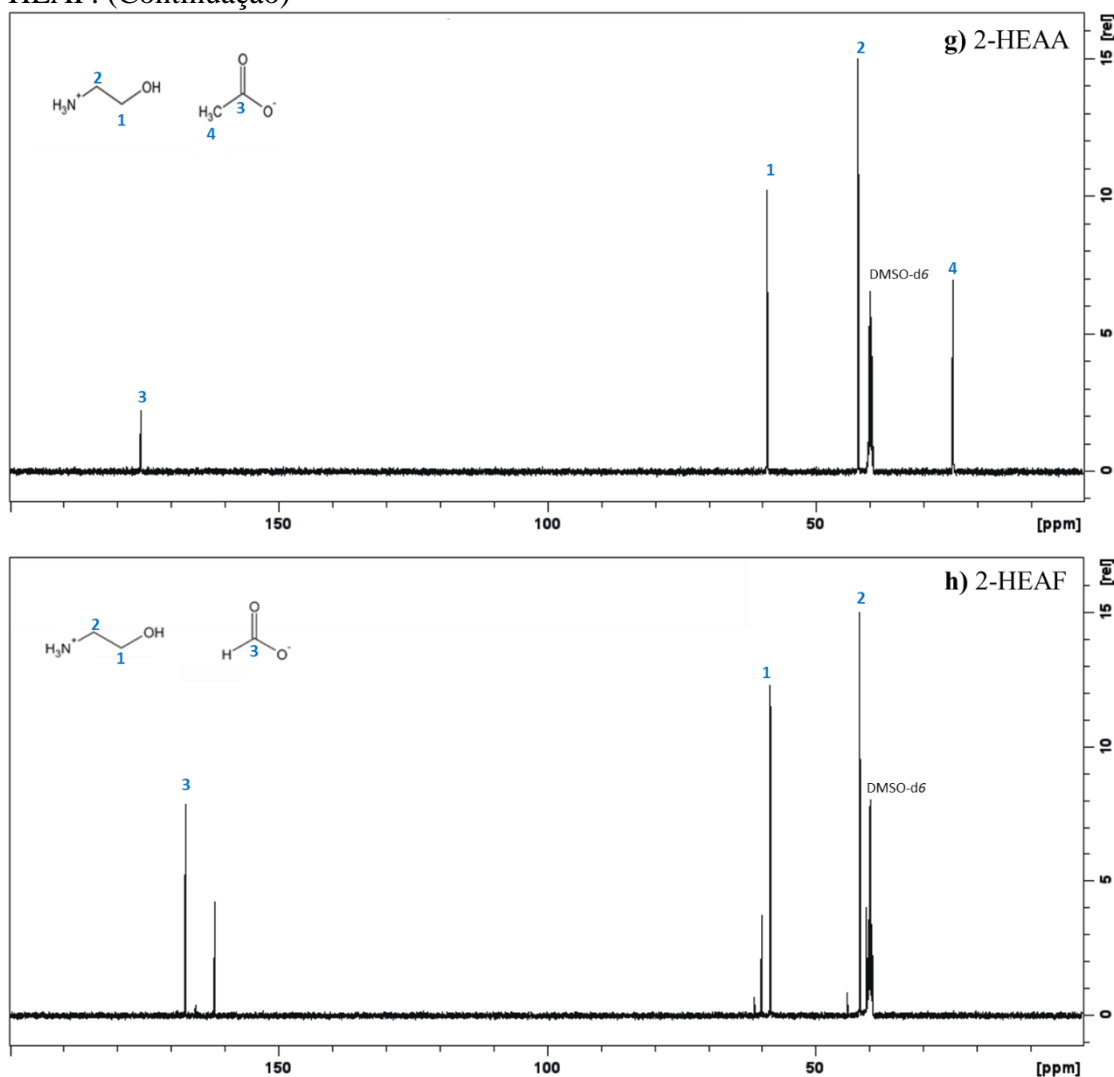


Figura 20 – Espectros de RMN ^{13}C em DMSO- d_6 dos líquidos iônicos: a) [ChOH]; b) [ChAc]; c) [ChBenz]; d) [ChCit]; e) [ChBis]-50%; f) [ChBis]-100%; g) 2-HEAA e h) 2-HEAF. (Continuação)



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.1.4 Ensaios de toxicidade aguda dos LIs frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

O potencial de toxicidade dos líquidos iônicos totalmente solúveis em água, como [ChBis], [ChAc], [ChCit], 2-HEAA e 2-HEAF, foi determinado pelo ensaio de toxicidade aguda frente a *Artemia salina*. A letalidade exercida sobre os náuplios da *Artêmia salina* vem sendo utilizado em bioensaios laboratoriais como forma de predizer a toxicidade química em organismos aquáticos por meio da estimativa da dose letal média (DL_{50}), observadas na Tabela 7.

O microcrustáceo *Artemia salina* é um organismo invertebrado, componente da fauna de águas salinas e ecossistemas marinhos. Este microcrustáceo já vem sendo estudado com sucesso na estimativa da toxicidade de líquidos iônicos (GOUVEIA *et al.*, 2014).

Tabela 7 – Valores de DL₅₀ para os líquidos iônicos frente a *Artemia salina* em 48 h de exposição.

Tempo	DL ₅₀ (µg/mL)					
	[ChOH]	[ChAc]	[ChBis]	[ChCit]	2-HEAA	2-HEAF
48h	Não calculável	529	503	410	Não calculável	Não calculável

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Os dados de DL₅₀ apresentados na Tabela 7 mostram que dentre os LIs baseados no cátion colina o que apresenta maior cadeia do ânion, [ChCit], foi ligeiramente mais tóxico para *A. salina*, valor de DL₅₀ de 410 µg/mL. O LI com menor cadeia do ânion, [ChBis], apresentou valor de DL₅₀ de 503 µg/mL, pode-se especular que isso ocorreu devido ao caráter ácido desse LI, diminuindo assim o pH da solução salina, tornando-se mais letal para as larvas.

Para os LIs com o mesmo ânion acetato, e diferentes cátions (colina e monoetanolamina), observa-se que o 2-HEAA obtido a partir do cátion monoetanolamina não apresentou toxicidade frente a *A. salina*. Enquanto, o LI a partir do cátion colina [ChAc] apresentou DL₅₀ de 529 µg/mL após 48h. Foi relatado por Kebaili *et al.* (2020) que os LIs obtidos a partir de sal de amônio quaternário são geralmente tóxicos devido ao seu caráter lipofílico, já Gouveia *et al.* (2014) analisaram também o efeito do cátion na toxicidade dos LIs e observaram que para o mesmo ânion brometo, a toxicidade aumenta ligeiramente com o aumento do comprimento da cadeia alquílica (butil para hexil) presente em ambos os grupos principais, imidazólio e piridínico. O valor de DL₅₀ encontrado para o LI [ChAc] indica que o mesmo apresenta baixa toxicidade.

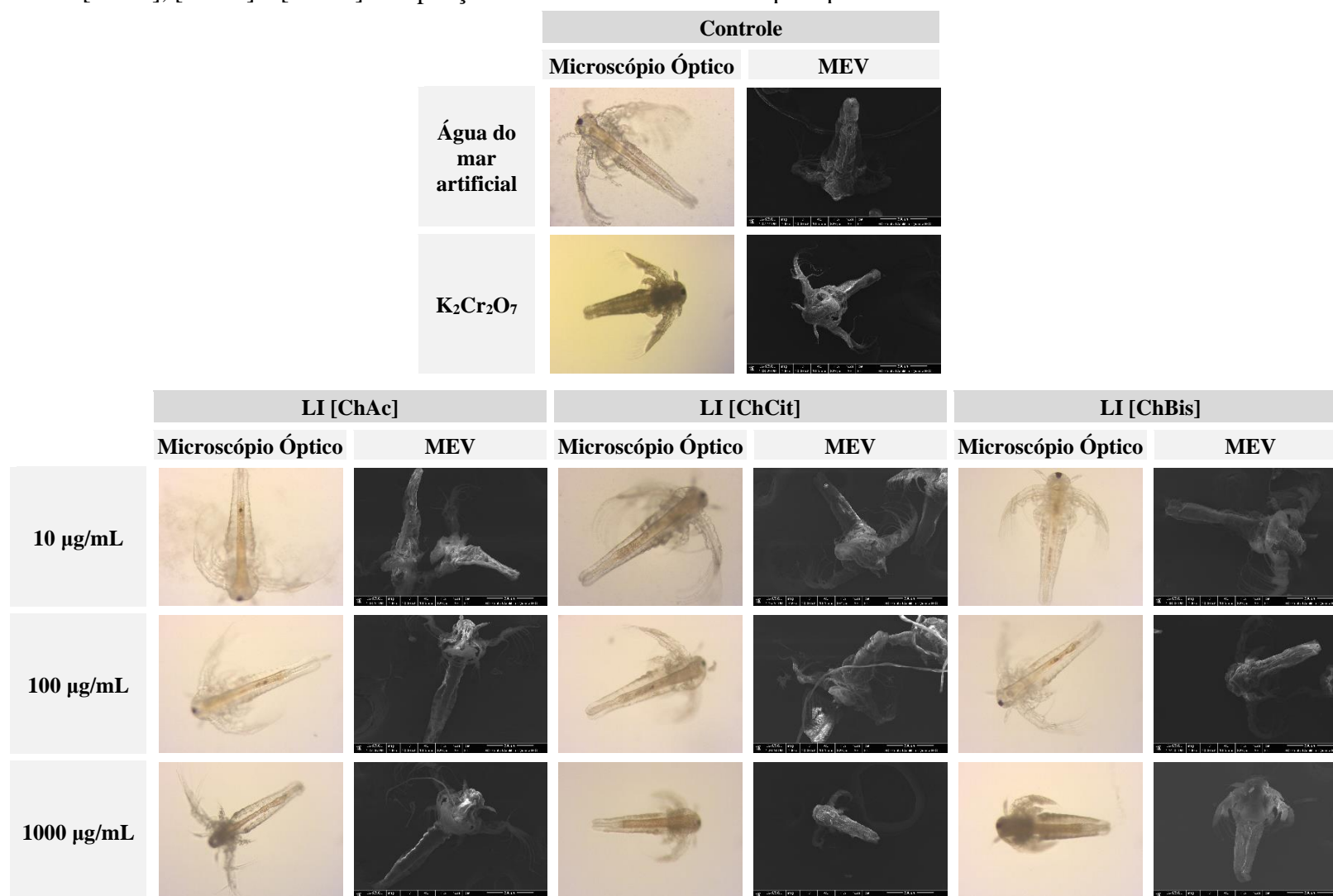
De um modo geral, no tempo de 48 h foi observada baixa porcentagem de *Artemia salinas* mortas no ensaio usando a maior concentração (1000 µg/mL) de 2-HEAA, 2-HEAF e [ChOH]. Os gráficos comparativos foram demonstrados no material suplementar (APÊNDICE A, Figura A.1). O efeito da toxicidade do LI é variável e depende da sua estrutura química (KEBAILI *et al.*, 2020).

Os demais LIs apresentaram baixa toxicidade frente a *Artemia salina* com níveis de $DL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, isso, de acordo com a relação estabelecida por Dollabela 1997, indica compostos de baixa toxicidade ou não tóxico.

Todos LIs sintetizados nesse trabalho apresentaram menor toxicidade que o LI comercial amplamente utilizado, o tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazólio, cujo valor de DL_{50} foi de $45,3 \mu\text{g/mL}$ frente a *Artemia Franciscana* (TSARPALI; DAILIANIS, 2015). Reddy *et al.* (2020) mostraram em seu trabalho que os LIs comerciais estudados, o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio; iodeto de 1-dodecil-3-metilimidazólio e cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio, apresentando valores de DL_{50} de $1555 \mu\text{g/mL}$; $1,279 \mu\text{g/mL}$ e $1,1507 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, frente aos náuplios de *Artemia salina*. O iodeto de 1-dodecil-3-metilimidazólio e cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio apresentaram-se mais tóxicos do que os LIs sintetizados nessa pesquisa.

Mesmo apresentando baixa toxicidade frente a *Artemia salina*, analisou-se as mudanças estruturais nos indivíduos quando expostos às soluções de LI, cujos resultados estão apresentados na Figura 21, a partir das análises de MEV e microscopia óptica dos náuplios. A critério de comparação, foi analisado também os náuplios expostos ao controle negativo (somente água do mar artificial) e controle positivo (solução de dicromato de potássio).

Figura 21 – Microscopia óptica e microscopia óptica de varredura dos náuplios de *Artemia salina* expostos ao teste de toxicidade aguda nos líquidos iônicos [ChAc], [ChCit] e [ChBis]. Ampliação de 100 vezes no microscópio óptico e 500 vezes no MEV.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Os náuplios do grupo de controle negativo (água do mar artificial) apresentaram morfologia típica, com intestino sem dilatações, com lúmen intestinal translúcido e sem partículas aderidas ao abdômen. O grupo de controle positivo (dicromato de potássio) apresentou intestino distendido e *Artemias salina* de tamanho menor pois não desenvolveram.

A exposição dos náuplios a concentração de 10 µg/mL dos LIs [ChAc], [Ch Bis] e [ChCit], apresentou material denso no trato digestório e presença de poucas partículas nas antenas (observada por MEV). Na concentração de 100 µg/mL dos LIs, não foram observadas variações significativas comparando com as já demonstradas na concentração de 10 µg/mL, exceto para os náuplios expostos ao LI [ChBis], apresentaram-se mais frágeis e com maior quantidade de partículas presentes nas antenas.

Em 1000 µg/mL de LI, observa-se que os náuplios sofreram mais danos, o trato digestório mostrou-se dilatado e maior presença de material denso na superfície do náuplio.

Então, conclui-se que os LIs aqui estudados são de caráter pouco ou não tóxico frente a *Artemia salina*, de acordo com os valores de DL₅₀ e a morfologia, observada a partir do MEV e microscopia, encontra-se preservada sem perdas de antenas ou rupturas. Os resultados aqui obtidos possibilitam indicar LIs com menores riscos ecotoxicológicos do que os solventes orgânicos convencionais.

Vale ressaltar que o bioensaio frente a *Artemia salina* é um teste de toxicidade preliminar, sendo necessários estudos complementares.

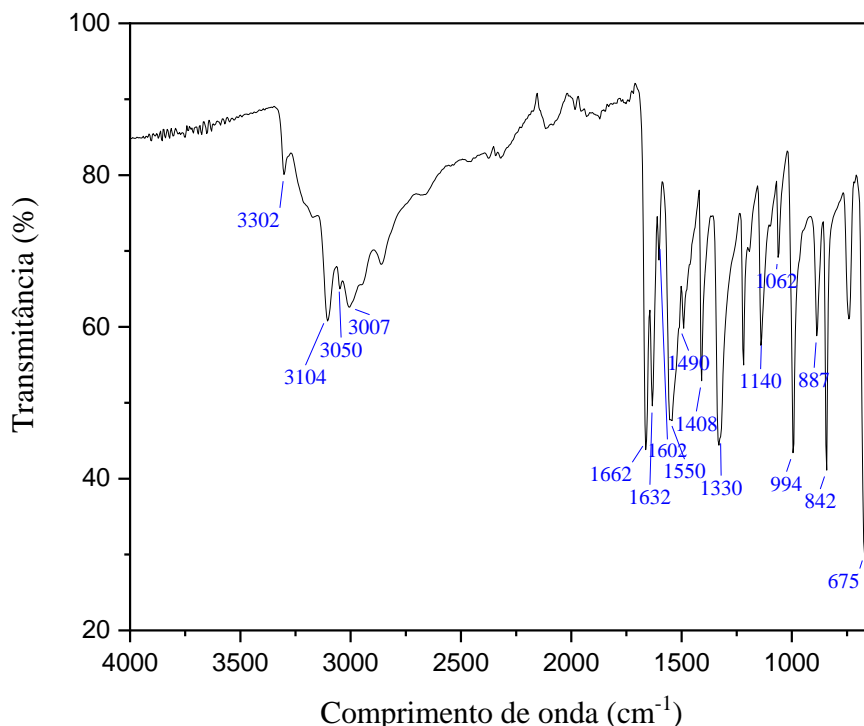
4.2 Caracterização da isoniazida após cristalização com líquidos iônicos

Os LIs [ChOH], [ChAc], [ChBenz], [ChCit], [ChBis] (Síntese 2), 2-HEAA e 2-HEAF, sintetizados e caracterizados no Tópico 4.1 foram utilizados na cristalização da isoniazida com intuito de avaliar a obtenção de novas formas deste fármaco. Foram observadas sete novas formas de INH:LI, com solubilidade e estabilidade térmica diferente quando comparados a isoniazida padrão. Essas novas formas sólidas foram caracterizadas por FT-IR, DSC, TGA, Raios-X, MEV e RMN.

4.2.1 Análise de FT-IR da isoniazida padrão e das formas de INH:LI

Com o intuito de traçar um comparativo com o produto final, analisou-se primeiramente o FT-IR da isoniazida padrão (Figura 22).

Figura 22 – Espectro de infravermelho da isoniazida padrão.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Os grupos funcionais da isoniazida padrão exibem frequências por IR a 3302 cm^{-1} (estiramento NH), 3104 cm^{-1} (estiramento NH_2) e as bandas em 3070 cm^{-1} e 3050 cm^{-1} são atribuídas às vibrações do estiramento C-H do anel aromático, assim como observado também por Swapna *et al.* (2014).

No espectro apresentado na Figura 22, foi observada em 1662 cm^{-1} uma banda referente ao estiramento C=O da carbonila do grupo hidrazida, que de acordo com Arungati *et al.* (2018) essa banda é a considerada mais representativa no espectro de infravermelho. A banda em 1632 cm^{-1} é atribuída à deformação do grupamento NH_2 da hidrazida CONHNH_2 . Bandas de média intensidade em 1550 cm^{-1} e 1602 cm^{-1} estão relacionadas com os estiramentos simétricos e assimétricos do anel aromático da molécula, respectivamente, e em 1330 cm^{-1} , tem-se uma representação das vibrações C-N do anel piridínico.

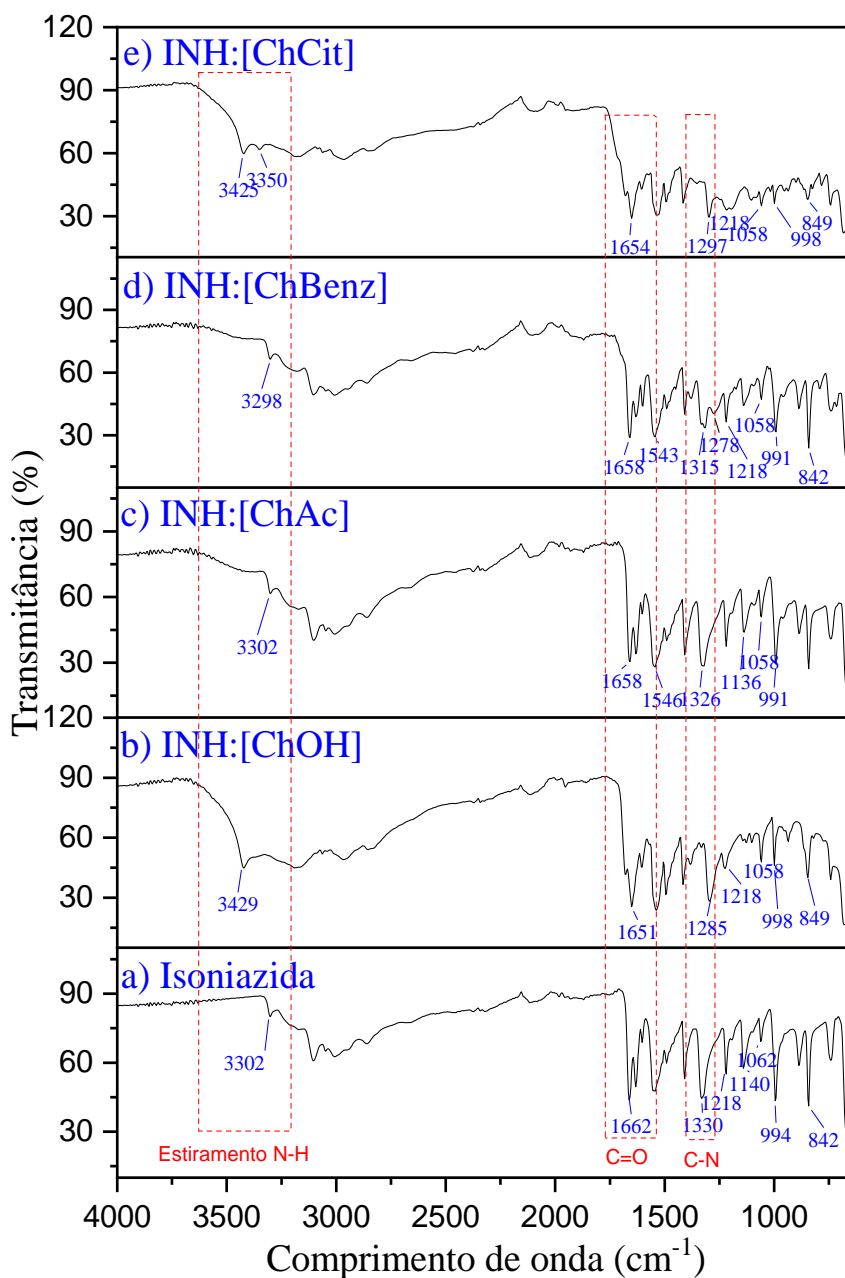
As bandas em 1490 cm^{-1} e 1408 cm^{-1} correspondem às vibrações C-CH dentro do anel. Vibração N-N na INH foi relatada em 1156 cm^{-1} por Freitas *et al.* (2013), em 1118 cm^{-1}

(SHEEJA *et al.*, 2010), banda de média intensidade em 1112 cm^{-1} (ARUNAGIRI *et al.*, 2018), em 1052 cm^{-1} (KARROUCHI *et al.*, 2020). Nesse trabalho foi observado em 1140 cm^{-1} . As flexões assimétricas no anel de C-C-C foram observadas em 742 cm^{-1} e C-C-N em 1020 cm^{-1} e em 675 cm^{-1} , flexões C-C=O.

Podem ser observadas bandas em 994 cm^{-1} correspondente às deformações no plano no anel aromático da molécula e em 887 cm^{-1} , flexão C-H fora do plano. Juntamente com banda em 842 cm^{-1} corresponde ao grupamento (-NH₂) do espectro de infravermelho também observada no trabalho de (PAULA; VILELA, 2009).

A partir dos dados espectrais da isoniazida padrão, traçou-se um comparativo com as formas de isoniazida cristalizada nos líquidos iônicos sintetizados. Os espectros de infravermelho da isoniazida cristalizada nos líquidos iônicos [ChOH], [ChAc], [ChBenz] e [ChCit] estão expostos na Figura 23.

Figura 23 – Espectros de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão, INH:[ChOH]; INH:[ChAc]; INH:[ChBenz] e INH:[ChCit].



Fonte: elaborada pela autora (2021).

A região de 3302 cm⁻¹ observada na isoniazida padrão (Figura 23a), que compreende o estiramento NH da amina primária, surgiu em 3298 cm⁻¹ (INH:[ChBenz]), 3302 cm⁻¹ (INH:[ChAc]), 3350 cm⁻¹ (INH:[ChCit]) e em 3429 cm⁻¹ (INH:[ChOH]).

As principais variações observadas nos espectros de infravermelho da INH:[ChAc] (Figura 23c) e INH:[ChBenz] (Figura 23d) foram no estiramento C=O da carbonila, no estiramento assimétrico do anel aromático como, também, da ligação NH₂ e NH.

A INH:[ChCit] e INH:[ChOH] apresentaram banda de baixa intensidade (quando comparadas com a isoniazida padrão) em 1058 cm^{-1} que corresponde a vibrações de N-N localizadas fora do plano de flexão do anel. A banda correspondente ao estiramento C=O da carbonila em 1662 cm^{-1} na isoniazida se desloca para região de menor frequência (Fig. 23), 1651 cm^{-1} (INH:[ChOH]) e 1654 cm^{-1} (INH:ChCit).

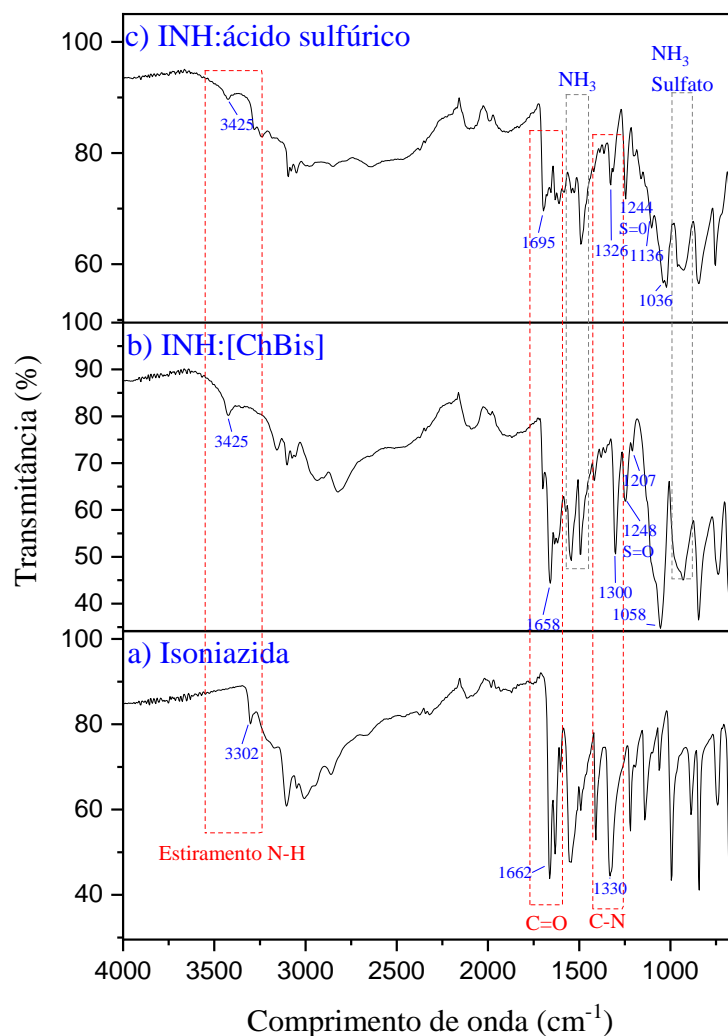
A banda em 3302 cm^{-1} apareceu deslocada na isoniazida cristalizada em líquido iônico citrato de colina e hidróxido de colina e o surgimento de uma nova banda em $3421,69\text{ cm}^{-1}$ em INH:[ChCit]. Sevukarajan *et al.* (2011) identificaram a formação de complexo molecular de isoniazida com ácido L-(+)-tartárico a partir da observação do grupo NH_2 da isoniazida protonado em $3317,18\text{ cm}^{-1}$ e 3166 cm^{-1} .

Houve ainda variação na região de 1297 cm^{-1} (INH:[ChCit]), região que compreende o estiramento C-O do ânion do LI e C-N do anel piridínico da isoniazida.

Variações nas bandas em 842 cm^{-1} do grupamento NH_2 e 742 cm^{-1} atribuídas às flexões fora do plano do anel foram observadas nos espectros das formas INH:[ChCit] e INH:[ChBenz] (como demonstrado na Figura 23).

Tendo que a partir dos raios X por monocristal, o qual será posteriormente discutido no tópico 4.2.4, a interação do LI bissulfato de colina com a isoniazida formou o sulfato de 2-(4-piridinocarbonil)-hidrazina, cuja estrutura já foi previamente relatada por Melo e colaboradores (2016). Traçou-se também o comparativo das formas INH:[ChBis] (Figura 24b) e INH:H₂SO₄ (Figura 24c).

Figura 24 – Espectros de infravermelho (FT-IR): a) isoniazida padrão; b) INH:[ChBis] e c) INH:ácido sulfúrico.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

A região de 3300 cm⁻¹ pode ser atribuída também a NH₂ livre em amidas, em que os espectros de absorção na região do infravermelho para os três compostos apresentaram modificação nessa banda. A região de C=N do anel piridínico também apresentou modificação.

Nos espectros demonstrados na Figura 24, observou-se variação do grupo C=O (verificar na Tabela 8). Devido à sobreposição das bandas de vibrações C-CH do anel, não foi possível observar o surgimento do pico em 1525 cm⁻¹, mas foi observado variação nessa região, fornecendo indícios de protonação (referente à formação de grupo NH₃).

Os perfis espectrais das formas INH:[ChBis] e INH:H₂SO₄ revelaram o aparecimento de bandas na região de 1036-1207 cm⁻¹, referentes a presença de δ S-O (sulfato), Benosman *et al.* (2013) observaram em seu trabalho a presença de banda na região de 1105-

1110 cm^{-1} e Rana e Tiwary (2007) em 1130 cm^{-1} e caracterizam como a presença do grupo sulfato.

O surgimento de banda por volta de 1003 cm^{-1} corresponde também ao grupo NH_3 (NENKOVA; VASILEVA; STANULOV, 2008). A Figura 24b e 24c apresentaram modificações nessa região (aproximadamente 1062 cm^{-1}). Devido à complexidade da matriz, os espectros no infravermelho apresentam-se congestionados e com sobreposições de banda. Contudo, nas Figuras 24b e 23c apareceram picos de baixa intensidade em 1207 cm^{-1} (INH:[ChBis]) e 1136 cm^{-1} para INH:ácido sulfúrico.

Na Figura 24 foram observadas ainda variações na região de 1155 cm^{-1} , ao comparar os espectros do INH:[ChBis] e INH:H₂SO₄ com a isoniazida padrão, levantando mais indícios da formação de grupos ($-\text{NH}_3^+$) na isoniazida, formando assim o sulfato de 2-(4-piridiníocarbonil)-hidrazina, tanto com o LI [ChBis], quanto com o ácido sulfúrico.

Observou-se a presença de banda no espectro de infravermelho do INH:[ChBis] em 1248 cm^{-1} e em 1244 cm^{-1} para o INH:H₂SO₄, de acordo com Khodaparast *et al.* (2021), são vibrações de alongamento assimétrico de S-O.

Pode-se observar mudança no comprimento de onda relacionado ao estiramento NH da amina secundária, como também no estiramento C=O em 1666 cm^{-1} , em que Aitipamula *et al.* (2013) consideram que a mudança nesse comprimento de onda é indício de interação com a isoniazida (AITIPAMULA *et al.*, 2013).

Melo *et al.* (2016) indicaram que a formação do sulfato de isoniazida ocorre a protonação do átomo de amida N₃ e do átomo de piridina N₂. Essa variação foi significativa na nova forma cristalizada da isoniazida no líquido iônico bissulfato de colina e da obtida usando o ácido sulfúrico.

As variações encontradas na Figura 24 foram sumarizadas na Tabela 8.

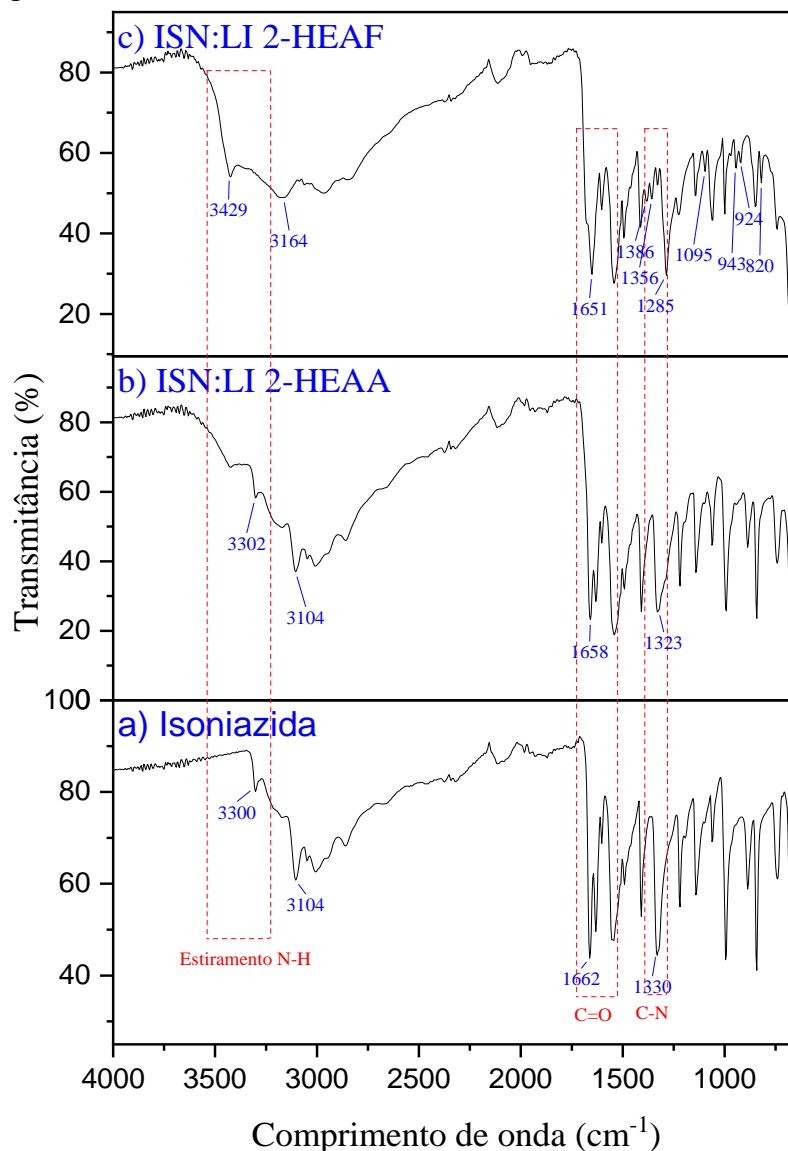
Tabela 8 – Dados espectrais de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão; INH:[ChBis] e INH:H₂SO₄.

Grupo Funcional	Isoniazida (cm ⁻¹)	INH:[ChBis] (cm ⁻¹)	INH:H ₂ SO ₄ (cm ⁻¹)
Estiramento assimétrico –NH	3302	3425	3425
Estiramento NH ₂ da amina secundária	3104	3101	3093
Estiramento da ligação C-H do anel aromático	3007 3050	3056	3052,60
Estiramento C=O	1662	1658	1695
C–N do anel piridínico	1330	1300,84	1326,90
Ligações C=C	1550 1602	1546 1589	1543 1580
S=O	-	1248	1244
Vibrações de N-N localizadas fora do plano de flexão do anel aromático da molécula	1140	-	-
SO ₄ ²⁻	-	1058/1207	1036/1136
Flexões fora do plano do anel	742 670 656	738 667	752 670
Vibrações C-CH dentro plano do anel	1490,93 1408	1490,93 1416,38	1490,93 1420

Fonte: elaborada pela autora (2021).

O espectro de FT-IR da isoniazida cristalizada nos líquidos iônicos obtidos a partir do cátion monoetanolamina, LIs 2-HEAA e 2-HEAF, são demonstrados na Figura 25.

Figura 25 – Espectros de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão; INH:2-HEAA e INH:2-HEAF.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

As variações mais significativas nos espectros de infravermelho reportados na Figura 25 foram observados na região de 3500-3000 cm⁻¹. Nessa região podem existir bandas que representam os grupos OH e NH livres ou associados, havendo sobreposição, dificultando assim a atribuição da banda (EVORA *et al.*, 2002).

Na forma sólida INH:2-HEAA não foi observada mudança significativa nas bandas quando comparada à isoniazida padrão (Figura 25b). As únicas bandas que apareceram deslocadas em relação à isoniazida padrão foi a referente ao C=O da carbonila em 1658 cm⁻¹ e vibração de estiramento do C-N em 1323 cm⁻¹.

A isoniazida cristalizada no líquido iônico 2-HEAF (Figura 25c) exibiu bandas em 820, 924, 943, 1095, 1386 e 1356 cm^{-1} , que não foram observadas na isoniazida padrão e na isoniazida cristalizada em LI 2-HEAA (Figura 25b). Também houve um pequeno deslocamento da banda referente ao grupamento NH_2 de 1218 cm^{-1} na isoniazida para 1285 cm^{-1} para isoniazida cristalizada em LI 2-HEAF.

De forma geral, os resultados obtidos nesse tópico dão indícios de que os LIs utilizados na cristalização da isoniazida podem interagir com os átomos de nitrogênio do NH_2 , com os átomos de oxigênio do grupo $\text{C}=\text{O}$ e o grupamento piridínico $\text{C}-\text{N}$ da isoniazida. Mukherjee e Desiraju (2014) identificaram como impressão digital das interações ácido...piridina o deslocamento na banda em 1330 cm^{-1} . Essas modificações são demonstradas na Tabela 9.

Tabela 9 – Dados espectrais de infravermelho (FT-IR) da isoniazida padrão e das formas INH:[ChOH]; INH:[ChAc]; INH:[Benz]; INH:[ChCit]; INH:2-HEAA e INH:2-HEAF.

AMOSTRA	GRUPO FUNCIONAL		
	N-H (cm ⁻¹)	C=O (cm ⁻¹)	C-N (cm ⁻¹)
Isoniazida padrão	3300	1662	1330
INH:[ChOH]	3429	1651	1285
INH:[ChAc]	3302	1658	1326
INH:[Benz]	3298	1658	1315
INH:[ChCit]	3350	1654	1297
INH:[ChBis]	3425	1658	1300
INH:2-HEAA	3302	1658	1323
INH:2-HEAF	3429	1651	1285

Fonte: elaborada pela autora (2021).

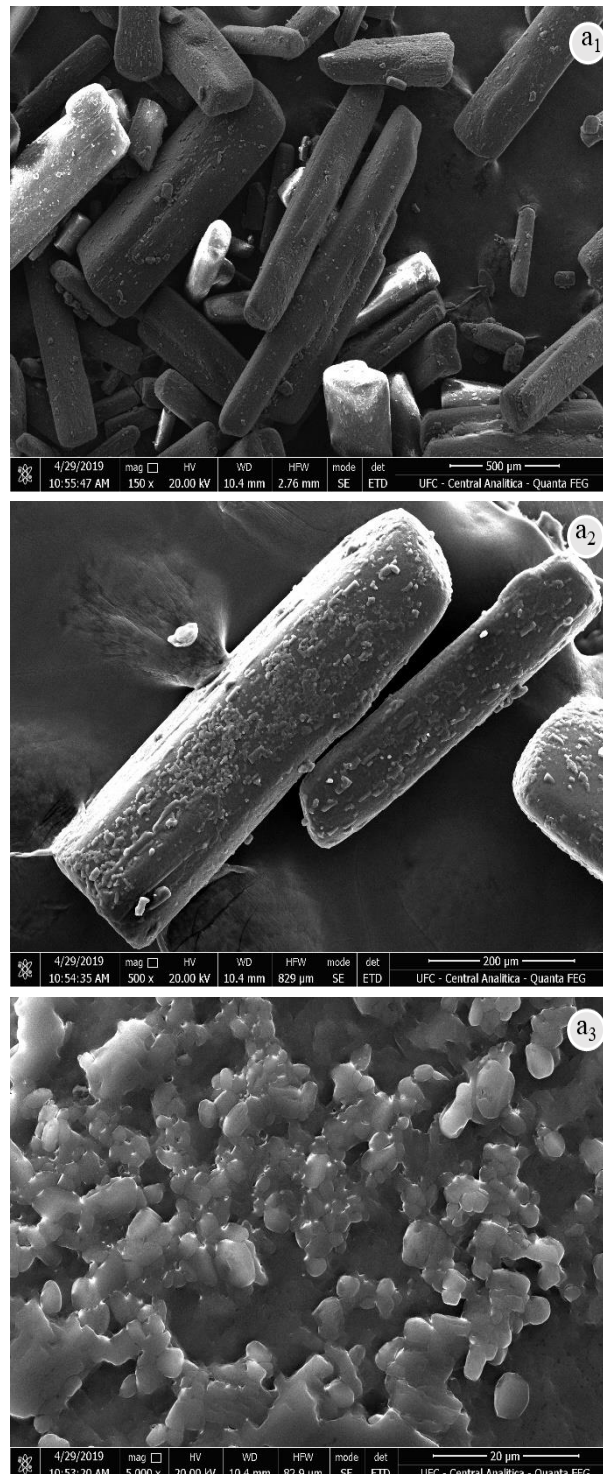
O hábito dos cristais de isoniazida nos diferentes LIs podem ser observados por MEV e microscopia óptica.

4.2.2 *Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da isoniazida padrão e das formas de INH:LI*

A partir da microscopia eletrônica de varredura foi possível obter a caracterização morfológica da isoniazida padrão, das novas formas sólidas obtidas após a cristalização nos líquidos iônicos e nos ácidos (utilizados na síntese dos LIs), para análise comparativa.

Na Figura 26 é possível observar que as partículas da isoniazida padrão não apresentavam morfologia particular, ou seja, não foram observados tamanhos regulares de partículas, resultado observado também por Vadakkan *et al.* (2015).

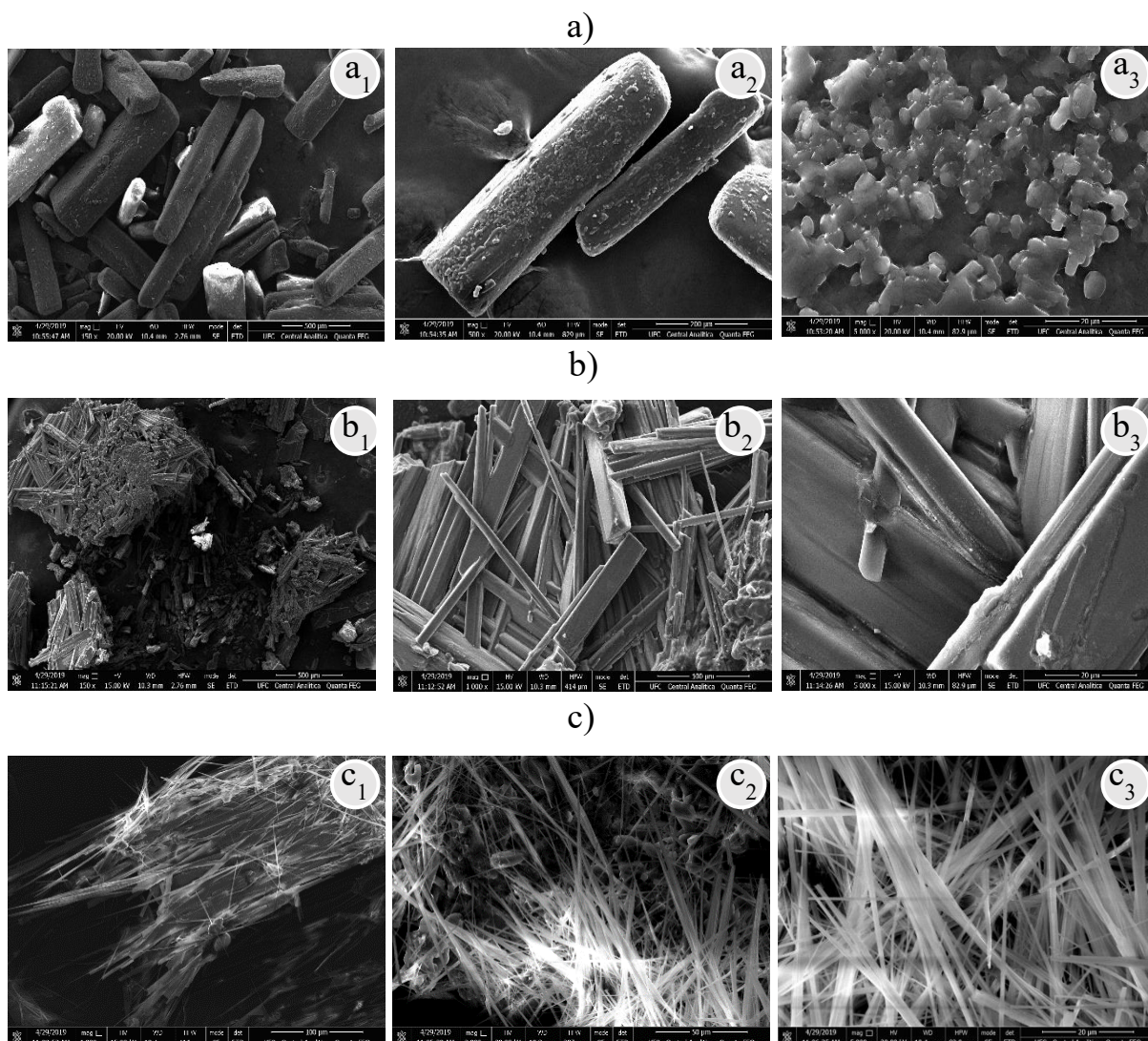
Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura da isoniazida padrão. Ampliação da imagem em: $a_1= 150x$; $a_2= 500 x$ e $a_3= 5000x$.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

A Figura 27 mostra a comparação do MEV da isoniazida cristalizada no LI [ChBis] com a isoniazida cristalizada no ácido sulfúrico.

Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura: a) isoniazida; b) INH:[ChBis] e c) INH:H₂SO₄. As ampliações nas imagens são: a₁ = 150x; a₂= 500x; a₃= 5000x; b₁=150x; b₂=1000x; b₃=5000x; c₁=1000x; c₂=2000x e c₃=5000x.

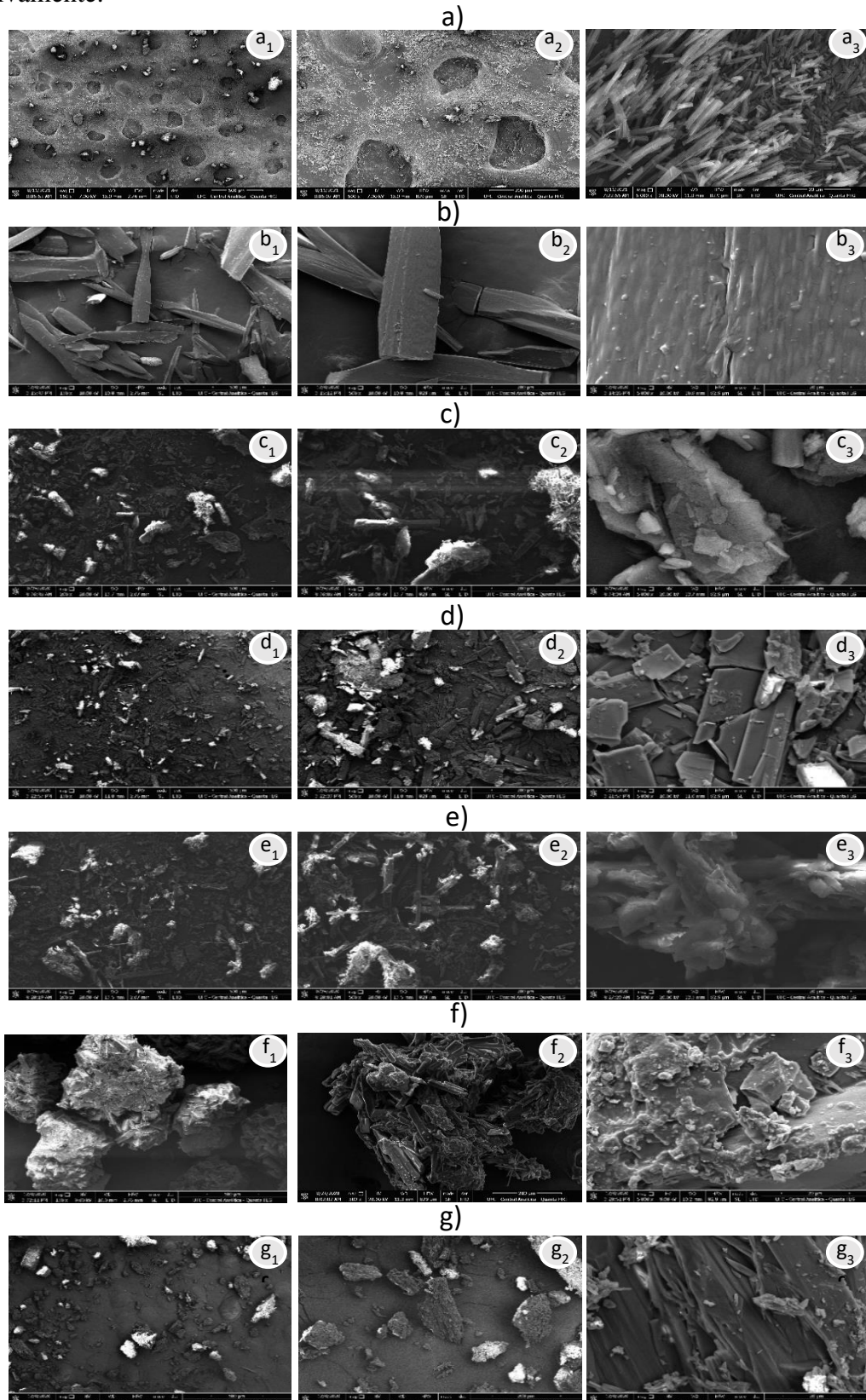


Fonte: elaborada pela autora (2021).

A nova forma de isoniazida cristalizadas em líquido iônico bissulfato de colina 50% (v/v) apresenta hábito acicular com superfície lisa (Figura 27b), já a forma INH:H₂SO₄ (Figura 27c) apresenta também hábito acicular, porém com aspecto mais translúcido, com formato de agulhas e pontiagudos. O comprimento dessas formas foi de aproximadamente 208 μm e 67 μm para a INH:[ChBis] e INH:H₂SO₄, respectivamente, com largura aproximada de 30 μm para o INH:[ChBis] e 2-3 μm INH:H₂SO₄.

Observa-se que as novas formas de isoniazida cristalizadas em líquidos iônicos obtidos a partir de hidróxido de colina e ácidos carboxílicos, como o ácido benzoico, ácido cítrico e ácido acético, apresentaram formato irregular e com maior extensão quando comparados com os ácidos dos quais os LIs são precursores (Figura 28).

Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura da a) INH:[ChOH]; b) INH:[ChBenz]; c) INH:ácido benzoico; d) INH:[ChAc]; e) INH:ácido acético; f) INH:[ChCit] e g) INH:ácido cítrico. Os subscritos 1, 2 e 3, correspondem à ampliação de $x_1=150x$; $x_2=500x$ e $x_3=5000x$, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Alguns cristais apresentavam formação de rosetas cristalinas e superfície áspera, como a forma INH:[ChCit] (Figura 28f), como também, a formação de aglomerados de partículas.

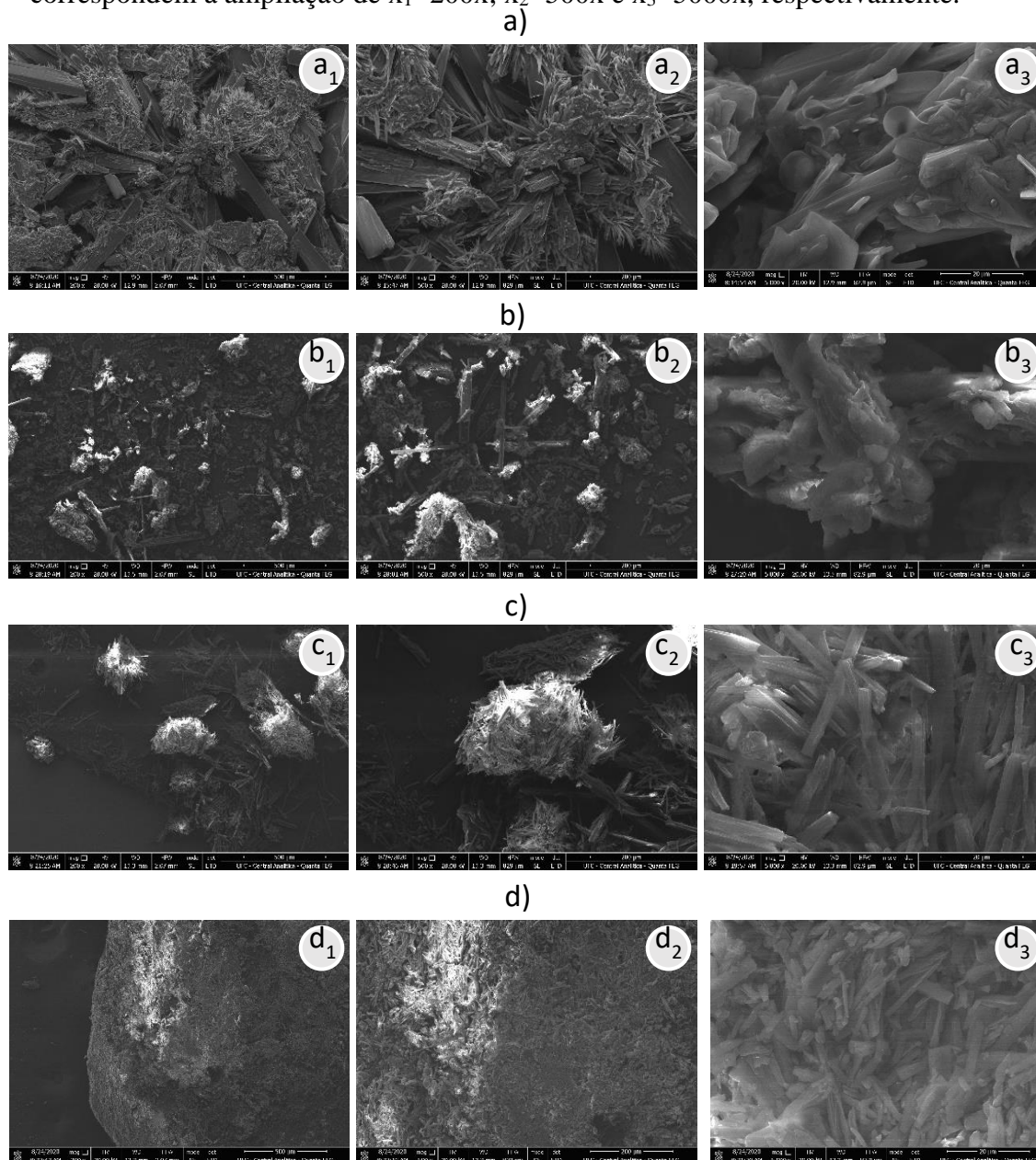
A forma INH:[ChBenz] apresentou maior tamanho de partículas entre as três formas de isoniazida cristalizadas nos LIs de colina com ácidos carboxílicos, apresentando tamanho máximo de 825 μm . A forma INH:[ChAc] exibiu tamanho máximo de partícula de 202 μm , e a forma INH:[ChCit] apresentou hábito granular com cerca de 14 μm . Enquanto, que a isoniazida cristalizada no líquido iônico [ChOH] apresentou tamanho de partículas de 4-8 μm , com aspecto de policristais.

Dando indícios de que dependendo do LI escolhido, existem diferentes formas morfológicas da isoniazida, podendo ser usados para cristalizar fármacos com baixa ou alta dissolução.

A isoniazida cristalizada nos ácidos precursores apresentaram partículas mais discretas com tamanhos médios de 9,55-157,57 μm para o ácido acético, de 19-119 μm para o ácido benzoico e a formação de grumos com cerca de 2 μm com a isoniazida cristalizada no ácido cítrico (Figuras 28c, 28e e 28g).

As formas de isoniazida cristalizadas com os líquidos iônicos 2-HEAA (INH:2-HEAA) e 2-HEAF (INH:2-HEAF), são apresentadas nas Figuras 29a e 29c, respectivamente.

Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura da a) INH:2-HEAA; b) INH:ácido acético; c) INH:2-HEAF e d) INH:ácido fórmico. Os subscritos 1, 2 e 3 nas imagens correspondem à ampliação de $x_1=200x$; $x_2=500x$ e $x_3=5000x$, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Observou-se a formação de agregados com hábito de rosetas, como também de prismas delgados, muito diferentes dos cristais sintetizados nos ácidos precursores dos líquidos iônicos (Figuras 29b e 29d). A forma INH:2-HEAA demonstrou partículas mais largas do que a forma INH:LI 2-HEAF, obtendo cerca de 38-74 μm de largura para a INH:2-HEAA, enquanto a forma INH:2-HEAF apresentou largura máxima de 5 μm , e apresentando bastões de 75-290 μm para a isoniazida cristalizada no LI 2-HEAA e de 25-57 μm para a isoniazida cristalizada no LI 2-HEAF.

A morfologia do cristal é predominantemente determinada pelas interações intermoleculares que são únicas para cada molécula e desenvolvem crescimento de planos cristalográficos com maior ou menor ordem de energia de superfícies em dada condição de crescimento (PARK; PARK; CHOI, 2014).

Com base nos resultados obtidos nesse tópico, os resultados de MEV revelam que os LIs proporcionam formas e tamanhos de cristais diferentes dos cristais de origem, podendo interferir na dissolução dos mesmos.

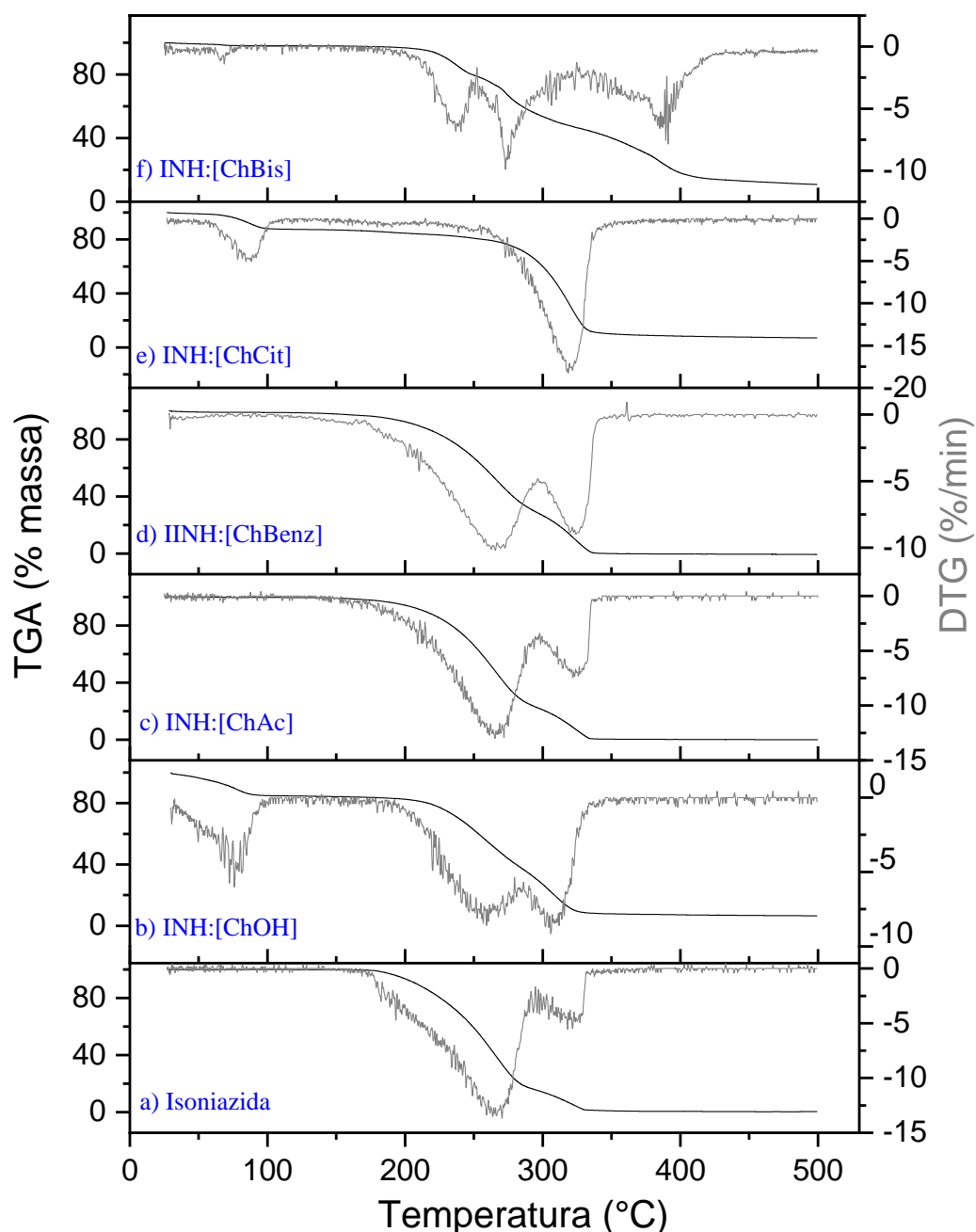
Diante das modificações observadas no hábito do cristal, fez-se uso de análises de TGA/DSC para prever o comportamento térmico após a cristalização da isoniazida nos LIs.

4.2.3 Análises termogravimétricas da isoniazida padrão e das novas formas obtidas

Com o intuito de comparar o comportamento térmico da isoniazida padrão com as novas formas sólidas cristalizadas nos líquidos iônicos, foram combinadas as técnicas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

A Figura 30 mostra as curvas de TG/DTG da isoniazida padrão e das formas cristalizadas nos LIs obtidos a partir do cátion colina.

Figura 30 – Curvas termogravimétricas (em preto) e curva termogravimetria derivada (em cinza) da a) isoniazida padrão; b) INH:[ChOH]; c) INH:[ChAc]; d) INH:[ChBenz]; e) INH:[ChCit] e f) INH:[ChBis].



Fonte: elaborada pela autora (2021).

As curvas TG/DTG da isoniazida padrão (Fig. 30a) apresentaram duas perdas de massa consecutivas cineticamente diferentes. O primeiro pico de degradação ocorreu a 270,4 °C e o segundo a 318,1 °C, com perdas de massa de 84,2% e 14,32% entre os intervalos 170-275 °C e 275-322 °C, respectivamente (Figura 30a) e $T_{\text{onset}} = 169,95$ °C.

A forma INH:[ChOH] apresentou um grande pico de degradação por volta de 75,9 °C devido à remoção de água na superfície da amostra. Nesta amostra, acontecem duas

reações que são parcialmente sobrepostas, apresentando perda de massa relativamente semelhante de 45,94% a 259,2 °C e 30,14% a 305,8 °C e $T_{\text{onset}} = 220$ °C.

Já a forma INH:[ChAc] apresentou comportamento muito semelhante à isoniazida padrão, sendo observadas duas perdas de massa consecutivas em 265,3 °C e 321,8 °C, $T_{\text{onset}} = 208$ °C. A perda de massa no primeiro pico foi 77,18% (7,02% menor, quando comparado ao primeiro pico da INH) e no segundo pico foi de 21,99% (7,67% maior que a INH) (Figura 30c).

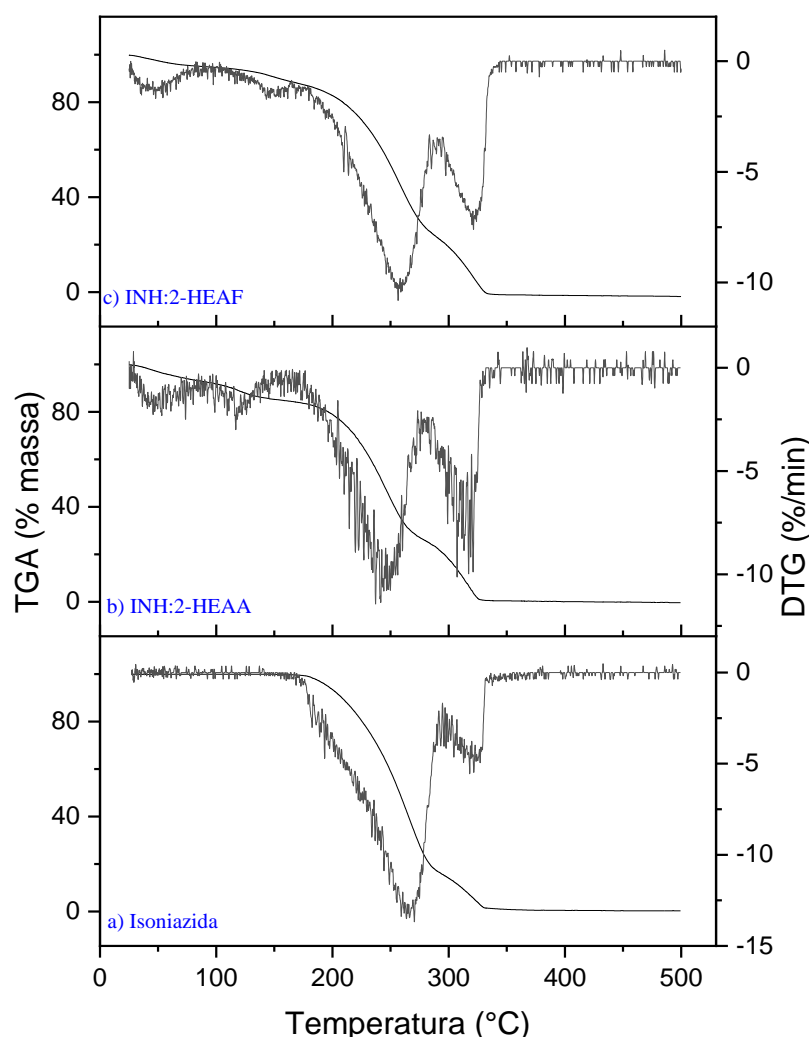
A forma INH:[ChBenz] apresentou dois picos representativos com perdas de massa de 71,21% e 27,94%, nos picos de 265,5 °C e 324,1 °C, respectivamente e $T_{\text{onset}} = 209,02$ °C (Figura 30d), com picos muito semelhantes aos apresentados na curva TG/DSC da forma INH:[ChAc] e da isoniazida padrão.

Na curva TGA/DTG da forma INH:[ChCit] foi observado o primeiro evento, correspondente a desidratação do fármaco, em 88,4 °C, o segundo evento foi em 190,5 °C, com apenas 3,61% de perda de massa, e o terceiro ocorreu em 318 °C, com perda de massa de 73,94% e $T_{\text{onset}} = 278,49$ °C.

As curvas TG/DTG da forma INH:[ChBis] (Figura 30f) evidenciam a ocorrência de interação entre a isoniazida e o líquido iônico bissulfato de colina, surgindo três perdas de massa distintas, duas consecutivas em 237 °C e 273 °C, com perda de massa de 18,4% e 32,66%, respectivamente, e o terceiro evento de degradação ocorreu a 391 °C, com perdas de massa de 33,2% e $T_{\text{onset}} = 215,43$ °C.

As curvas TGA/DTG da isoniazida e isoniazida cristalizada nos LIs a base de monoetanolamina reportados neste trabalho são apresentados na Figura 31.

Figura 31 – Curva termogravimétrica (preto) e curva termogravimétrica derivada (em cinza) da a) isoniazida padrão; b) INH:2-HEAA e c) INH:2-HEAF.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

As formas INH:2-HEAA e INH:2-HEAF apresentaram um evento endotérmico entre 25-100 °C, atribuído à perda de água superficial. Outro evento térmico foi observado em 117 °C (INH:2-HEAA) e 143,1 °C (INH:2-HEAF), podendo ser característico da ruptura de ligações de hidrogênio intramoleculares, como eliminação de água para formação de anidro, ou degradação dos LIs. De acordo com Bickac *et al.* (2005), a degradação do LI 2-HEAF ocorre a 150 °C. No espectro de FT-IR dessas formas sólidas são identificadas bandas características de grupos funcionais do LI.

Por último, apresentam-se picos correspondentes a degradação da INH:2-HEAA em 237 °C e 307,2 °C, com perda de massa de 58% e 25,6%, respectivamente (demonstrados na Figura 31b) e $T_{\text{onset}} = 203$ °C. E na forma INH:2-HEAF dois eventos também são observados, ocorrendo em 256,5 °C e 321,3 °C, o primeiro com perda de massa de 61,49% e o segundo com

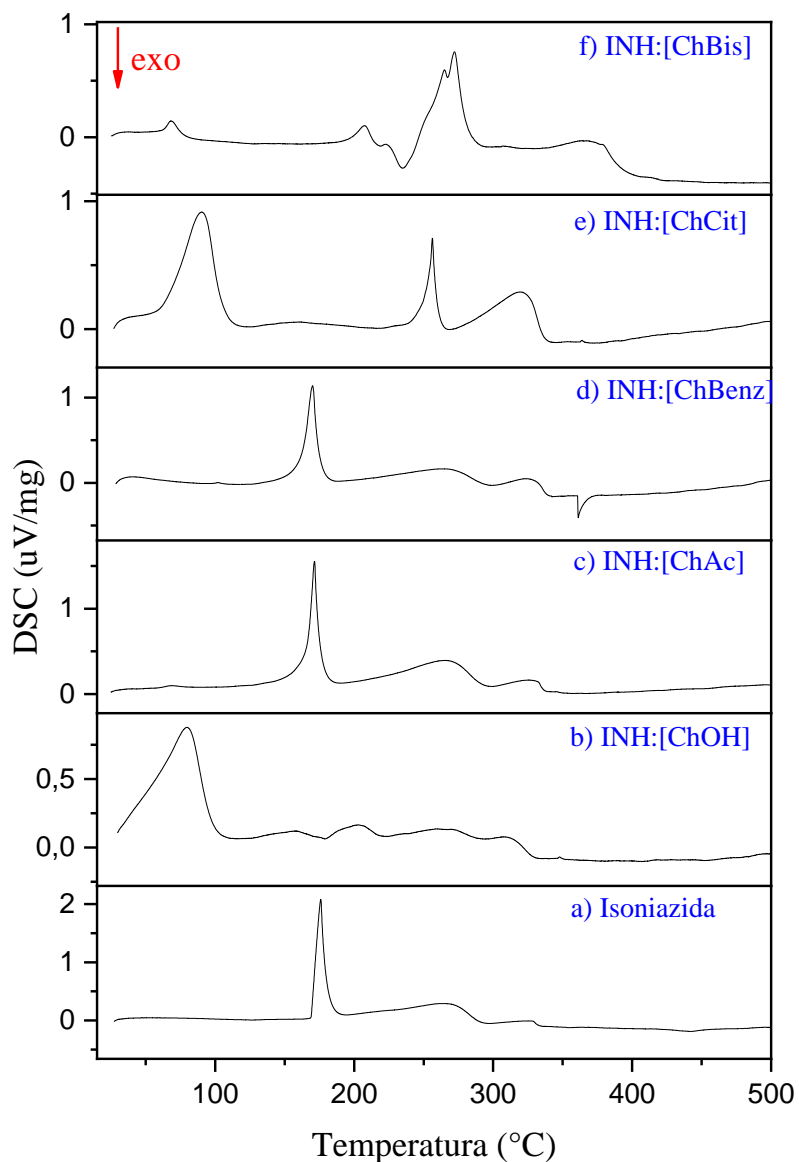
perda de massa de 25,65%, ambos atribuídos ao processo de decomposição térmica do material, como observado na Figura 31c e $T_{\text{onset}} = 203 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O comportamento do termograma apresentado na Figura 31c foi muito semelhante ao reportado na Figura 31b. Contudo, foi possível observar um deslocamento a direita nos picos, ou seja, os eventos ocorreram a maior temperatura do que os observados no termograma anterior (INH:2-HEAA), caracterizando assim uma maior estabilidade da forma INH:2-HEAF do que para INH:2-HEAA.

A maior quantidade de fração residual para as formas INH:[ChCit], INH:[ChOH] e INH:[ChBis] pode ser atribuída à dificuldade de decomposição da isoniazida cristalizada devido à condensação que ocorre durante a cristalização com os LIs utilizados.

Na Figura 32 estão apresentados os gráficos de DSC da isoniazida padrão e das formas de isoniazida cristalizadas nos LIs a base de colina.

Figura 32 – Curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a) isoniazida padrão; b) INH:[ChOH]; c) INH:[ChAc]; d) INH:[ChBenz]; e) INH:[ChCit] e f) INH:[ChBis].



Fonte: elaborada pela autora (2021).

De acordo com a análise de DSC, a isoniazida exibe um único pico de fusão endotérmico a 176 °C, o que é concordante com a literatura, como no trabalho de Diniz *et al.* (2018a). A forma INH:[ChBis] apresentou dois picos de fusão endotérmicos em 207,2 °C e 284 °C. Melo *et al.* (2016), obtiveram ponto de fusão muito semelhante para o sal de isoniazida (isoniazida com ácido sulfúrico), atingindo valores de 203-205 °C para o sulfato de isoniazida e sulfato de isoniazida hemi-hidratado. As formas INH:[ChOH], INH:[ChAc], INH:[ChBenz]

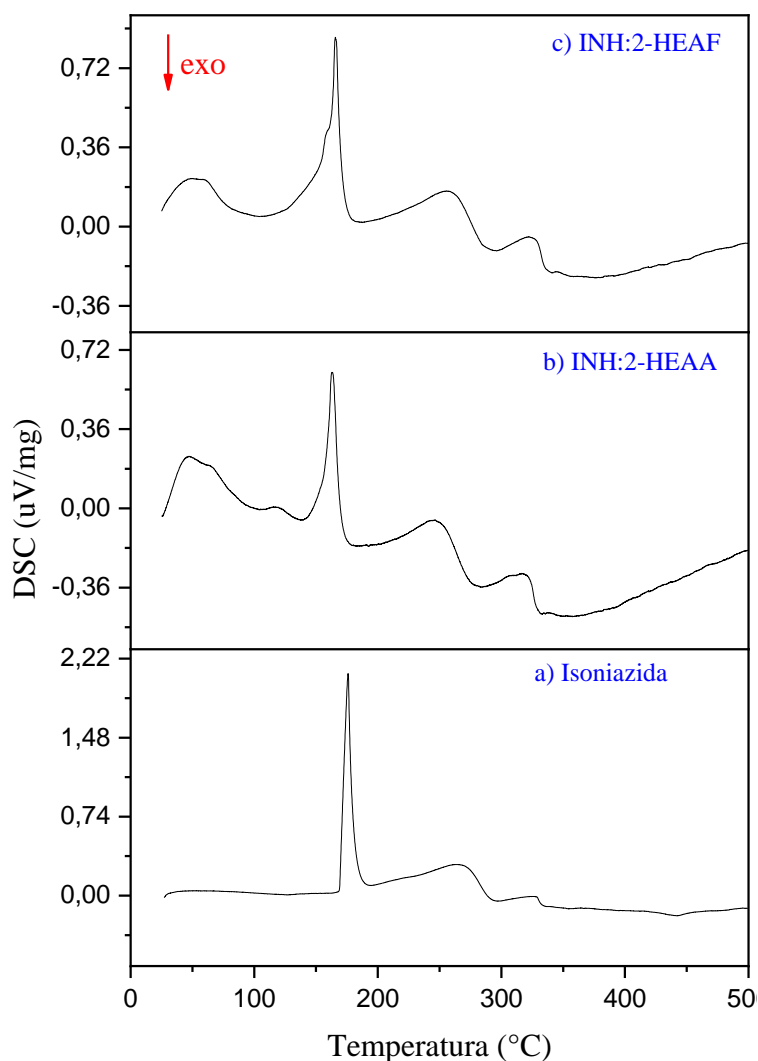
e INH:[ChCit] apresentaram picos de fusão endotérmico em 79/156/203 °C; 171,40 °C; 170,10 °C e 90/256,30/319 °C, respectivamente.

Sabe-se que em compostos ou em misturas de materiais é possível haver mais de um ponto de fusão, pois podem existir materiais que se fundem a temperaturas distintas. Na INH:[ChCit] e INH:[ChOH], a primeira endoterma (79 °C para a INH:[ChOH] e 90 °C para a INH:[ChCit]) corresponde possivelmente à fusão do LI na amostra.

O LI acetato de colina apresenta temperatura de fusão a 80 °C (LI, Z. *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012). Foi possível observar um evento endotérmico muito pequeno por volta de 69,1 °C, corroborando com o pressuposto de haver LI na superfície da isoniazida. De forma similar, a forma INH:[ChBenz] exibiu pico de fusão por volta de 50 °C, possivelmente devido à fusão do LI [ChBenz].

As curvas de DSC das formas INH:LI 2-HEAA e INH:LI 2-HEAF estão representadas na Figura 33.

Figura 33 – Curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da a) isoniazida padrão; b) INH:2-HEAA e c) INH:2-HEAF.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

A Figura 33 demonstra que as formas INH:LI 2-HEAA e INH:LI 2-HEAF apresentaram picos de fusão endotérmico em 162,80 °C e 165,60 °C, respectivamente. O LI 2-HEAA apresenta temperatura de fusão de 64,85-65,85 °C (PENTTILÄ; UUSI-KYYNY; ALOPÆUS, 2014), na amostra INH:2-HEAA foi possível observar picos nessa faixa de temperatura, pico largo por volta de 47-75 °C. A isoniazida cristalizada nos LIs 2-HEAA e 2-HEAF apresentaram diminuição na temperatura de fusão quando comparadas à isoniazida padrão.

O perfil térmico do INH:LI 2-HEAA e INH:LI 2-HEAF são distintos, com temperatura de fusão diferentes dos componentes individuais, indicando que houve modificação na estrutura da isoniazida.

Por apresentarem temperatura inicial de degradação maior que a isoniazida padrão, pode-se considerar que as formas se apresentaram mais estáveis após a cristalização nos LIs. A mudança nos pontos de fusão entre as formas sólidas pode ocorrer devido à formação de interação de ligação não covalente entre um IFA e co-formadores, alteração nos arranjos de empacotamento (como transição polimórfica, a formação de misturas sólidas eutéticas ou solução sólida) (NGILIRABANGA *et al.*, 2020).

Analisando as Figuras 30 a 33 foi possível determinar as propriedades térmicas (temperatura de fusão $T_{\text{fusão}}$ e temperatura inicial de degradação T_{onset}) da isoniazida padrão e das formas obtidas após a cristalização com os diferentes líquidos iônicos sintetizados (INH:LI), as quais foram listadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Temperatura de fusão ($T_{\text{fusão}}$) e temperatura inicial de degradação (T_{onset}) da isoniazida padrão e das formas obtidas após a cristalização com os diferentes líquidos iônicos sintetizados (INH:LI).

Amostra	$T_{\text{fusão}}$ (°C)	T_{onset} (°C)
Isoniazida padrão	176,00	169,95
INH:[ChAc]	69,1/171,40	208
INH:[ChCit]	90,6/256,30/319	278,49
INH:[ChBenz]	50/170,10	209,02
INH:[ChOH]	79,8/156,70/203,00	220,79
INH:[ChBis]	67,9/207,20/284	215,43
INH:2-HEAA	47,1/162,80	203
INH:2-HEAF	48,7/165,60	203

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Diante dos resultados obtidos nas análises térmicas, e dentro da perspectiva de que a estabilidade térmica de uma amostra cristalina pode ser entendida em termos da ruptura da sua estrutura quando exposta a um processo de aquecimento, foi definida a seguinte ordem de estabilidade térmica: INH:[ChCit] > INH:[ChOH] > INH:[ChBis] > INH:[ChBenz] > INH:[ChAc] > INH:2-HEAF > INH:2-HEAA > Isoniazida padrão.

Uma análise geral indica que a ruptura da estrutura cristalina das formas de isoniazida cristalizadas nos líquidos iônicos ocorreram em temperaturas mais elevadas quando comparadas com a isoniazida padrão.

4.2.4 Difração de raios-X por monocristal (MDRX)

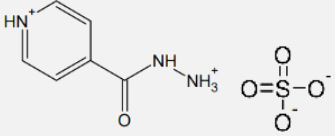
Uma vez obtidas as amostras monocristalinas, os experimentos de difração de raios-X por monocristal foram realizados com o intuito de construir um modelo tridimensional. Para as formas INH:[ChBenz], INH:[ChAc], INH:2-HEAF e INH:2-HEAA os dados exibiram estruturas já reportadas na literatura, para a isoniazida. Para as formas INH:[ChCit] e INH:[ChOH], não foi possível realizar a análise dado que os cristais formados se apresentaram como policristais, como observado também por MEV, cujas partículas apresentaram tamanho máximo de 14 μm .

Entretanto, com os dados de raios-X por monocristal foi possível confirmar o surgimento de um sal de isoniazida com o líquido iônico bissulfato de colina em que houve apenas a participação do ânion sulfato do LI, formando o sulfato de 2-(4-piridinocarbonil) hidrazina. Possivelmente a interação do ânion sulfato foi mais forte com a isoniazida do que com a colina do líquido iônico, e possivelmente o ânion sulfato dissociou do cátion (colina) e associou à isoniazida, levando à formação de sítio supramolecular com os átomos de nitrogênio da hidrazina e piridina.

Li *et al.* (2007) relataram que a água aumenta significativamente o grau de dissociação dos LIs. Os LIs formam uma rede tridimensional de ânions e cátions ligados por ligações de hidrogênio, tanto no estado sólido quanto no estado líquido, com isso, ao formar fortes ligações de hidrogênio com os ânions, a água tenderá a separar os ânions e cátions nas soluções aquosas e quebrar as estruturas agregadas dos líquidos iônicos, promovendo sua dissociação (LI, W. *et al.*, 2007).

A fim de verificar a interferência do solvente na possível dissociação do líquido iônico, realizou-se o ensaio de cristalização por evaporação do solvente da isoniazida com o líquido iônico bissulfato de colina utilizando os solventes: metanol 50% (v/v), acetonitrila (50% v/v) e etanol 99,5% (v/v). Para todos os solventes utilizados, os resultados obtidos por difração de raios X por monocristal foram iguais aos encontrados ao utilizar etanol 70% (v/v), ou seja, formação do sulfato de 2-(4-piridinocarbonil) hidrazina, com a estrutura já reportada em Melo *et al.* (2016), que formou sulfato de 2-(4-piridinocarbonil)-hidrazina utilizando ácido sulfúrico. A estrutura química desse composto está demonstrada na Tabela 11.

Tabela 11 – Estrutura química e dados obtidos por difração de raios X por monocristal para a isoniazida cristalizada no LI [ChBis] em diferentes solventes (etanol 70% v/v; etanol 99% v/v; metanol 50% v/v e acetonitrila 50% v/v).

Amostra	Nome	Refinamento	Estrutura Química
INH:[ChBis] em etanol 70% v/v		Grupo espacial: P 2 ₁ /n ^a	
INH:[ChBis] em etanol 99% v/v	Sulfato de 2-(4-piridiniocarbonil)-hidrazina	<i>a</i> 7.3259(2)Å ^a	
INH:[ChBis] em metanol 50% v/v		<i>b</i> 6.3982(2)Å ^a	
INH:[ChBis] em acetonitrila 50% v/v		<i>c</i> 19.5779(7)Å ^a	
		<i>α</i> 90° ^a	
		<i>β</i> 98.2460(10)° ^a	
		<i>γ</i> 90° ^a	

^a: obtido de Melo *et al.*, 2016.

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Fazendo um apanhado dos compostos de isoniazida já reportados no banco de estruturas cristalinas do *Cambridge Structural Database* (CSD), a pesquisa retornou mais de 30 registros. Para os ácidos precursores dos líquidos iônicos sintetizados nessa pesquisa, foram encontrados registros de cocristais de isoniazida obtidos com ácido benzoico (SARCEVICA *et al.*, 2013) e sal de isoniazida com ácido sulfúrico (MELO *et al.*, 2016).

Diante disso, tem-se forte evidência de prever se há a formação de sal ou cocrystal a partir da “regra do pKa”. Para os ácidos utilizados nessa pesquisa, pode-se observar os valores de ΔpK_a ($pK_{a\text{base}} - pK_{a(\text{ácido})}$) na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores de pKa (25 °C) e ΔpK_a calculados para a reação da isoniazida com os ácidos precursores dos líquidos iônicos.

Composto	pKa1;pKa2;pKa3	ΔpK_a
Isoniazida	3,50 ^a	-
Ácido benzoico	4,20 ^b	-0,70
Ácido cítrico	3,13 ^c	0,37
	4,76 ^c	-1,26
	6,40 ^c	3,13
Ácido sulfúrico	-3,00 ^d	6,50
Ácido fórmico	3,75 ^b	-0,25
Ácido acético	4,75 ^b	-1,25

^a: (DINIZ *et al.*, 2018a)

^b: (ZERDOUMI; BENSLIMANE, 2014)

^c: (TELLERS *et al.*, 2021)

^d: (SHIN; JEON; BAEK, 2012)

Fonte: elaborada pela autora (2021).

De acordo com a “regra do pKa”, os ácidos benzoico, fórmico, acético e cítrico (levando em consideração a segunda dissociação do ácido cítrico) exibem forte evidência a formar cocristal, tendo em vista que os valores de ΔpK_a foram menores que zero. Sarcevic *et al.* (2013) sintetizaram e caracterizam cocristal de isoniazida com ácido benzoico, constatando que a interação do ácido benzoico com a isoniazida é dada por ligações de hidrogênio com o N da piridina (O-H \cdots N). A protonação da isoniazida pode ser favorecida em diferentes locais, dependendo do pH (pKa 1,8 - nitrogênio hidrazínico, 3,5 - nitrogênio piridínico e 10,8 - grupo ácido) (DE AGUIAR *et al.*, 2015; OFOEFULE *et al.*, 2002).

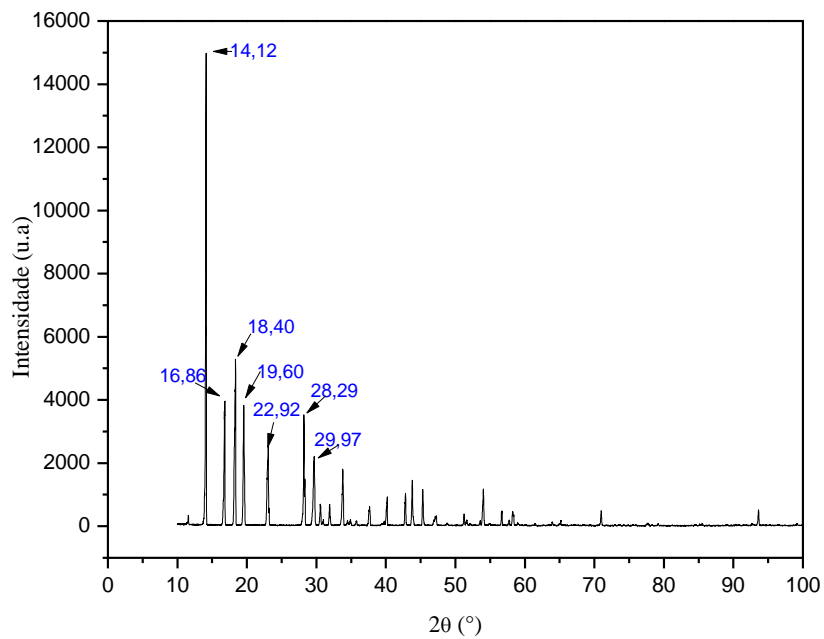
Já para o ácido sulfúrico e ácido cítrico (de acordo com a terceira dissociação do ácido cítrico), apresentam forte evidência de formar sal, tendo que os valores de ΔpK_a foram maiores que 3. Melo *et al.* (2016) sintetizaram e caracterizaram sal de isoniazida com ácido sulfúrico, o sulfato de isoniazida, como reportado também sua estrutura no CSD e discutida anteriormente no início desse tópico (Tópico 4.2.4).

4.2.5 Difração de raios X de pó (PDRX)

A ocorrência de novas interações na isoniazida promove arranjos supramoleculares diferentes na fase cristalina, o qual pode ser analisado a partir de mudanças no perfil de difração do material. Com isso, o perfil de difração das formas cristalinas de INH em LI foram comparadas com a isoniazida padrão.

Na Figura 34, a isoniazida padrão, apresenta reflexões intensas em 14,12°, 16,86°, 18,40°, 19,60°, 22,92° e 28,29°, indicando sua natureza cristalina. Padrão semelhante para esse fármaco foram descritos por Souza *et al.* (2021).

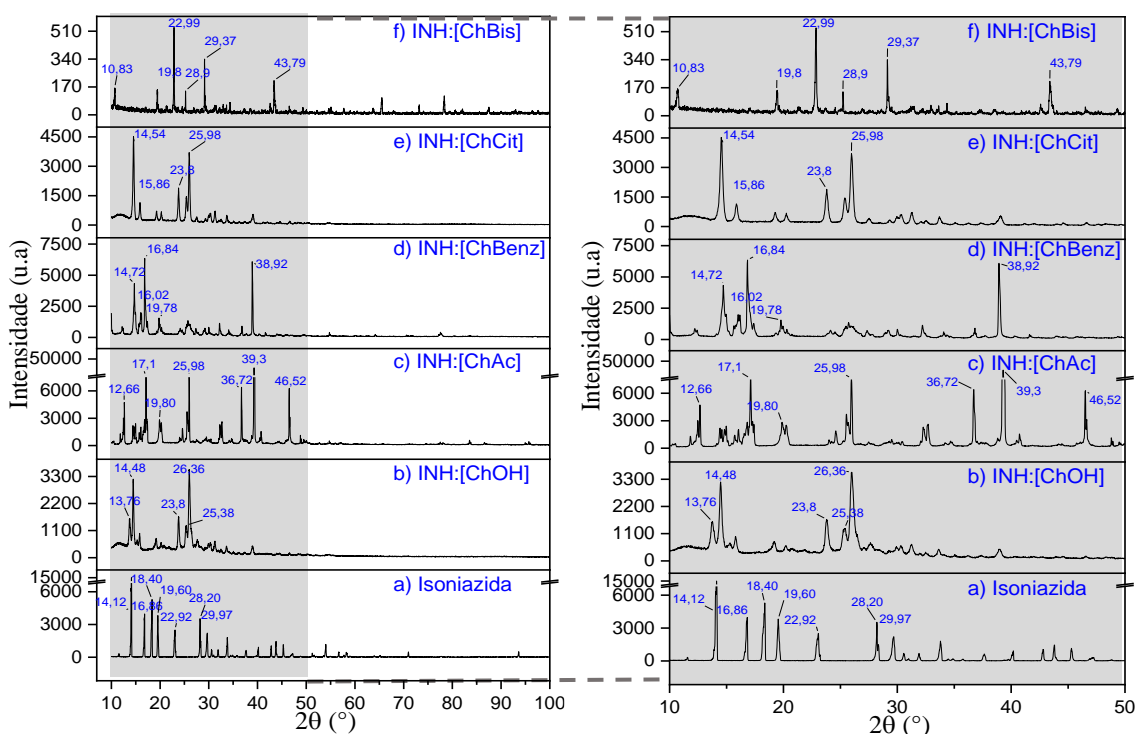
Figura 34 – Difratoograma de raios-x da isoniazida padrão.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

A Figura 35 apresenta os difratogramas de raios X em pó da isoniazida e comparado com a isoniazida cristalizada nos LIs a base de colina.

Figura 35 – Difratoograma de raios X em pó: a) isoniazida; b) INH:[ChOH], c) INH:[ChAc]; d) INH:[ChBenz]; e) INH:[ChCit] e f) INH:[ChBis]. Em cinza, ampliação na faixa de 10 a 50° dos difratogramas.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

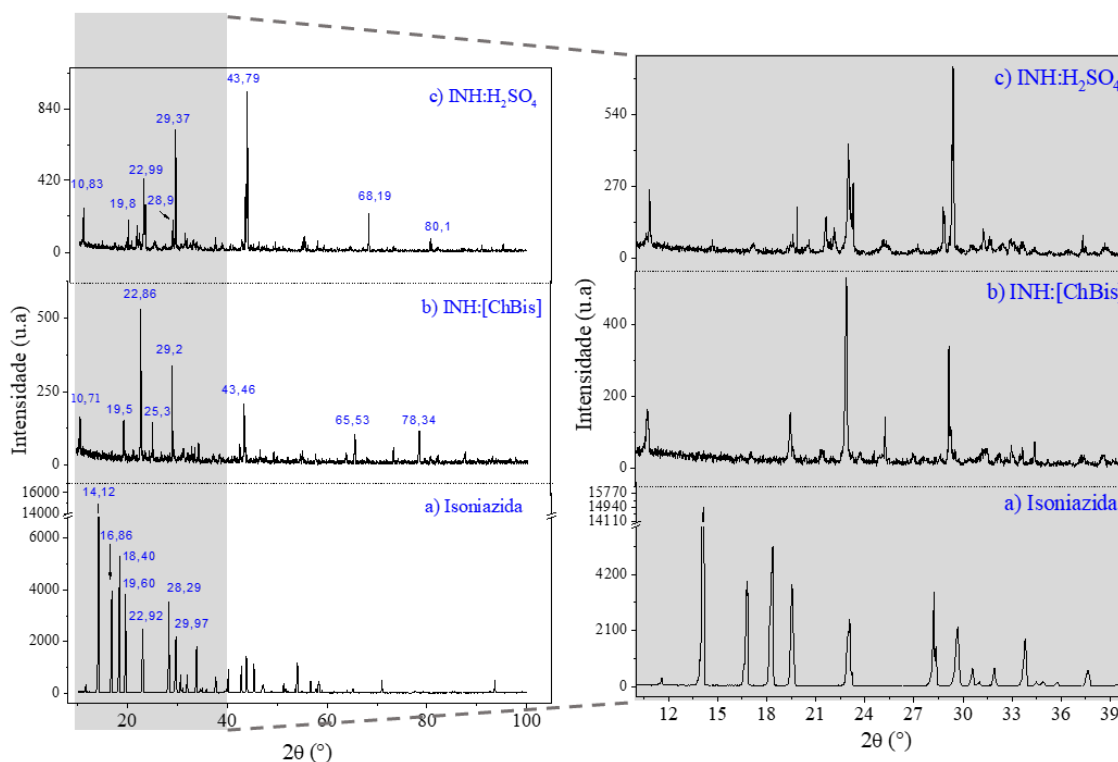
Contudo, as formas INH:LI (Figura 35) mostraram ausência de picos característicos da isoniazida, como também diminuição da intensidade, indicando a presença de porções amorfas após a incorporação do LI na matriz do cristal, o que pode refletir na estabilidade e na taxa de liberação do fármaco.

A forma INH:[ChAc] apresentou picos mais intensos que a isoniazida padrão, corroborando com a análise térmica DSC, que essa forma apresentou maior temperatura inicial de degradação que a isoniazida padrão, no entanto, essa forma também apresentou porções amorfas. Na forma INH:[ChBenz], houve diminuição na intensidade dos picos, indicando que a estrutura estava mais amorfa quando comparada com a isoniazida padrão.

As análises térmicas (TGA e DSC) demonstraram mais de uma temperatura de fusão para INH:[ChOH], INH:[ChCit] e INH:[ChBis], indicando a presença de diferentes compostos que se fundem em temperatura diferente, em base disso e analisando os padrões de DRX destas formas, tem-se que os empacotamentos cristalinos apresentaram diferentes simetrias, por sua vez, os grupos espaciais são diferentes, o que pode ter levado a formação de novos compostos.

A Figura 36 demonstra a comparação dos perfis de difração de raios X da INH com as formas INH:[ChBis] e INH:[H₂SO₄].

Figura 36 – Difratoograma de raios-X em pó da isoniazida padrão; INH:LI bissulfato de colina e INH:H₂SO₄. Em cinza, ampliação na faixa de 10 a 40°.



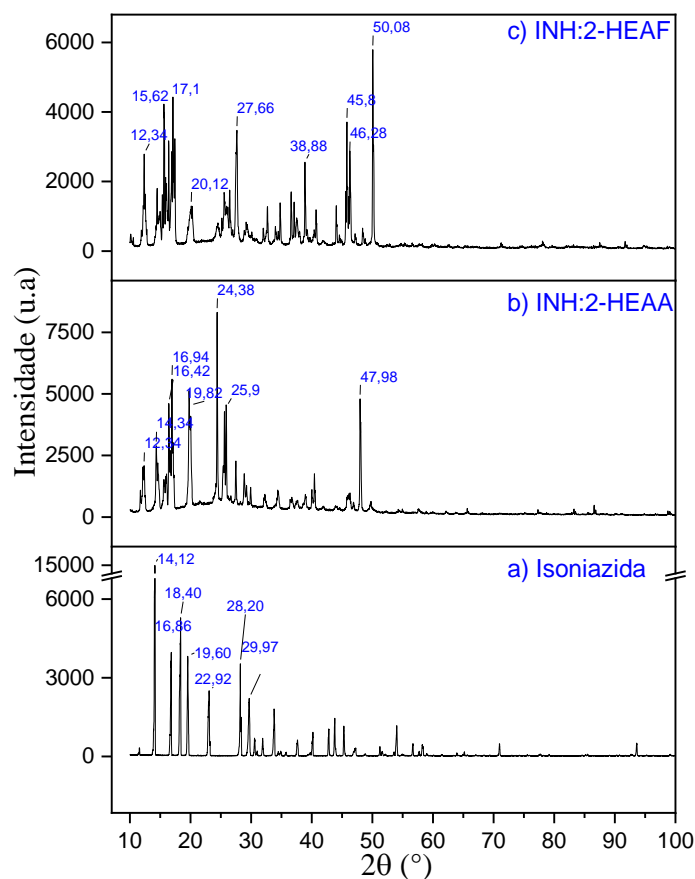
Fonte: elaborada pela autora (2021).

As formas INH:[ChBis] e INH:[H₂SO₄] exibiram um padrão de raio X cristalino muito semelhante entre si e distintos da isoniazida padrão (Figura 36). Além disso, as amostras apresentaram perfil menos cristalino que a isoniazida padrão ao observar a intensidade máxima dos picos do difratograma. O mesmo comportamento foi reportado por Pessoa *et al.* (2020), que reportaram uma diminuição na intensidade dos picos do difratograma obtidos após formação do composto de isoniazida com resveratol (PESSOA *et al.*, 2019). Foram observados ainda presença de conteúdo amorfo, ausente na isoniazida padrão.

A INH:[ChBis] exibe reflexões mais intensas em 10,71°, 19,5°, 22,86°, 25,3°, 29,2°, 43,46°, 65,53° e 78,34°, já a forma INH:H₂SO₄ exibe as mesmas reflexões, porém deslocadas para a direita do gráfico, 10,83°, 19,8°, 22,9°, 28,9°, 29,37°, 43,79°, 68,15° e 80,1°. De forma geral, os padrões cristalográficos foram semelhantes nas duas formas avaliadas, corroborando com os resultados de raios-X por monocristal que identificou a formação do sulfato de 2-(4-piridinocarbonil)-hidrazina.

Na Figura 37 são demonstrados os difratogramas de raios-X das formas INH:2-HEAA e INH:2-HEAF.

Figura 37 – Difratograma de raios-X em pó: a) isoniazida; b) INH:2-HEAA e c) INH:2-HEAF.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Observa-se que após a cristalização nos LIs 2-HEAA e 2-HEAF, essas formas apresentaram halos amorfos o que possivelmente ocasionou a diminuição na temperatura de fusão (Tópico 4.2.3).

4.2.6 Solubilidade em equilíbrio

Nesse tópico será abordado o estudo da solubilidade das formas de isoniazidas cristalizadas nos líquidos iônicos sintetizados (INH:LI) e usando um dos ácidos precursores, o

ácido sulfúrico (INH:H₂SO₄), em água deionizada a 25 °C, e então comparado com a solubilidade da isoniazida padrão nas mesmas condições.

Na Tabela 13 estão sumarizados os valores de solubilidade da isoniazida padrão e das formas obtidas.

Tabela 13 – Valores de solubilidade da isoniazida padrão e das formas INH:LI em água (25 °C).

Forma	Comprimento de onda (nm)	Solubilidade em água a 25 °C (mg/mL)
Isoniazida padrão	263	137,39 ± 2,01
INH:[ChOH]	270	9,21 ± 0,16
INH:[ChAc]	263	190,58 ± 2,32
INH:[ChBenz]	263	98,20 ± 0,95
INH:[ChCit]	267	1,22 ± 0,06
INH:[ChBis]	267	167,22 ± 3,02
INH:H ₂ SO ₄	267	242,73 ± 2,34
INH:2-HEAA	263	220,59 ± 0,63
INH:2-HEAF	263	205,30 ± 3,85

Fonte: elaborada pela autora (2021).

As formas INH:[ChAc]; INH:[ChBenz]; INH:2-HEAA e INH:2-HEAF apresentaram o mesmo comprimento de onda em água que a isoniazida padrão, fornecendo indícios que os LIs utilizados estavam na superfície do agregado influenciando na solubilidade, apresentando valores de 220,59 mg/mL; 205,30 mg/mL; 190,58 mg/mL e 98,20 mg/mL, respectivamente, quando comparados com a INH que apresentou solubilidade de 137,39 mg/mL.

A influência da solubilidade em água da isoniazida conciliada com LIs observada nesse estudo, pode abrir novas perspectivas para o estudo de equilíbrio sólido-líquido.

A elevada polaridade dos ácidos precursores dos LIs [ChAc], INH:2-HEAA e INH:2-HEAF garantiram o aumento da solubilidade da isoniazida em água, já a forma INH:[ChBenz], apresentou menor solubilidade quando comparado com a isoniazida padrão uma vez que a molécula do benzeno do LI é apolar, diminuindo assim a solubilidade do meio.

A forma INH:[ChBis] obteve solubilidade máxima em água de 167,22 mg/mL, indicando a formação de uma forma mais solúvel do que a isoniazida padrão. O mesmo foi observado para a forma INH:H₂SO₄, com solubilidade de 242,73 mg/mL. A solubilidade de um insumo farmacêutico ativo é considerada uma de suas mais importantes propriedades, por estar

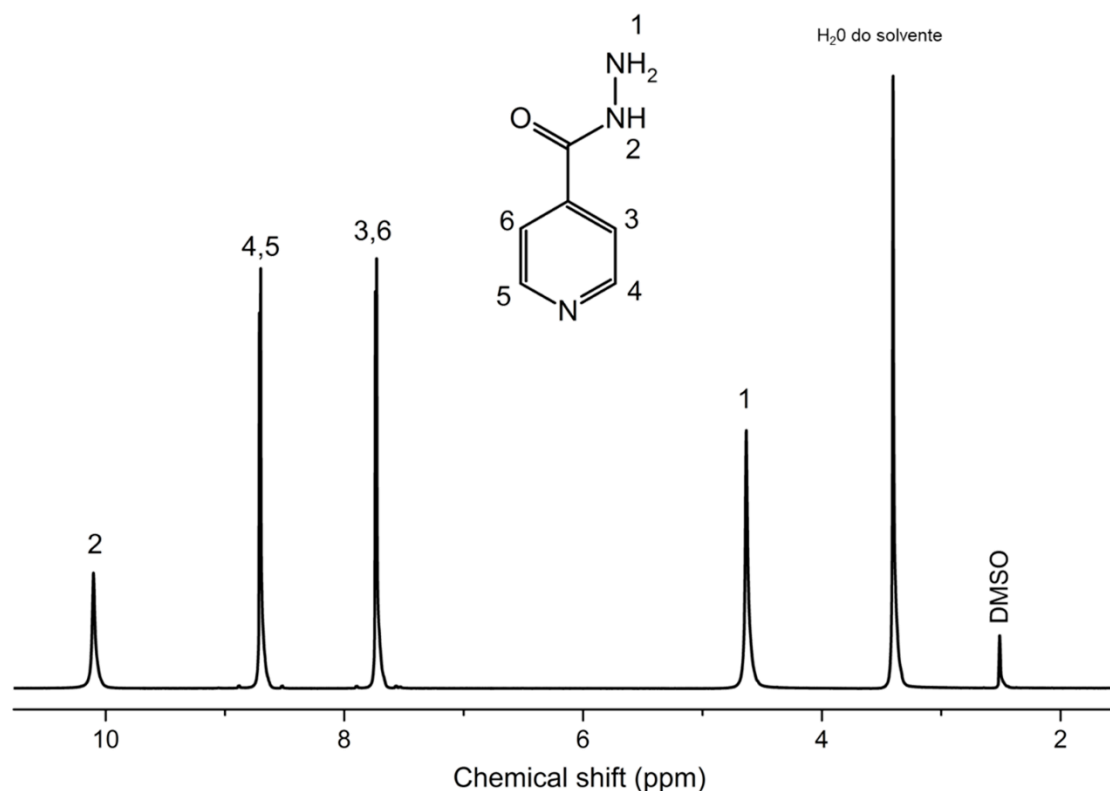
relacionada a sua absorção e conseqüentemente a eficácia terapêutica (BLAGDEN *et al.*, 2007; DINIZ, 2017). A isoniazida apresenta alta solubilidade e a mesma não foi afetada negativamente após a formação dessas novas formas.

As formas INH:[ChCit] e INH:[ChOH] apresentaram solubilidade de 1,22 mg/mL e 9,21 mg/mL, respectivamente. A baixa solubilidade dessas formas fornece indícios da formação de um polimorfo menos solúvel. De acordo com Limberger (2011) e Souza (2005), a estabilidade apresentada pelos polimorfos, faz com que o fármaco apresente um ponto de fusão mais elevado e uma solubilidade mais baixa.

4.2.7 Ressonância magnética nuclear de ^1H da isoniazida padrão e das formas INH:LIs

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram avaliados com o objetivo de investigar se houve a ocorrência de interações intermoleculares da isoniazida com os líquidos iônicos. Modificações nos valores de deslocamentos químicos no espectro de um sistema de líquido iônico com IFA em relação aos componentes separados (líquido iônico e IFA), nas mesmas condições, permite estabelecer a natureza da interação (BENDER, 2018; MAHAJAN; SHARMA; MAHAJAN, 2012).

Obteve-se primeiramente o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da isoniazida padrão, o qual se encontra na Figura 38. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 14.

Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão em $\text{DMSO-}d_6$.

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Tabela 14 – Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da isoniazida padrão.

Amostra	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
Isoniazida padrão		1' – n
		2' – n
		3' – 121,5
		4' – 140,8
		5' – 140,8
		6' – 121,5
		7' – 150,7
		8' – 164,4
		1' – 4,63
	2' – 10,10	
	3' – 7,73	
	4' – 8,70	
	5' – 8,70	
	6' – 7,73	
	7' – n	
	8' – n	

Fonte: elaborada pela autora (2021).

n: não existe.

Os dubletos 7,73 ppm e 8,70 ppm foram atribuídos aos hidrogênios 3'-6' e 4'-5', respectivamente. Em 4,63 ppm e 10,10 ppm foram observados os sinais de singletos dos hidrogênios 1' e 2', respectivamente (Figura 38). A atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H está coerente com dados já exibidos na literatura por Nunes (2018).

Na Tabela 15 são exibidos os deslocamentos químicos de ^1H do líquido iônico e da isoniazida após a cristalização. As figuras comparativas dos espectros de RMN de ^1H podem ser observadas nas Figuras B.1 a B.7 do APÊNDICE B.

Tabela 15 – Deslocamentos químicos de ^1H dos líquidos iônicos na presença de isoniazida e deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da isoniazida na presença dos líquidos iônicos. (continua)

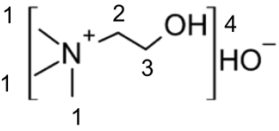
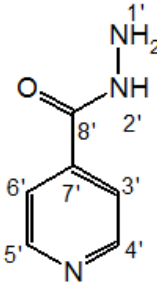
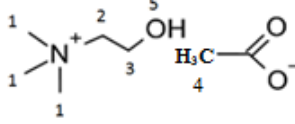
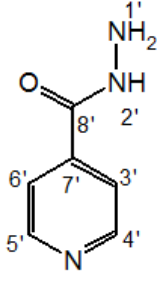
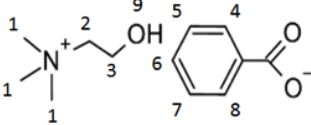
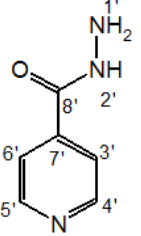
<p>LI hidróxido de colina</p>  <p>Isoniazida</p> 	<p>^1H (ppm) do LI (na presença de isoniazida)</p> <p>1 – 3,13; 3,11 2 – 3,43 3 – 3,86 4 – no</p>	<p>^1H (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – 3,52 2' – no 3' – 7,67; 7,80 4' – 8,50; 8,67; 8,71 5' – 8,50; 8,67; 8,71 6' – 7,67; 7,80 7' – ne 8' – ne</p>	<p>^{13}C (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – ne 2' – ne 3' – 123,7; 121,6; 212,9; 123,0 (li) 4' – no 5' – no 6' – 123,7; 121,6; 212,9; 123,0(li) 7' – 149,6; 150,4; 150,6; 149,0 (li); 149,1 (li); 150,7 (li) 8' – 167,6</p>
<p>LI acetato de colina</p>  <p>Isoniazida</p> 	<p>^1H (ppm) do LI (na presença de isoniazida)</p> <p>1 – 3,13 2 – 3,43 3 – 3,86 4 – 1,79 5 – no</p>	<p>^1H (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – 3,95 2' – no 3' – 7,68; 7,75; 7,80 4' – 8,51; 8,68; 8,70 5' – 8,51; 8,68; 8,70 6' – 7,68; 7,75; 7,80 7' – ne 8' – ne</p>	<p>^{13}C (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – ne 2' – ne 3' – 121,0; 121,1; 121,4; 123,2 4' – 140,3 5' – 140,3 6' – 121,0; 121,1; 121,4; 123,2 7' – 149,1; 149,9; 150,1; 150,2 8' – 163,7</p>
<p>LI benzoato de colina</p>  <p>Isoniazida</p> 	<p>^1H (ppm) do LI (na presença de isoniazida)</p> <p>1 – 3,14 2 – 3,45 3 – 3,86 4 – 7,88 5 – 7,34 6 – 7,35 7 – 7,34 8 – 7,88</p>	<p>^1H (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – 3,96 2' – no 3' – 7,76 4' – 8,70 5' – 8,70 6' – 7,76 7' – ne 8' – ne</p>	<p>^{13}C (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – ne 2' – ne 3' – 121,5 4' – 140,8 5' – 140,8 6' – 121,5 7' – 150,6 8' – 164,1</p>

Tabela 15 – Deslocamentos químicos de ^1H dos líquidos iônicos na presença de isoniazida e deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da isoniazida na presença dos líquidos iônicos. (continua)

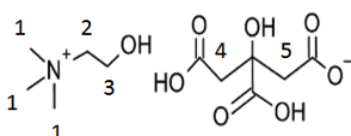
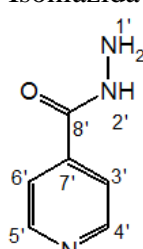
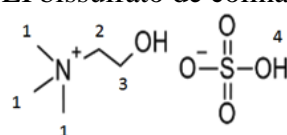
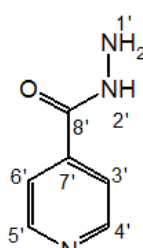
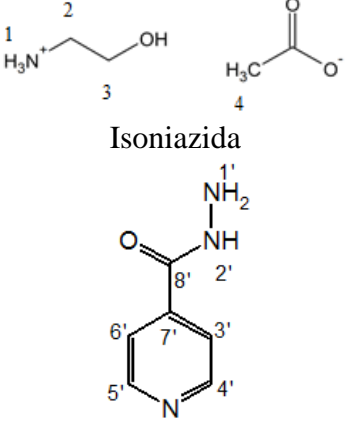
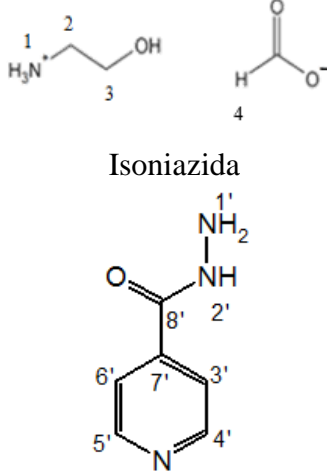
<p>LI citrato de colina</p>  <p>Isoniazida</p> 	<p>^1H (ppm) do LI (na presença de isoniazida)</p> <p>1 – 3,11 2 – 3,40 3 – 3,84 4 – 2,56 5 – 2,56</p>	<p>^1H (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – 3,47 2' – no 3' – 7,82; 7,73 (li) 4' – 8,80; 8,70 (li) 5' – 8,80; 8,70 (li) 6' – 7,82; 7,73 (li) 7' – ne 8' – ne</p>	<p>^{13}C (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – ne 2' – ne 3' – 121,8; 121,5 (li) 4' – 139,9 (li) 5' – 139,9 (li) 6' – 121,8; 121,5 (li) 7' – 151,0; 150,6 (li) 8' – 164,8; 171,8; 177,2</p>
<p>LI bissulfato de colina</p>  <p>Isoniazida</p> 	<p>^1H (ppm) do LI (na presença de isoniazida)</p> <p>1 – 3,12 2 – 3,42 3 – 3,84 4 – no</p>	<p>^1H (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – 4,41 2' – no 3' – 7,83; 7,72 (li); 7,80 (li) 4' – 8,80; 8,76 (li); 8,70 (li) 5' – 8,80; 8,76 (li); 8,70 (li) 6' – 7,83; 7,72 (li); 7,80 (li) 7' – ne 8' – ne</p>	<p>^{13}C (ppm) da isoniazida (na presença do LI)</p> <p>1' – ne 2' – ne 3' – 121,8; 121,5 (li); 123,2 (li) 4' – 139,9 5' – 139,9 6' – 121,8; 121,5 (li); 123,2 (li) 7' – 151,0; 150,6 (li) 8' – 164,8</p>

Tabela 15 – Deslocamentos químicos de ^1H dos líquidos iônicos na presença de isoniazida e deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da isoniazida na presença dos líquidos iônicos. (conclusão)

<p>LI 2-HEAA</p> 	^1H (ppm) do LI (na presença de isoniazida)	^1H (ppm) da isoniazida (na presença do LI)	^{13}C (ppm) da isoniazida (na presença do LI)
<p>LI 2-HEAF</p> 	^1H (ppm) do LI (na presença de isoniazida) 1 - no 2 - 2,87 3 - 3,54; 3,59 4 - 1,81	^1H (ppm) da isoniazida (na presença do LI) 1' - 4,76 2' - 10,11 3' - 7,73; 7,71 (li) 7,77 (li) 4' - 8,70; 8,54 (li); 8,80 (li) 5' - 8,70; 8,54 (li); 8,80 (li) 6' - 7,73; 7,71 (li) 7,77 (li) 7' - ne 8' - ne	^{13}C (ppm) da isoniazida (na presença do LI) 1' - ne 2' - ne 3' - 120,9 4' - 140,2 5' - 140,2 6' - 120,9 7' - 150,1 8' - 163,8

Fonte: elaborada pela autora (2021).

no: não observado;

ne: não existe;

li: baixa intensidade.

A partir da variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da isoniazida padrão em relação a isoniazida cristalizada em LI (dados que foram sumarizados na Tabela 15), pode-se inferir que houve variação nas características espectrais da isoniazida, devido à redistribuição da densidade eletrônica, sugerindo que as moléculas de isoniazida se encontram em ambiente químico diferente, essas variações foram mostradas na Tabela 16.

Os resultados demonstrados na Tabela 16 mostram a variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da isoniazida e dos líquidos iônicos após a cristalização com líquido iônico. O $\Delta\delta_{INH}^1H$ (ppm) foi avaliado $\Delta\delta_{INH} = \delta_{INH} - \delta_{INHemINH:LI}$ e o $\Delta\delta_{LI}^1H$ (ppm) por $\Delta\delta_{LI} = \delta_{LI} - \delta_{LIemINH:LI}$.

Tabela 16 – Diferença do deslocamento químico de hidrogênio da isoniazida ($\Delta\delta_{INH}$) e diferença do deslocamento químico de hidrogênio do LI ($\Delta\delta_{LI}$). (continua)

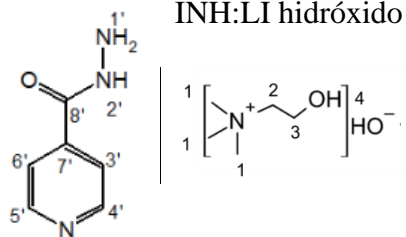
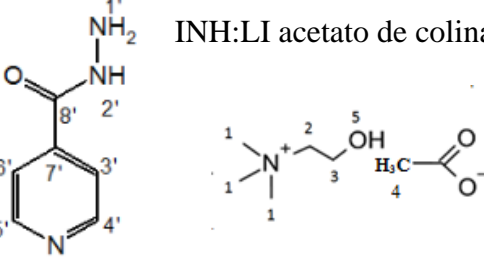
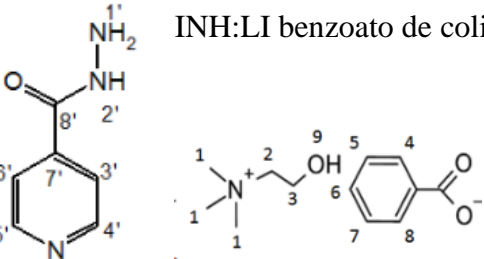
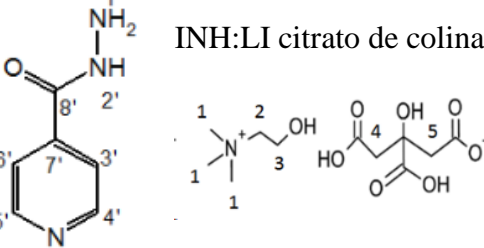
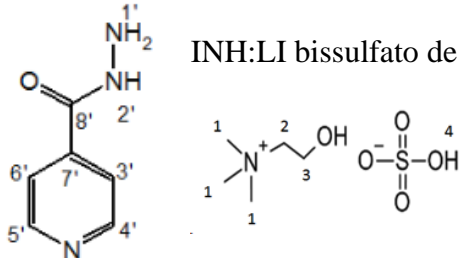
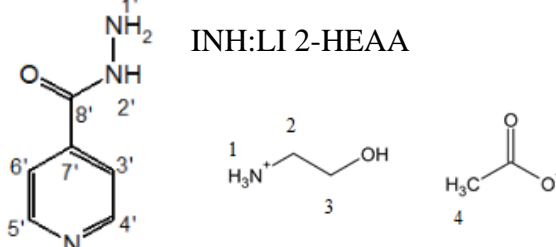
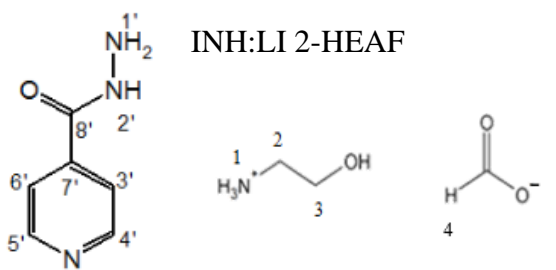
 <p>INH:LI hidróxido de colina</p>	$\Delta\delta_{INH}^1H$ (ppm) 1' – 1,11 2' – no 3' – 0,06 4' – 0,20 5' – 0,20 6' – 0,06	$\Delta\delta_{LI}^1H$ (ppm) 1 – sv 2 – 0,26 3 – 0,07
 <p>INH:LI acetato de colina</p>	$\Delta\delta_{INH}^1H$ (ppm) 1' – 0,68 2' – no 3' – 0,05 4' – 0,19 5' – 0,19 6' – 0,05	$\Delta\delta_{LI}^1H$ (ppm) 1 – 0,01 2 – 0,01 3 – 0,02 4 – 0,04 5 – no
 <p>INH:LI benzoato de colina</p>	$\Delta\delta_{INH}^1H$ (ppm) 1' – 0,67 2' – no 3' – 0,03 4' – sv 5' – sv 6' – 0,03	$\Delta\delta_{LI}^1H$ (ppm) 1 – sv 2 – sv 3 – 0,01 4 – 0,05 5 – 0,06 6 – 0,11 7 – 0,06 8 – 0,05
 <p>INH:LI citrato de colina</p>	$\Delta\delta_{INH}^1H$ (ppm) 1' – 1,16 2' – no 3' – 0,09 4' – 0,10 5' – 0,10 6' – 0,09	$\Delta\delta_{LI}^1H$ (ppm) 1 – sv 2 – 0,16 3 – sv 4 – 0,04 5 – 0,04

Tabela 16 – Diferença do deslocamento químico de hidrogênio da isoniazida ($\Delta\delta_{INH}$) e diferença do deslocamento químico de hidrogênio do LI ($\Delta\delta_{LI}$). (conclusão)

 <p>INH:LI bissulfato de colina</p>	$\Delta\delta_{INH} \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) 1' – 0,22 2' – no 3' – 0,10 4' – 0,10 5' – 0,10 6' – 0,10	$\Delta\delta_{LI} \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) 1 – 0,01 2 – 0,02 3 – 0,02 4 – 4,71
 <p>INH:LI 2-HEAA</p>	$\Delta\delta_{INH} \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) 1' – 0,13 2' – 0,01 3' – sv 4' – sv 5' – sv 6' – sv	$\Delta\delta_{LI} \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) 1 – no 2 – 0,12 3 – 0,03 – 3,59 4 – 0,11
 <p>INH:LI 2-HEAF</p>	$\Delta\delta_{INH} \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) 1' – 1,23 2' – no 3' – 0,06 4' – 0,01 5' – 0,01 6' – 0,06	$\Delta\delta_{LI} \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) 1 – no 2 – 0,01 3 – 0,02 4 – 0,04

Fonte: elaborada pela autora (2021).

sv: não existe diferença de deslocamento químico.

no: deslocamento químico não observado no sistema.

Foi observado que as maiores variações nos deslocamentos químicos foram nos hidrogênios 1' e 2' da hidrazina da isoniazida para todos os sistemas avaliados. Sabe-se que o grupo hidrazina da isoniazida é excelente aceitador quando está envolvido em ligações de hidrogênio, mas também pode atuar como doador em ligações de hidrogênio, proporcionando a formação de homosíntons envolvendo os nitrogênios da hidrazina (DINIZ, 2017).

Ao avaliar a variação nos deslocamentos químicos de hidrogênio dos LIs, observa-se particularidades para cada LI.

A isoniazida, após a cristalização no LI [ChOH] e [ChCit] apresentou variação no deslocamento químico do hidrogênio do NH_2 em 4,63 ppm (1' na isoniazida), para 3,52 ppm (INH:[ChOH]) e 3,11 ppm (INH:[ChCit]), como também não foi observado nessas duas formas o hidrogênio do NH localizado em 10,10 ppm (2' na isoniazida). Nos LIs utilizados, [ChOH] [ChCit], a maior variação no deslocamento químico ocorreu no grupo (CH_2) (hidrogênio 2 no

LI) da colina. De forma sucinta, a presença de isoniazida afeta o ambiente químico do hidrogênio 2, do grupo metilênico do cátion dos LIs [ChOH] e [ChCit], o efeito de desblindagem desse hidrogênio pode resultar de interações de hidrogênio com a isoniazida. Corroborando com as análises de solubilidade e térmicas que evidenciaram características diferentes nas formas cristalinas.

Para as formas INH:[ChBenz] e INH:[ChAc], o hidrogênio do grupo NH₂ (hidrogênio 1') foi deslocado para região de baixa frequência. E o sinal do hidrogênio NH (2') em 10,10 ppm da INH:[ChBenz]), apareceu numa região de maior frequência e com baixa intensidade após a cristalização em 10,35 ppm (INH:[ChBenz]); na forma INH:[ChAc] o sinal desse hidrogênio não foi observado. O nitrogênio pode estabelecer ligações de hidrogênio intermoleculares, diminuindo a densidade eletrônica ao redor do hidrogênio ligado, deslocando assim para frequências mais altas (NUNES, 2018). Estas interações, possivelmente fracas, como Van der Waals entre o LI e a INH, nas formas INH:[ChAc] e INH:[ChBenz] modificaram a estabilidade térmica, como demonstrado nas análises de TGA e DSC e influenciaram na solubilidade do fármaco (isoniazida).

Foi possível observar uma mudança química dos hidrogênios aromáticos da isoniazida (7,73 ppm e 8,70 ppm), como também no grupo amida (Tabela 16) da INH:[ChBis]. Os locais básicos do INH foram protonados pois o ácido sulfúrico é um ácido diprótico capaz de doar um próton para amida (NH₃⁺) e outro para a piridina (NH⁺). Diante disso, os resultados de RMN de ¹H do INH:[ChBis] corroboram com as análises de FT-IR, raio-X de monocristal, identificando a ocorrência de interação da isoniazida com o sulfato, formando o sal de isoniazida, sulfato de 2-(4-piridinocarbonil)-hidrazina.

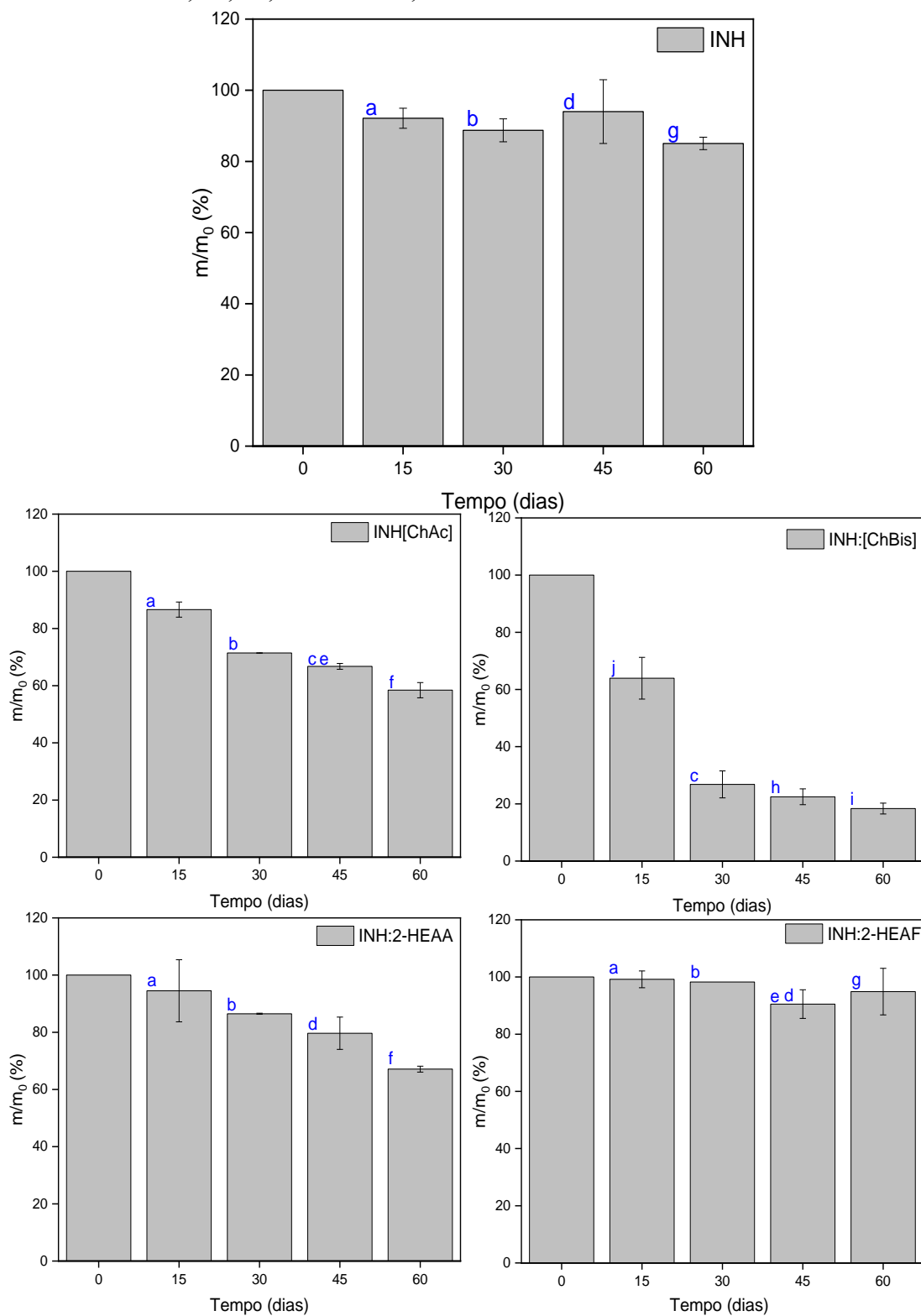
Na protonação da isoniazida com ácidos relatada por Santos *et al.* (2020), observou-se um claro deslocamento químico dos prótons aromáticos da isoniazida padrão (7,73 ppm e 8,70 ppm) e variação significativa no sinal do NH (2') após a interação da isoniazida com os ácidos clorídrico, metassilícico, ácido glicólico, canforsulfônico e vanílico.

Para as novas formas de isoniazida cristalizadas nos LIs a partir de monoetanolamina (2-HEAA e 2-HEAF), a maior variação nos deslocamentos químicos dos LIs foram nos hidrogênios do cátion, e na isoniazida, a maior variação ocorreu nos sinais do hidrogênio dos grupos NH₂ (1') e NH (2').

4.2.8 Estabilidade em atmosfera acelerada da isoniazida padrão e das formas INH:LIs

A análise de estabilidade em atmosfera acelerada da INH e das formas cristalizadas em LI descritas neste trabalho foi realizada com o intuito de analisar a estabilidade da isoniazida após a cristalização. A Figura 39 mostra esse estudo nos períodos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

Figura 39 – Estudo da estabilidade em atmosfera acelerada (40 °C e 75 % de umidade) nos intervalos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias, da isoniazida e INH:IL.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Os índices a, b, c, d, e, f, g, h, i e x em azul na figura indicam a significância estatística a partir do método ANOVA, utilizando o teste de Tukey. A diferença entre a média dos experimentos (com mesma letra em azul) não é significativa ao nível de 0,05.

A partir da cinética de absorção de umidade, ficou claro que nem a INH e nem as formas cristalizadas em LIs, INH:[ChBis], INH:[ChAC] tiveram tendências higroscópicas, observada a partir do balaço de massa, em que não foi demonstrada variação após 60 dias de experimento. Já as formas INH:[ChOH], INH:[ChBenz], INH:[ChCit], INH:2-HEAA e INH:2-HEAF, apresentaram umidade de 15,78% m/m, 10% m/m, 39% m/m, 3,24% m/m e 3,94% m/m, respectivamente.

É relatado na literatura que a isoniazida apresenta boa estabilidade, mesmo quando exposta à ambiente que apresente elevada umidade e temperatura. Nos experimentos de análise de estabilidade em atmosfera acelerada, observou-se que a isoniazida padrão apresentou degradação de apenas $14,93 \pm 1,76\%$ (m/m). A maior degradação ocorreu na forma INH:[ChBis] ($81,63 \pm 1,90\%$ m/m), sendo observado nos cromatogramas da forma INH:[ChBis] a redução do pico de 1,7 minutos e aumento do produto de degradação de 1,4 minutos no decorrer dos 60 dias de experimento.

Na forma INH:[ChAc] foi observado o aparecimento de um pico por volta de 1,4 minutos no decorrer dos dias de análise, como também a redução do pico de 1,64 minutos, apresentando no sexagésimo dia de ensaio, degradação de $41,57 \pm 2,66\%$ (m/m). O mesmo comportamento foi observado para a forma INH:2-HEAA, que utiliza o mesmo ânion acetato do LI, em que houve redução na área do pico de 1,63 minutos e o surgimento de um pico em 1,42 minutos, com degradação de $32,88 \pm 1,03\%$ (m/m). De acordo com a análise estatística ANOVA, pelo teste de Tukey, as amostras INH:2-HEAA e INH:[ChAc] indicaram, com nível de significância de 0,05, que não há diferença significativa entre os ensaios.

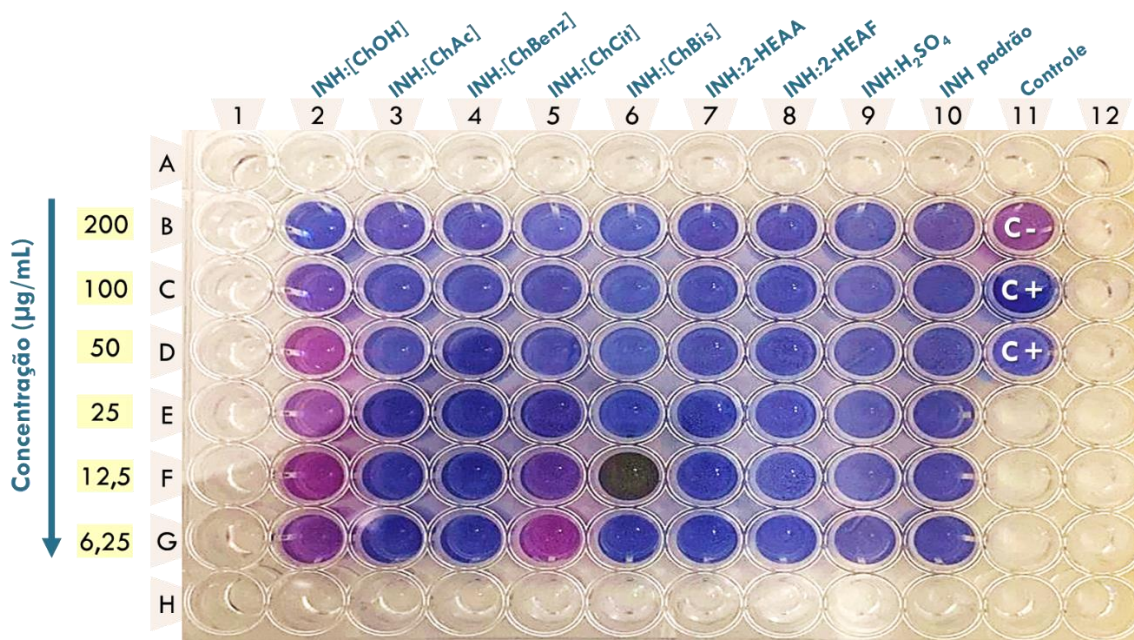
Ainda de acordo com a relação das médias pelo teste de Tukey, a INH:2-HEAF apresentou o mesmo perfil de degradação da isoniazida.

As formas cristalinas INH:[ChOH], INH:[ChCit] e INH:[ChBenz] apresentaram inconsistência nos resultados devido sua baixa solubilidade em água, não sendo possível analisar sua estabilidade por essa técnica. Contudo, a partir dos cromatogramas, não foi possível observar a presença de picos em outros tempos de retenção no decorrer do ensaio, caracterizando apenas por sólidos higroscópicos, como abordado no início desse tópico.

4.2.9 Atividade antimicrobacteriana das formas INH:LI, INH:H₂SO₄ e INH sobre os isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*

A partir do ensaio de atividade antimicrobacteriana das formas de isoniazida cristalizada em LIs sobre os isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, tem-se que as formas INH:LI, INH:H₂SO₄ e INH foram capazes de inibir o crescimento, indicando eficiência terapêutica. A Figura 40 apresenta a demonstração geral do ensaio para a determinação da MIC sobre os isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 40 – Microplaca do ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) das formas INH:LI, INH:H₂SO₄ e INH sobre os isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

O poço 2D referente a forma INH:[ChOH] e o poço 5G a forma INH:[ChCit] ganharam coloração rosa, devido a reação de redução da resazurina para resorufina, o que indica crescimento micobacteriano nesses poços. Então a MIC é de 100 µg/mL para a forma INH:[ChOH] e 12,5 µg/mL para a forma INH:[ChOH].

Serão necessárias mais diluições para encontrar a MIC das formas INH:[ChAC], INH:[ChBenz], INH:[ChCit], INH:[ChBis], INH:2-HEAA e INH:2-HEAF e INH padrão. Contudo, foi possível constatar que essas formas são capazes de inibir o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* nas concentrações analisadas.

5 CONCLUSÃO

Como resultado deste trabalho, foram confirmadas as sínteses de sete líquidos iônicos, o hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChOH], bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChBis], acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChAc], citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChCit], benzoato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChBenz], acetato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAA) e formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF) por RMN de ^1H e ^{13}C , FT-IR e propriedades como densidade, viscosidade em diferentes temperaturas foram sumarizadas, servindo de referencial teórico para futuras aplicações.

Os ensaios de toxicidade revelaram que os LIs 2-HEAA, 2-HEAF e [ChOH] não apresentaram toxicidade frente a *Artemia salina*. Nas análises de microscopia óptica e MEV dos microcrustáceos expostos às concentrações de LIs que apresentaram baixa toxicidade, [ChAc], [ChBis] e [ChCit], observou-se presença de material denso, o LI, agregado ao intestino dos náuplios.

Os LIs foram então utilizados na cristalização de isoniazida pelo método de evaporação do solvente, obtendo sete novas formas cristalinas da mesma.

As análises térmicas das novas formas sólidas de isoniazida cristalizadas em líquidos iônicos demonstraram a seguinte ordem de estabilidade térmica em relação à ruptura da estrutura cristalina: INH:[ChCit] > INH:[ChOH] > INH:[ChBis] > INH:[ChBenz] > INH:[ChAc] > INH:2-HEAF > INH:2-HEAA > Isoniazida padrão.

Em condições aceleradas de temperatura e umidade, as formas INH:[ChAc], INH:2-HEAA e INH:[ChBis] levaram à formação de compostos de degradação. Entretanto, a forma INH:2-HEAF apresentou o mesmo perfil de degradação da INH padrão, com degradação de 5,13 % m/m após 60 dias de ensaio.

No processo de cristalização da isoniazida usando [ChBis] houve a formação de um novo composto, o sulfato de 2-(4-piridiníocarbonil)-hidrazina, ocasionado possivelmente pela dissociação do ânion sulfato, demonstrando maior interação sulfato \cdots INH, que sulfato \cdots colina. A solubilidade dessa nova forma em água a 25 °C foi melhorada, apresentando solubilidade máxima de 156,90 mg/mL, enquanto a isoniazida padrão apresentou 137,39 mg/mL nas mesmas condições.

Os ensaios de solubilidade em água a 25 °C revelaram uma menor solubilidade para as formas INH:[ChCit], INH:[ChOH] e INH:[ChBenz], quando comparados com a isoniazida. No entanto, as demais formas cristalinas apresentaram uma maior solubilidade, de até 220 mg/mL para INH:2-HEAF.

Os resultados gerados inerentes as técnicas utilizadas nessa pesquisa levantam a hipótese da formação de polimorfos ou até mesmo aceleração da degradação com a isoniazida cristalizada nos LIs [ChCit] e [ChOH], porém, torna-se necessário a utilização de um conjunto de técnicas para assegurar isso como, por exemplo, formação de monocristal que possibilite a identificação por DRXM.

O ensaio de atividade antimicobacteriana demonstrou que todas as formas sintetizadas apresentam eficiência terapêutica contra o desenvolvimento do *Mycobacterium tuberculosis*. Foi possível encontrar a MIC das formas INH:[ChOH] e INH:[ChCit], porém para as formas INH:[ChBis], INH:[ChBenz], INH:[ChAc], INH:2-HEAF, INH:2-HEAA, INH:H₂SO₄ e isoniazida padrão seriam necessárias mais diluições das concentrações para estabelecer a MIC.

Este trabalho surge como inovador na síntese de líquidos iônicos de baixa toxicidade e o estudo do comportamento da cristalização da isoniazida nos mesmos, constatando-se que a geometria molecular dos diferentes LIs tem distintiva influência na determinação do hábito do cristal, solubilidade e estabilidade.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, Mohammad; PAZUKI, Gholamreza; RAISI, Ahmadreza; BAGHBANBASHI, Mojhdh Thermophysical and rheological properties of sorbitol + ([mmim](MeO)₂PO₂) ionic liquid solutions: solubility, density and viscosity. **Food Chemistry**, v. 320, p. 126566, 2020.
- Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares**, 2018.
- Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Fluxo de análise de qualificação de impurezas e produtos de degradação de medicamentos classificados como sintéticos e semissintéticos**. Brasília, 1^a edição, 2019.
- Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Insumos Farmacêuticos Ativos**. Brasília, 2018.
- Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Nota Técnica 02/2017**, p. 1–10, 2017.
- AGHAEI, Amir; SOBATI, Mohammad Amin. Extraction of sulfur compounds from middle distillate fuels using ionic liquids and deep eutectic solvents: A critical review. **Fuel**, v. 310, p. 122279, 2022.
- AITIPAMULA, Srinivasulu; WONG, Annie B. H.; CHOWA, Pui Shan and TAN, Reginald B. H. Novel solid forms of the anti-tuberculosis drug, Isoniazid: Ternary and polymorphic cocrystals. **CrystEngComm**, v. 15, n. 29, p. 5877–5887, 2013.
- ALAM, Zauwad; KAUR, Sukhbir; PORWAL, Pawan Kumar. Understanding the problems in pharmaceutical procurement with special reference to active pharmaceutical ingredients and excipients. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 23, n. 6, p. 319–328, 2018.
- ALMARSSON, Örn; ZAWOROTKO, Michael J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines, **Chemical Communications**, n. 17, p. 1889–1896, 2004.
- AMIDON, Gordon L.; LENNERNÄS, Hans; SHAH, Vinod P.; CRISON, John R. Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413–420, 1995.
- AN, Ji-Hun; JIN, Feng; KIM, Hak Sung; RYU, Hyung Chul; KIM, Jae Sun; KIM, Hyuk Min; KIM, Ki Hyun; KIYONGA, Alice Nguvoko; JUNG, Kiwon. Investigation of the Polymorphic Transformation of the Active Pharmaceutical Ingredient Clopidogrel Bisulfate Using the Ionic Liquid AEImBF₄. **Crystal Growth and Design**, v. 16, n. 4, p. 1829–1836, 2016.
- ANDRE, Vania; TERESA, M. Novel Challenges in Crystal Engineering: Polymorphs and New Crystal Forms of Active Pharmaceutical Ingredients. **Current Trends in X-Ray Crystallography**, 2011.
- ANTONIO, Selma Gutierrez. **Aplicação da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos**. 161 f. 2010. - Universidade Estadual Paulista, 2010.

ARBEX, Marcos Abdo; VARELLA, Marília de Castro Lima; DE SIQUEIRA, Hélio Ribeiro; DE MELLO, Fernando Augusto Fiúza. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626–640, 2010.

ARTUSIO, Fiora; PISANO, Roberto. Surface-induced crystallization of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 190–208, 2018.

ARUNAGIRI, C.; ANITHA, A.G.; SUBASHINI, A.; SELVAKUMAR, S. Synthesis, X-ray crystal structure, vibrational spectroscopy, DFT calculations, electronic properties and Hirshfeld analysis of (E) -4-Bromo-N'-(2,4-dihydroxy-benzylidene) benzohydrazide. **Journal of Molecular Structure**, v. 1163, p. 368–378, 2018.

De AZEVEDO, Jacqueline Resende; ESPITALIER, Fabienne; LETOURNEAU, Jean-jacques; RÉ, Maria-Inês. Antisolvent crystallization of a cardiotonic drug in ionic liquids : Effect of mixing on the crystal properties. **Journal of Crystal Growth**, p. 29-34, 2018.

BABU, J. M. Sateesh; SEVUKARAJAN, M.; THAMIZHVANAN, K.; NAVEENKUMAR, B.; REDDY, B. Sreekanth; VIVEKANANDA, U.; SHYAMKUMAR, V. Evaluation of physiochemical and anti-tubercular activity of co-crystal of isoniazid with methyl paraben. **Innovative Drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 10–27, 2013.

BALK, Anja; HOLZGRABE, Ulrike; MEINEL, Lorenz. 'Pro et contra' ionic liquid drugs – Challenges and opportunities for pharmaceutical translation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 94, p. 291–304, 2015.

BENDER, Caroline R. **Líquidos iônicos dicatiônicos: propriedades físico-químicas e interações com fármacos**. 258 f., Universidade Federal de Santa Maria, 2018.

BENOSMAN, Ahmed Soufiane; MOULI, Mohamed; TAIBI, Hamed; BELBACHIR, Mohamed; SENHADJI, Yassine; BAHLOULI, Ilies; HOUIVET, David. Studies on Chemical Resistance of PET-Mortar Composites: Microstructure and Phase Composition Changes. **Engineering**, v. 05, n. 04, p. 359–378, 2013.

BERRY, David J; STEED, Jonathan W. Pharmaceutical cocrystals , salts and multicomponent systems ; intermolecular interactions and property based design . **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 3–24, 2017.

BHAT, Mashooq Ahmad; KHAN, Abdul Arif; GHABBOUR, Hazem A.; QUAH, Ching Kheng; FUN, Hoong-Kun. Synthesis, characterization, x-ray structure and antimicrobial activity of N-(4-chlorophenyl)-2-(pyridin-4-ylcarbonyl) hydrazinecarbothioamide. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1751–1757, 2016.

BHUTANI, Hemant; SINGH, Saranjit; VIR, Sanjay; BHUTANI, K. K.; KUMAR, Raj; CHAKRABORTI, Asit K.; JINDAL, K. C. LC and LC-MS study of stress decomposition behaviour of isoniazid and establishment of validated stability-indicating assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1213–1220, 2007.

BHUTANI, Hemant; SINGH, Saranjit; JINDAL, K. C. Drug-drug interaction studies on first-line anti-tuberculosis drugs. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 10, n. 4, p. 517–524, 2005.

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.

BONHÔTE, Pierre; DIAS, Ana-Paula; PAPAGEORGIOU, Nicholas; KALYANASUNDARAM, Kuppaswamy; GRÄTZEL, Michael. Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 1168–1178, 1996.

CHARALABIDIS, Aggelos; SFOUNI, Maria; BERGSTRÖM, Christel; MACHERAS, Panos. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, n. April, p. 264–281, 2019.

CHERUKUVADA, Suryanarayan; NANGIA, Ashwini. Fast dissolving eutectic compositions of two anti-tubercular drugs. **CrystEngComm**, v. 14, n. 7, p. 2579–2588, 2012.

COSTA, L.T.; FILETI, E.E. **Modelagem computacional de líquidos iônicos**. In: FREITAS, L.C.G., and OLIVEIRA, G.S., orgs. Aplicações de química teórica no estudo de materiais: métodos in silico para nanomateriais [online]. São Carlos: EdUFSCar, 2018, pp. 158-184. ISBN 978-65-80216- 12-3.

DANYLYUK, Oksana; BUTKIEWICZ, Helena; COLEMAN, Anthony W.; SUWINSKA, Kinga. Solvent control in the formation of supramolecular host-guest complexes of isoniazid with p-sulfonatocalix[4]arene. **CrystEngComm**, v. 17, n. 8, p. 1745–1749, 2015.

DAS, Dinabandhu; ENGEL, Emile; BARBOUR, Leonard J. Reversible single-crystal to single-crystal polymorphic phase transformation of an organic crystal. **Chemical Communication**, v.10, p. 1676–1678, 2010.

DAVIS, James H.; FORRESTER, Kerri J. Thiazolium-ion based organic ionic liquids (OILs). Novel oils which promote the benzoin condensation. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 9, p. 1621–1622, 1999.

DE AGUIAR, Inara; TAVARES, Aline; ROVEDA, Antonio C.; DA SILVA, Augusto C.H.; MARINO, Leonardo B.; LOPES, Érica O.; PAVAN, Fernando R.; LOPES, Luiz G.F.; FRANCO, Douglas W. Antitubercular activity of Ru (II) isoniazid complexes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 45–54, 2015.

DE FREITAS, Leonardo Viana; DA SILVA, Cecilia C.P.; ELLENA, Javier; COSTA, Luiz Antônio Sodré; REY, Nicolás A. Structural and vibrational study of 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone - A potential metal-protein attenuating compound (MPAC) for the treatment of Alzheimer's disease. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 116, p. 41–48, 2013.

DELLING, Felix Nicolai. **Síntese, caracterização de cocristais e sais-cocristais de ingredientes farmacêuticos ativos. 2016**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

DESIRAJU, Gautam R. The Supramolecular Synthon in Crystal Engineering- A New Organic Synthesis. **Angew. Chem.**, v. 107, p. 2541–2558, 1995.

DINIZ, Luan F.; SOUZA, Matheus S.; CARVALHO, Paulo S.; CORREA, Charlane C.; ELLENA, Javier. Modulating the water solubility and thermal stability of the anti-tuberculosis drug Isoniazid via multicomponent crystal formation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1171, p. 223–232, 2018a.

DINIZ, Luan F.; SOUZA, Matheus S.; CARVALHO, Paulo S.; DA SILVA, Cecilia C.P.; D'VRIES, Richard F.; ELLENA, Javier. Novel Isoniazid cocrystals with aromatic carboxylic acids: Crystal engineering, spectroscopy and thermochemical investigations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1153, p. 58–68, 2018b.

DINIZ, Luan F. **Planejamento, obtenção e caracterização de novas formas sólidas de fármacos tuberculostáticos**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

DOS REIS, Felipe D.; GATTI, Isabela C.; GARCIA, Humberto C.; DE OLIVEIRA, Vanessa E.; DE OLIVEIRA, Luiz F.C. Squaraines: Crystal structures and spectroscopic analysis of hydrated and anhydrous forms of squaric acid-isoniazid species. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 118, n. 49, p. 11521–11528, 2014.

DRAGOSTIN, Ionut; DRAGOSTIN, Oana M.; KESHARI, Sangram; DASH, Saumya; TATIA, Rodica; DRAGAN, Maria; CONFEDERAT, Luminița; GHICIUC, Cristina M.; DICULENCU, Daniela; LUPUȘORU, Cătălina E; ZAMFIR, Carmen L. European Journal of Pharmaceutical Sciences New isoniazid derivatives with improved pharmaco-toxicological profile : Obtaining , characterization and biological evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 137, n. June, p. 104974, 2019.

EL-ZHRY EL-YAFI, Abdul Khaliq; EL-ZEIN, Hind. Technical crystallization for application in pharmaceutical material engineering: Review article. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 283–291, 2014.

EVORA, Maria C.; GONÇALEZ, Odair L.; DUTRA, Rita C.L.; DINIZ, Milton F.; WIEBECK, Helio; ANDRADE E SILVA, Leonardo G. De. A Comparison of Transmission, Reflection and Photoacoustic FTIR Techniques in the Analysis of Recycled and Irradiated Polyamide-6. **Polímeros**, v. 12, p. 60–68, 2002.

FARIA, Ricardo A.; BOGEL-ŁUKASIK, Ewa. Solubilities of pharmaceutical and bioactive compounds in trihexyl(tetradecyl)phosphonium chloride ionic liquid. **Fluid Phase Equilibria**, v. 397, p. 18–25, 2015.

FLEISCHMAN, Scott G.; KUDUVA, Srinivasan S.; MCMAHON, Jennifer A.; MOULTON, Brian; BAILEY, Walsh; ROSA D.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, Naír; ZAWOROTKO, Michael J. Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases: Multiple-Component Crystalline Solids Involving Carbamazepine. **Crystal Growth and Design**, v. 3, n. 6, p. 909–919, 2003.

FORTE, Andreia; MELO, Catarina I.; BOGEL-ŁUKASIK, Rafał; BOGEL-ŁUKASIK, Ewa A. favourable solubility of isoniazid, an antitubercular antibiotic drug, in alternative solvents. **Fluid Phase Equilibria**, v. 318, p. 89–95, 2012.

FRANZBLAU, Scott G.; WITZIG, Richard S.; MCLAUGHLIN, James C.; TORRES, Patricia; MADICO, Guillermo; HERNANDEZ, Antonio; Degnan, Michelle T.; COOK, Mary B.; QUENZER, Virginia K.; FERGUSON, Robert M.; GILMAN, Robert H. Rapid, low-

technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362–366, 1998.

FRIZZO, Clarissa P.; BENDER, Caroline R.; GINDRI, Izabelle M.; SALBEGO, Paulo R. S.; VILLETTI, Marcos A.; MARTINS, Marcos A.P. Anion effect on the aggregation behavior of the long-chain spacers dicationic imidazolium-based ionic liquids. **Colloid and Polymer Science**, v. 293, n. 10, p. 2901–2910, 2015a.

FRIZZO, Clarissa P.; GINDRI, Izabelle M.; BENDER, Caroline R.; TIER, Aniele Z.; VILLETTI, Marcos A.; RODRIGUES, Danieli C.; MACHADO, Giovanna; MARTINS, Marcos A.P. Effect on aggregation behavior of long-chain spacers of dicationic imidazolium-based ionic liquids in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 468, p. 285–294, 2015b.

FRIZZO, Clarissa P.; BENDER, Caroline R.; SALBEGO, Paulo R. S.; FARIAS, Carla A. A.; VILLETTI, Marcos A.; MARTINS, Marcos A. P. Heteroassembly Ability of Dicationic Ionic Liquids and Neutral Active Pharmaceutical Ingredients. **ACS Omega**, v. 3, n. 2, p. 2282–2291, 2018.

FRIZZO, Clarissa P.; BENDER, Caroline R.; SALBEGO, Paulo R. S.; BLACK, Gabrielle; VILLETTI, Marcos A.; MARTINS, Marcos A.P.. Thermodynamic properties of the aggregation behavior of a dicationic ionic liquid determined by different methods. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 494, p. 1–8, 2016.

GADILOHAR, Balu L.; SHANKARLING, Ganapati S. Choline based ionic liquids and their applications in organic transformation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 227, p. 234–261, 2017.

GAO, Zhong-zheng; BAI, Dong; XIAO, Zhi-you; ZHU, Qian-jiang; XUE, Sai-feng; TAO, Zhu; XIAO, Xin. Host – guest interactions in tetramethyl-cucurbit [6] uril with anti-tuberculosis drug isoniazid. **INOCHÉ**, v. 71, p. 68–72, 2016.

GIONDA, Andrea; MACETTI, Giovanni; LOCONTE, Laura; RIZZATO, Silvia; ORLANDO, Ahmed M; LO, Leonardo. theoretical study of conformational polymorphism in a complex organic molecule (DTC). p. 38445–38454, 2018.

GLOMME, A.; MÄRZ, J.; DRESSMAN, J. B. 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.

GOUVEIA, W.; JORGE, T. F.; MARTINS, S.; MEIRELES, M.; CAROLINO, M.; CRUZ, C.; ALMEIDA, T. V.; ARAÚJO, M. E. M.. Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. **Chemosphere**, v. 104, p. 51–56, 2014.

GREER, Adam J.; JACQUEMIN, Johan; HARDACRE, Christopher. Industrial Applications of Ionic Liquids, **Molecules**, v. 25, p. 1-31, 2020.

HAN, Dandan; KARMAKAR, Tarak; BJELOBRK, Zoran; GONG, Junbo; PARRINELLO, Michele. Solvent-mediated morphology selection of the active pharmaceutical ingredient isoniazid : Experimental and simulation studies. **Chemical Engineering Science**, v. 204, p. 320–328, 2019.

- HARRIS, Kenneth R. Temperature and Pressure Dependence of the Viscosity of the Ionic Liquid 1-Butyl-3-methylimidazolium Acetate. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 65, n. 2, p. 804–813, 2020.
- HEJAZIFAR, Mahtab; LANARIDI, Olga; BICA-SCHRÖDER, Katharina. Ionic liquid based microemulsions: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 303, p. 112264, 2020.
- HONG, You lee; MANJUNATHA REDDY, G. N.; NISHIYAMA, Yusuke. Selective detection of active pharmaceutical ingredients in tablet formulations using solid-state NMR spectroscopy. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 106, p. 101651, 2020.
- HOSSEINI, S. M.; ALAVIANMEHR, M. M.; GUTIÉRREZ, A.; KHALIFEH, R.; Moghadasi, J.; APARICIO, S. On the properties and structure of 2-hydroxyethylammonium formate ionic liquid. **Journal of Molecular Liquids**, v. 249, p. 233–244, 2018.
- HOSSEINI, S. M.; HOSSEINIAN, A.; APARICIO, S. An experimental and theoretical study on 2-hydroxyethylammonium acetate ionic liquid. **Journal of Molecular Liquids**, v. 284, p. 271–281, 2019.
- IWATA, Kentaro; KARASHIMA, Masatoshi; IKEDA, Yukihiro. Isotope-Edited Infrared Spectroscopy for Efficient Discrimination between Pharmaceutical Salts and Cocrystals. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 2350–2358, 2017
- JIANG, Cheng; LI, Weimin; NIAN, Jingyan; LOU, Wenjing; WANG, Xiaobo. Tribological evaluation of environmentally friendly ionic liquids derived from renewable biomaterials. **Friction**, v. 6, n. 2, p. 208–218, 2017.
- JONES, Eleanor C.L.; BIMBO, Luis M. Crystallisation behaviour of pharmaceutical compounds confined within mesoporous silicon. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 1–24, 2020.
- JOPPI, Roberta *et al.* Food and Drug Administration vs European Medicines Agency: Review times and clinical evidence on novel drugs at the time of approval. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 170–174, 2020.
- JU, Chao; ZHENG, Dongdong; ZHAO, Qin; WANG, Xiaobo. Tribological Properties of Green ILs Containing MoS₂ Quantum Dots with One-Step Preparation. **Tribology Letters**, v. 68, n. 3, p. 1–9, 2020.
- JÚLIO, Ana Luísa Gomes. **Ionic liquids as functional ingredients in drug delivery systems: solubility, permeation and cytotoxicity studies**. Dissertação (Mestrado) - Universidade usófona de Humanidades e Tecnologias, 60 f., 2017.
- KALLA, Reddi Mohan Naidu; LIM, Jaehwa; BAE, Jaeyeong; KIM, I. Sulfated choline ionic liquid-catalyzed acetamide synthesis by grindstone method. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 16, p. 1595–1599, 2017.
- KAMALAKARAN, A S. Molecular Adducts of Isoniazid: Crystal Structure, Electronic Properties, and Hirshfeld Surface Analysis. **Journal of Structural Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 1518–1533, 2018.
- KARIMI-JAFARI, Maryam; PADRELA, Luis; WALKER, Gavin M.; CROKER, Denise M. Creating cocrystals: A review of pharmaceutical cocrystal preparation routes and applications.

review-article. **Crystal Growth and Design**, v. 18, n. 10, p. 6370–6387, 2018.

KARROUCHI, Khalid; FETTACH, Saad; JOTANI, Mukesh M.; SAGAAMA, Abir; RADI, Smail; GHABBOUR, Hazem A.; MABKHOT, Yahia N.; HIMMI, Benacer; EL ABBES FAOUZI, My; ISSAOUI, Nouredine. Synthesis, crystal structure, hirshfeld surface analysis, DFT calculations, anti-diabetic activity and molecular docking studies of (E)-N'-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene) isonicotinohydrazide. **Journal of Molecular Structure**, v. 1221, p. 128800, 2020.

KAUR, Ramanpreet; PERUMAL, S. S. R. R.; BHATTACHARYYA, Aninda J.; YASHONATH, S; ROW, T. N. Guru. Structural Insights into Proton Conduction in Gallic Acid – Isoniazid Cocrytals. 2014.

KEBAILI, Hakima; DE LOS RÍOS, Antonia Pérez; SALAR-GARCÍA, María José; ORTIZ-MARTÍNEZ, Víctor Manuel; KAMECHE, Mostefa; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Jesús; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Francisco J. Evaluating the Toxicity of Ionic Liquids on *Shewanella* sp. for Designing Sustainable Bioprocesses. **Frontiers in Materials**, v. 7, n. November, 2020.

KHODAPARAST, Sepideh; Sharratt, WILLIAM N.; TYAGI, Gunjan; DALGLIESH, Robert M.; ROBLES, Eric S. J.; CABRAL, João T.. Pure and mixed aqueous micellar solutions of Sodium Dodecyl sulfate (SDS) and Dimethyldodecyl Amine Oxide (DDAO): Role of temperature and composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 582, p. 1116–1127, 2021.

KRISHNAN, Abhishek; GOPINATH, Kannappan Panchamoorthy; VO, Dai Viet N.; MALOLAN, Rajagopal; NAGARAJAN, Vikas Madhav; ARUN, Jayaseelan. Ionic liquids, deep eutectic solvents and liquid polymers as green solvents in carbon capture technologies: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 2031–2054, 2020.

LEMANOWICZ, Marcin; MIELAŃCZYK, Anna; WALICA, Tomasz; KOTEK, Milena; GIERCZYCKI, Andrzej. Application of polymers as a tool in crystallization —A review. **Polymers**, v. 13, n. 16, p. 1–22, 2021.

LEMMERER, Andreas; GOVINDRAJU, Stefan; JOHNSTON, Marcelle; MOTLOUNG, Xolani; SAVIG, Kelsey L. Co-crystals and molecular salts of carboxylic acid/pyridine complexes: can calculated pKa's predict proton transfer. A case study of nine complexes. **CrystEngComm**, v. 17, n. 19, 2015.

LI, Wenjing; ZHANG, Zhaofu; HAN, Buxing; HU, Suqin; XIE, Ye; YANG, Guanying. Effect of water and organic solvents on-the ionic dissociation of ionic liquids. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 23, p. 6452–6456, 2007.

LI, Zhiyong; LIU, Xinxin; PEI, Yuanchao; WANG, Jianji; HE, Mingyuan. Design of environmentally friendly ionic liquid aqueous two-phase systems for the efficient and high activity extraction of proteins. **Green Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 2941–2950, 2012.

LIMBERGER, Ana Luiza Marin Bortoluzzi. **Estudo Do Polimorfismo Em Diferentes Fármacos De Interesse Para a Indústria Farmacêutica : Cimetidina , Mebendazol E Paracetamol**. 103 f, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

LÓPEZ-DÍAZ, A. S.; RÍOS-CORRIPIO, M. A.; RAMÍREZ-CORONA, N.; LÓPEZ-MALO,

A.; PALOU, E. Effect of short wave ultraviolet radiation on selected properties of edible films formulated with pomegranate juice and chitosan. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 17, n. 1, p. 63–73, 2018.

MAHAJAN, Suruchi; SHARMA, Rabia; MAHAJAN, Rakesh Kumar. An investigation of drug binding ability of a surface active ionic liquid: Micellization, electrochemical, and spectroscopic studies. **Langmuir**, v. 28, n. 50, p. 17238–17246, 2012.

MASHHADI, Syed Muddassir Ali; YUNUS, Uzma; BHATTI, Moazzam Hussain; TAHIR, Muhammad Nawaz. Isoniazid cocrystals with anti-oxidant hydroxy benzoic acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1076, p. 446–452, 2014.

MASHHADI, Syed Muddassir Ali; YUNUS, Uzma; HUSSAIN, Moazzam; AHMED, Imtiaz; NAWAZ, Muhammad. 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, p. 17–21, 2016.

MELO, Cristiane C. De; SOUSA, Paulo De; JR, Carvalho; DINIZ, Luan F.; VRIES, Richard F. D; AYALA, Alejandro P; ELLENA, Javier. Supramolecular synthesis and thermochemical investigations of pharmaceutical inorganic isoniazid salts. p. 6378–6388, 2016.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of medicinal plant research**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982.

MIGUEL, Thaiz Batista Azevedo Rangel; PORTO, Elaine Cristina Maciel; PINHEIRO, Sergimar Kennedy de Paiva; DE CASTRO MIGUEL, Emilio; FERNANDES, Fabiano André Narciso; RODRIGUES, Sueli. Protective Effect of Natural and Processed Coconut Water by Non-thermal Technologies Against Oxidative Stress in Brine Shrimp (*Artemia salina*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 4, p. 702–716, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico 2021**, f. 44 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Epidemiological Report - Tuberculosis 2020**, 2020.

MORIEL, P.; GARCÍA-SUÁREZ, E. J.; MARTÍNEZ, M.; GARCÍA, A. B.; MONTES-MORÁN, M. A.; CALVINO-CASILDA, V.; BAÑARES, M. A. Synthesis, characterization, and catalytic activity of ionic liquids based on biosources. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 37, p. 4877–4881, 2010.

MOTA, Aquiles Paulino Peres. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum* e do trans-cinamaldeído e suas associações com rifampicina e isoniazida**. Universidade Federal do Ceará, 2017.

MUHAMMAD, Nawshad; HOSSAIN, M. Ismail; MAN, Zakaria; EL-HARBAWI, Mohanad; BUSTAM, M. Azmi; NOAMAN, Yousr Abdulhadi; MOHAMED Alitheen, Noorjahan Banu; NG, Mei Kee; HEFTER, Glenn; YIN, Chun Yang. Synthesis and physical properties of choline carboxylate ionic liquids. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 57, n. 8, p. 2191–2196, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/je300086w>

MUKHERJEE, Arijit; DESIRAJU, Gautam R. Combinatorial exploration of the structural landscape of acid-pyridine cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 14, n. 3, p. 1375–

1385, 2014.

NANGIA, Ashwini. Conformational Polymorphism in Organic. **Acc. Chem. Res.**, v. 41, n. 5, p. 595–604, 2008.

NARDINO, Deise. **Preparo e caracterização dos diferentes polimorfos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. Toledo, p. 1–55, 2018.

NASRABADI, Amir Taghavi; GANESAN, Venkat. Structure and Transport Properties of Lithium-Doped Aprotic and Protic Ionic Liquid Electrolytes: Insights from Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 26, p. 5588–5600, 2019.

NENKOVA, S; VASILEVA, T; STANULOV, K. Production of phenol compounds by alkaline treatment of technical hydrolysis lignin and wood biomass. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 2, p. 144–146, 2008.

NGILIRABANGA, Jean Baptiste; AUCAMP, Marique; PIRES Rosa, Paulo; SAMSODIEN, Halima. Mechanochemical Synthesis and Physicochemical Characterization of Isoniazid and Pyrazinamide Co-crystals With Glutaric Acid. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 1–11, 2020.

NIE, Haichen; MO, Huaping; BYRN, Stephen R. Investigating the Physicochemical Stability of Highly Purified Darunavir Ethanolate Extracted from PREZISTA® Tablets. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 5, p. 2407–2417, 2018.

NUNES, Edinaira Deodato. **Síntese, caracterização e estudos de reatividade do complexo cis-[Ru(bpy)2(mbpy-izd)]2+ : uma proposta de fármaco anti- tuberculose**. 74 f - Universidade Federal do Ceará, 2018.

OFOEFULE, Sabinus I.; OBODO, Chioma E.; ORISAKWE, Orish E.; AFONNE, Johnson O.; ILONDU, Ndidiamaka A.; AGBASI, Patrick U.; ANUSIEM, Chikere A.; MADUKA, Steve O.; ILO, Cajetan E. Salivary and urinary excretion and plasma-saliva concentration ratios of isoniazid in the presence of Co-administered ciprofloxacin. **American journal of therapeutics**, v. 9, n. 1, p. 15–18, 2002.

OLIVEIRA, Laryssa Mirelle da; SILVA, Cristina Kelly Toscano; GAIÃO, Danielle Gomes de; LIMA, Davidson Marrony Santos Wanderley; DE MELO, Demis Ferreira; DA SILVA, Wesley Castro; CORREIA, Lidiane Pinto; CUNHA, Rosemary Sousa. Estudo de polimorfos e cocrystalis no desenvolvimento de medicamentos: uma revisão integrativa. **Biofarm**, v. 13, n. 4, 2017.

ORUGANTI, Madhavi; KHADE, Pavan; DAS, Uttam Kumar; TRIVEDI, Darshak R. The hierarchies of hydrogen bonds in salts/cocrystals of isoniazid and its Schiff base – a case study. **RSC Advances**, v. 6, n. 19, p. 15868–15876, 2016.

PALOMINO, Juan Carlos; MARTIN, Anandi; CAMACHO, Mirtha; GUERRA, Humberto; SWINGS, Jean; PORTAELS, Françoise. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PARK, Chibeom; PARK, Ji Eun; CHOI, Hee Cheul. Crystallization-induced properties from

morphology-controlled organic crystals. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 8, p. 2353–2364, 2014.

TIBOLA, Ana Paula Oliveira Vilela. **Estudo de compatibilidade entre a isoniazida e excipientes farmacêuticos**. Universidade Federal do Paraná, 2009.

PEDRO, Sónia N.; FREIRE, Carmen S. R.; SILVESTRE, Armando J. D.; FREIRE, Mara G. The role of ionic liquids in the pharmaceutical field: An overview of relevant applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–50, 2020.

PENTTILÄ, Anne; UUSI-KYYNY, Petri; ALOPÆUS, Ville. Distillable protic ionic liquid 2-(hydroxy)ethylammonium acetate (2-HEAA): density, vapor pressure, vapor-liquid equilibrium, and solid-liquid equilibrium. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 49, p. 19322–19330, 2014.

PERDIGÃO, João; PORTUGAL, Isabel. Genetics and roadblocks of drug resistant tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 72, p. 113–130, 2019.

PESSOA, Alcidênio S.; AGUIAR, Gean Pablo S.; VLADIMIR Oliveira, J.; BORTOLUZZI, Adailton J.; PAULINO, Amarilis; LANZA, Marcelo. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 93–102, 2019.

PINKERT, André; ANG, Keng L.; MARSH, Kenneth N.; PANG, Shusheng. Density, viscosity and electrical conductivity of protic alkanolammonium ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 11, p. 5136–5143, 2011.

PLECHKOVA, Natalia V; SEDDON, Kenneth R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p.123-150, 2008.

POHLE, W.; GAUGER, D. R.; FRITZSCHE, H.; RATTAY, B.; SELLE, C.; BINDER, H.; BÖHLIG, H. FTIR-spectroscopic characterization of phosphocholine-headgroup model compounds. **Journal of Molecular Structure**, v. 563–564, p. 463–467, 2001.

PRADO, Livia D.; ROCHA, Helvécio Vinícius A. Solid state in the pharmaceutical industry: A brief review. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2080–2112, 2015.

PROHENS, R; PUIGJANER, C. Polimorfismo en la industria farmacéutica. **El Farmacéutico**, v. 373, n. April, p. 58–68, 2007.

RAHEEM Thayyil, Abdul; JUTURU, Thimmasetty; NAYAK, Shashank; KAMATH, Shwetha. Pharmaceutical Co-Crystallization: Regulatory Aspects, Design, Characterization, and Applications. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 203–212, 2020.

RANA, Vikas; TIWARY, Ashok K. Chitosan-Chondroitin Composite Films: Comparison with In Vitro Skin Permeation Data of Hydrophilic and Lipophilic Drugs. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 6, n. 4, p. 231–242, 2007.

REDDY, G. Kiran Kumar; RAJITHA, K.; NANCHARAI AH, Y. V. Antibiofouling potential of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids: Studies against biofouling barnacle larvae. **Journal of Molecular Liquids**, v. 302, p. 112497, 2020.

Reis, Carla Luzia Borges; SILVA, Lorena Mara Alexandre e.; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; FÉLIX, Anne Kamilly Nogueira; SANTIAGO-AGUIAR, Rílvia Saraiva de; CANUTO, Kirley Marques; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 694–701, 2017.

RESENDE DE AZEVEDO, Jacqueline; LETOURNEAU, Jean Jacques; ESPITALIER, Fabienne; RÉ, Maria Inês. Solubility of a new cardioactive prototype drug in ionic liquids. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 59, n. 6, p. 1766–1773, 2014.

ROBINSON, Derek I. Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients : a review and perspective abstract. **Org. Process Res. Dev.** n. 7, p. 946–959, 2010.

ROCHA, Alanny B.O.; KUMINEK, Gislaine; MACHADO, Tatiane C.; ROSA, Juliana; RAUBER, Gabriela S.; BORBA, Paola A. A.; SIEDLER, Sana; STULZER, Hellen K.; CUFFINI, Silvia Lucia; RODRÍGUEZ-HORNEDO, Naír; Cardoso, Simone G. Cocristsais: Uma estratégia promissora na área farmacêutica. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1112–1125, 2016.

ROCHA, Enio Gomes De Azevedo. **Síntese, caracterização, uso e reciclo de líquidos iônicos próticos no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração.** 1–158 f. 2016. - Universidade de Campinas, 2016.

RODRIGUES, Renata Débora Pinto; SILVA, Amanda Sousa e.; CARLOS, Thalita Adrielly Viana; BASTOS, Ana Karine Pessoa; DE SANTIAGO-AGUIAR, Rílvia Saraiva; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Application of protic ionic liquids in the microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* with antioxidant activity. **Separation and Purification Technology**, v. 252, n. July, p. 117448, 2020.

ROSS, S. A.; LAMPROUP, D. A.; DOUROUMIS, D. Engineering and manufacturing of pharmaceutical co-crystals: A review of solvent-free manufacturing technologies. **Chemical Communications**, v. 52, n. 57, p. 8772–8786, 2016.

SANDHU, Bhupinder; MCLEAN, Ann; SINHA, Abhijeet S.; DESPER, John; AAKERÖY, Christer B.. Assessment of Computational Tools for Predicting Supramolecular Synthons. **Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 612–629, 2021.

SANTOS, Filipa; BRANCO, Luís C.; DUARTE, Ana Rita C. Organic salts based on isoniazid drug: Synthesis, bioavailability and cytotoxicity studies. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 10, p. 1–15, 2020.

SARCEVICA, Inese; OROLA, Liana; PODJAVA, Anton; BELYAKOV, Sergey. Crystal and Molecular Structure and Stability of Isoniazid Cocrystals with Selected Carboxylic Acids. **Crystal Growth & Design**, v. 13, p. 1082–1090, 2013.

SEIF, Salem; FRANZEN, Lutz; WINDBERGS, Maike. Overcoming drug crystallization in electrospun fibers - Elucidating key parameters and developing strategies for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 1, p. 390–397, 2015.

SEVILLANO, Eduard Diego Alonso Aroca. **Desenvolvimento de metodologia para avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de atorvastatina cálcica 20 mg comercializados no Peru, Brasil e Bolívia.** 93 f. 2019. 2019.

SEVUKARAJAN, M *et al.* Preparation and Pharmaceutical Characterization of Supra molecular Complex of Isoniazid with L (+) Tartaric acid Preparation and Pharmaceutical Characterization of Supra molecular Complex of Isoniazid with L (+) Tartaric acid. n. January, 2011.

SHEEJA, S. R.; MANGALAM, Neema Ani; PRATHAPACHANDRA Kurup, M. R.; SHEENA Mary, Y.; RAJU, K.; VARGHESE, Hema Tresa; PANICKER, C. Yohannan. Vibrational spectroscopic studies and computational study of quinoline-2-carbaldehyde benzoyl hydrazone. **Journal of Molecular Structure**, v. 973, n. 1–3, p. 36–46, 2010.

SHEKAARI, Hemayat; ZAFARANI-MOATTAR, Mohammed Taghi; MIRHEYDARI, Seyyedeh Narjes; FARAJI, Saeid. Thermophysical Properties of 1-Hexyl-3-methylimidazolium Salicylate as an Active Pharmaceutical Ingredient Ionic Liquid (API-IL) in Aqueous Solutions of Glycine and l -Alanine. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 64, n. 1, p. 124–134, 2019.

SHEKUNOV, B. Yu; YORK, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of Crystal Growth**, v. 211, n. 1, p. 122–136, 2000.

SHI, YUJIE; Zhao, Zongmin; GAO, Yongsheng; PAN, Daniel C.; SALINAS, Alyssa K.; TANNER, Eden E. L.; GUO, Junling; MITRAGOTRI, Samir. Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes. **Journal of Controlled Release**, v. 322, n. March, p. 602–609, 2020.

SHIN, Yeon-ran; JEON, In-yup; BAEK, Jong-beom. Stability of multi-walled carbon nanotubes in commonly used acidic media. **Carbon**, v. 50, n. 4, p. 1465–1476, 2012.

SHISHOO, C. J.; SHAH, S. A.; RATHOD, I. S.; SAVALE, S. S.; KOTECHA, J. S.; SHAH, P. B. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. v. 190, p. 109–123, 1999.

SMITH, Kenneth Baird. **Crystallisation of active pharmaceutical ingredients using ionic liquids**. University of Birmingham, 2015.

REY, Sophie isabelle coelho. **Amorfização e co-amorfização como estratégias de incremento da solubilidade de substâncias activas pouco solúveis em água (BCS - classe II)**. P. 1-64, Universidade de Lisboa, 2017.

SOUZA, KELLEN CHRISTINA DUTRA DE. **PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURAS POLIMÓRFICAS DA TOLBUTAMIDA E NIFEDIPINA**. p. 1- 93, Universidade Federal Fluminense, 2005.

Souza, Iane M.S.; Borrego-Sánchez, Ana; Sainz-Díaz, C. Ignacio; Viseras, César; Pergher, Sibebe B.C. Study of faujasite zeolite as a modified delivery carrier for isoniazid, **Materials Science and Engineering**, v. 118, p. 111365, 2021.

SWAPNA, Battini; MADDILETI, D.; NANGIA, Ashwini. Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: Polymorphism, isostructurality, and stability. **Crystal Growth and Design**, v. 14, n. 11, p. 5991–6005, 2014.

TANZI, Luana; NARDONE, Michele; BENASSI, Paola; RAMONDO, Fabio; CAMINITI, Ruggero; GONTRANI, Lorenzo. Choline salicylate ionic liquid by X-ray scattering,

vibrational spectroscopy and molecular dynamics. **Journal of Molecular Liquids**, v. 218, p. 39–49, 2016.

TELLERS, Jonathan; JAMALI, Mona; WILLEMS, Philippe; TJEERDSMA, Bôke; SBIRRAZZUOLI, Nicolas; GUIGO, Nathanael. Cross-linking behavior of eutectic hardeners from natural acid mixtures. **Green Chemistry**, v. 23, p. 536–545, 2021.

TSARPALI, Vasiliki; DAILIANIS, Stefanos. Toxicity of two imidazolium ionic liquids, [bmim][BF₄] and [omim][BF₄], to standard aquatic test organisms: Role of acetone in the induced toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 117, p. 62–71, 2015.

UDDIN, Mohammad; BASAK, Debasish; HOPEFL, Robert; MINOFAR, Babak. Potential application of ionic liquids in pharmaceutical dosage forms for small molecule drug and vaccine delivery system. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 158–176, 2020.

VAJEKAR, Shailesh N.; SHANKARLING, Ganapati S. Highly efficient green synthesis of the photochromic spironaphthoxazines using an eco-friendly choline hydroxide catalyst. **Synthetic Communications**, v. 50, n. 3, p. 338–347, 2020.

VIÇOSA, Alessandra; LETOURNEAU, Jean-Jacques; ESPITALIER, Fabienne; RÉ, Maria Inês. An innovative antisolvent precipitation process as a promising technique to prepare ultrafine rifampicin particles. **Journal of Crystal Growth**, v. 342, p. 80–87, 2012.

VIPPAGUNTA, Sudha R.; BRITTAIN, Harry G.; GRANT, David J.W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3–26, 2001.

WEBER, Cameron C; KULKARNI, Samir A.; KUNOV-KRUSE, Andreas J.; ROGERS, Robin D.; MYERSON, Allan S. The Use of Cooling Crystallization in an Ionic Liquid System for the Purification of Pharmaceuticals. **Crystal Growth & Design**, v. 15, p. 4946–4951, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report**. 2020.

YUE, Duyuan; JIA, Yongzhong; YAO, Ying; SUN, Jinhe; JING, Yan. Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea. **Electrochimica Acta**, v. 65, n. 30, p. 30–36, 2012.

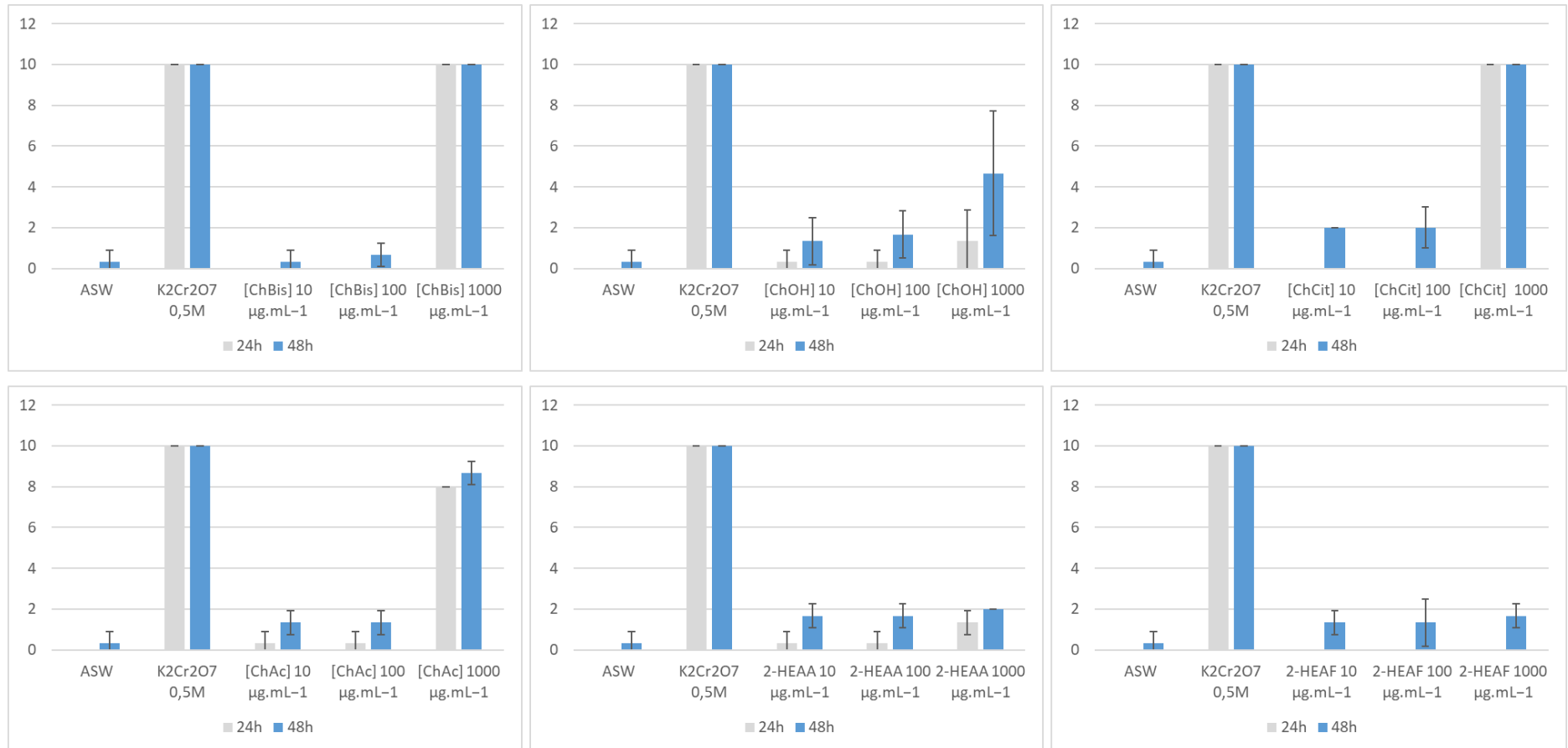
ZANONI, Bruna Varela; BRASIL Romão, Gabriela; ANDRADE, Rebecca S.; BARRETTO Cicarelli, Regina Maria; TROVATTI, Eliane; CHIARI-ANDRÈO, Bruna Galdorfini; IGLESIAS, Miguel Cytotoxic effect of protic ionic liquids in HepG2 and HaCat human cells: In vitro and in silico studies. **Toxicology Research**, v. 8, n. 3, p. 447–458, 2019.

ZERDOUMI, Ridha; BENSLIMANE, Salah. Electrochemical characterization of the CMX cation exchange membrane in buffered solutions : Effect on concentration polarization and counterions transport properties. **Desalination**, v. 340, p. 42–48, 2014.

ZHANG, Qinghua; BENOIT, Maud; VIGIER, Karine Dea Oliveiraa; BARRAULT, Joàl; JÉRÔME, François. Green and inexpensive choline-derived solvents for cellulose decrystallization. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 4, p. 1043–1046, 2012.

ZHAO, Li; PINON, Arthur C.; EMSLEY, Lyndon; ROSSINI, Aaron J. DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy of active pharmaceutical ingredients. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 583–609, 2018.

APÊNDICE A

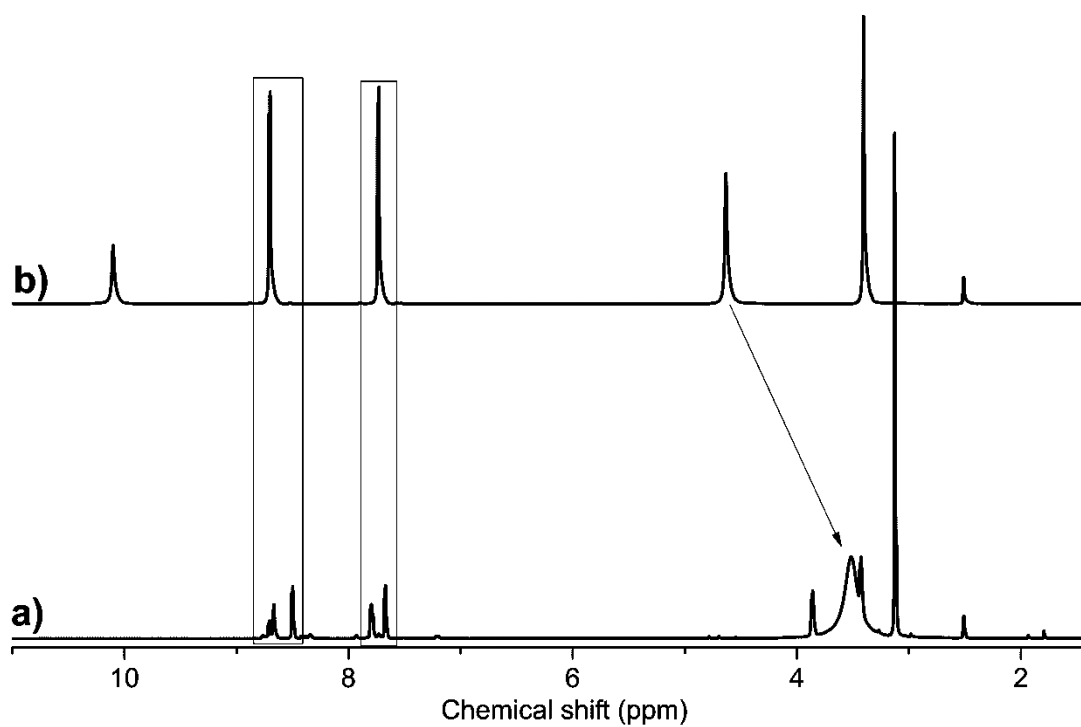
Figura A.1 – a) Taxas de mortalidade de náuplios de *Artemia salina* em função da concentração de líquido iônico, nos tempos de 24h e 48h

Fonte: elaborada pela autora (2021).

APÊNDICE B

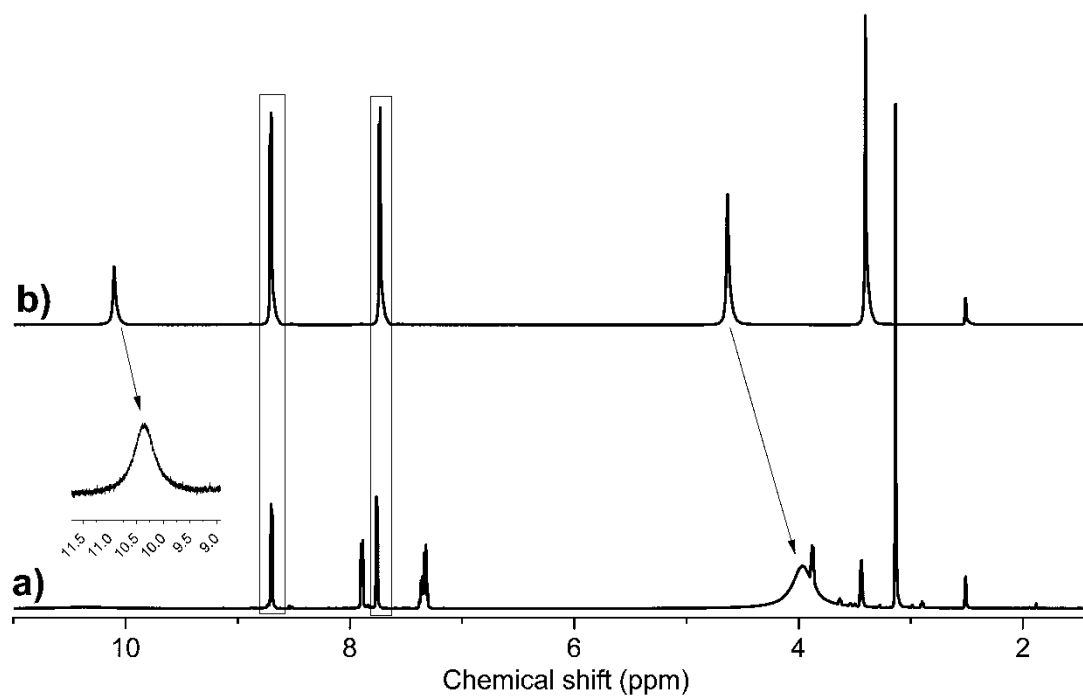
ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

Figura B.1 – a) Espectro de RMN ^1H da isoniazida cristalizada no líquido iônico hidróxido de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (INH:[ChOH]) e b) Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão.



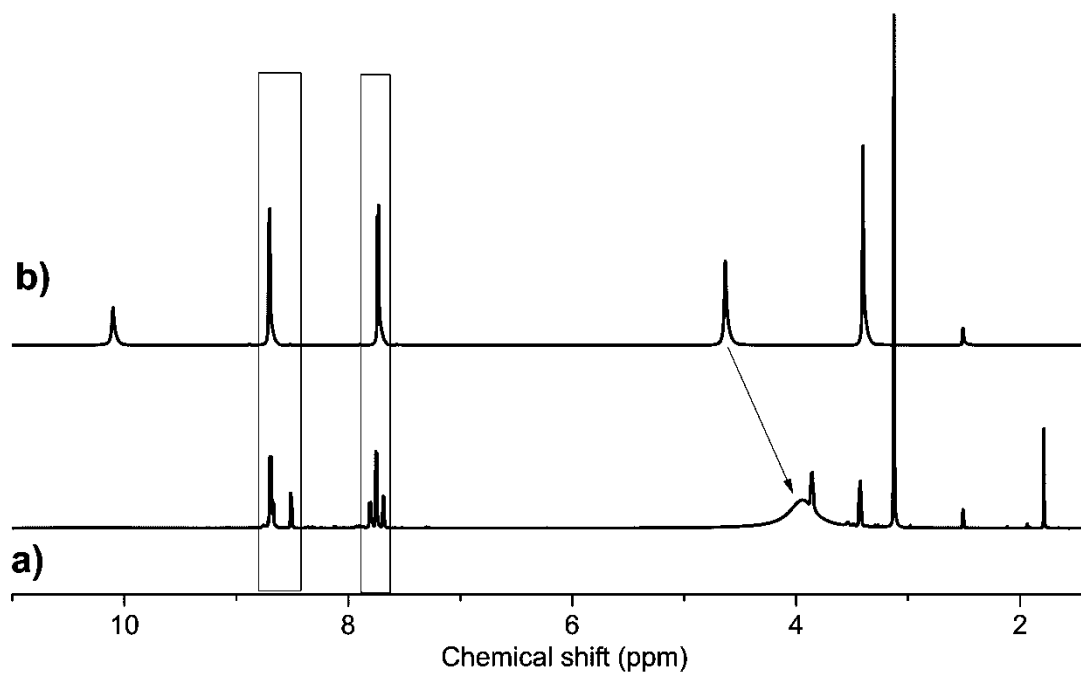
Fonte: elaborada pela autora (2021)

Figura B.2 – a) Espectro de RMN ^1H da isoniazida cristalizada no líquido iônico benzoato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio (INH:[ChBenz]) e b) Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão.



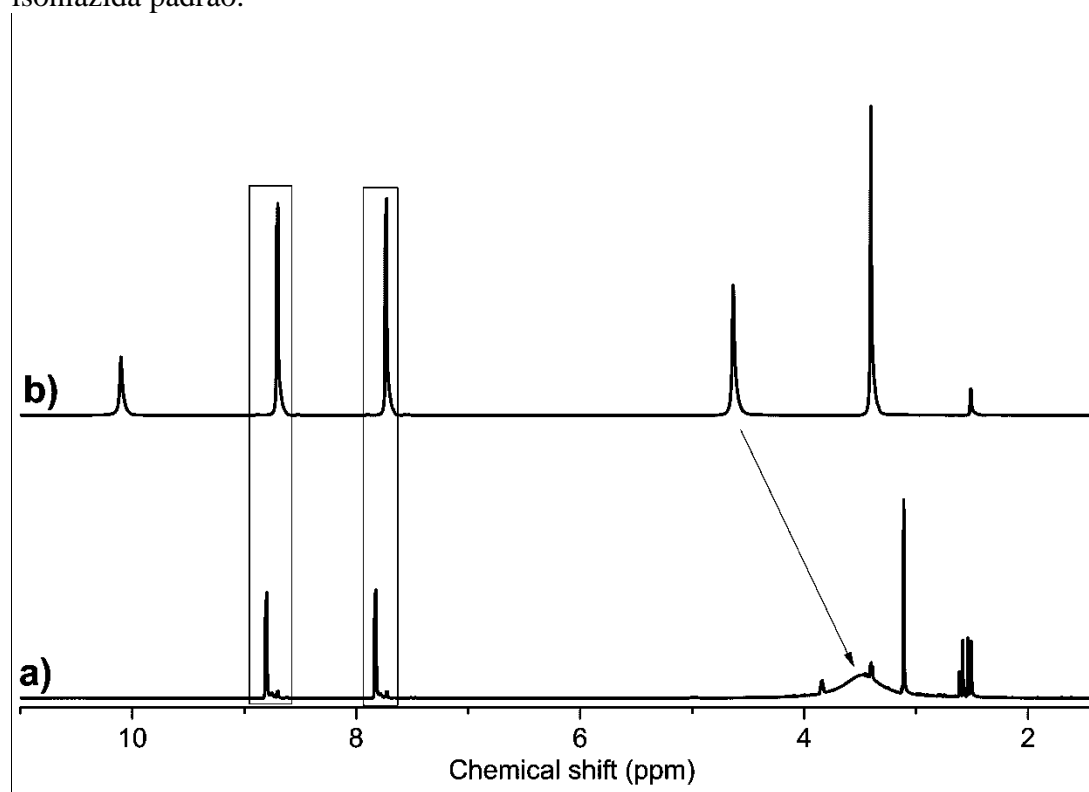
Fonte: elaborada pela autora (2021)

Figura B.3 – a) Espectro de RMN ^1H da isoniazida cristalizada no líquido iônico acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (INH:[ChAc]) e b) Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão.



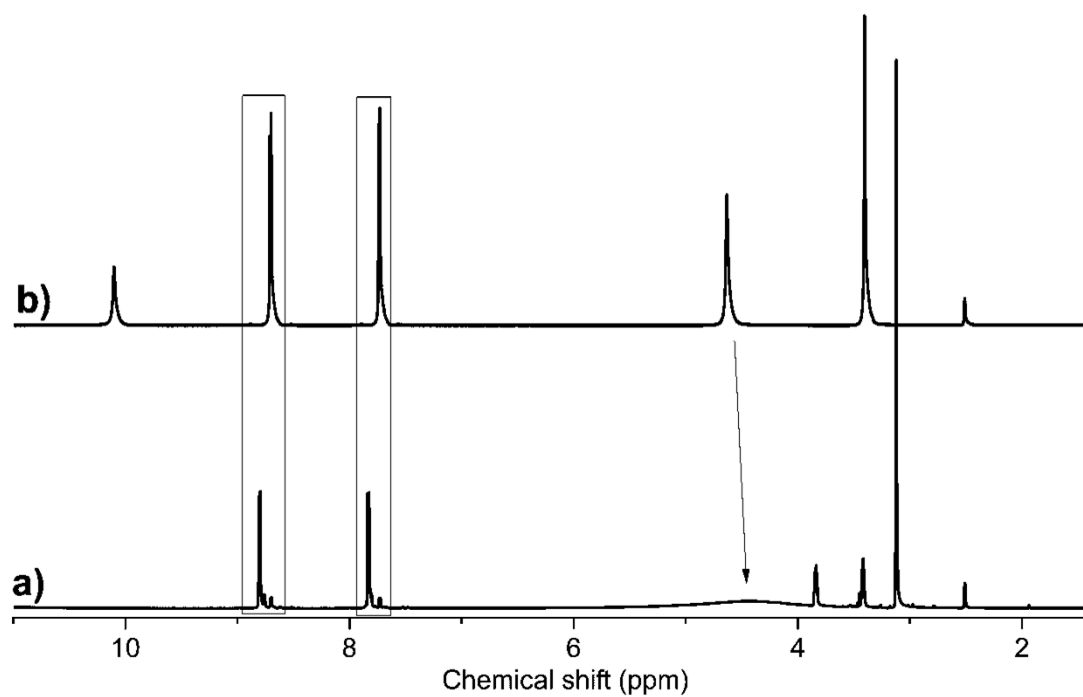
Fonte: elaborada pela autora (2021)

Figura B.4 – a) Espectro de RMN ^1H da isoniazida cristalizada no líquido iônico citrato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (INH:[ChCit]) e b) Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão.



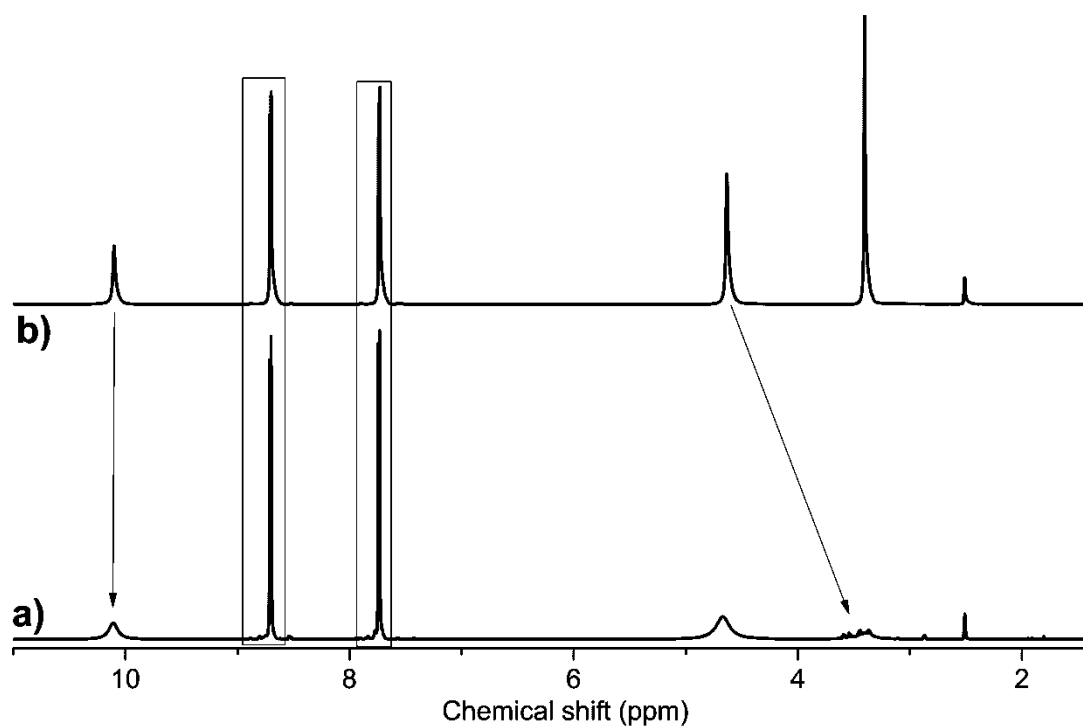
Fonte: elaborada pela autora (2021).

Figura B.5 – a) Espectro de RMN ^1H da isoniazida cristalizada no líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio (INH:[ChBis] e b) Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão.



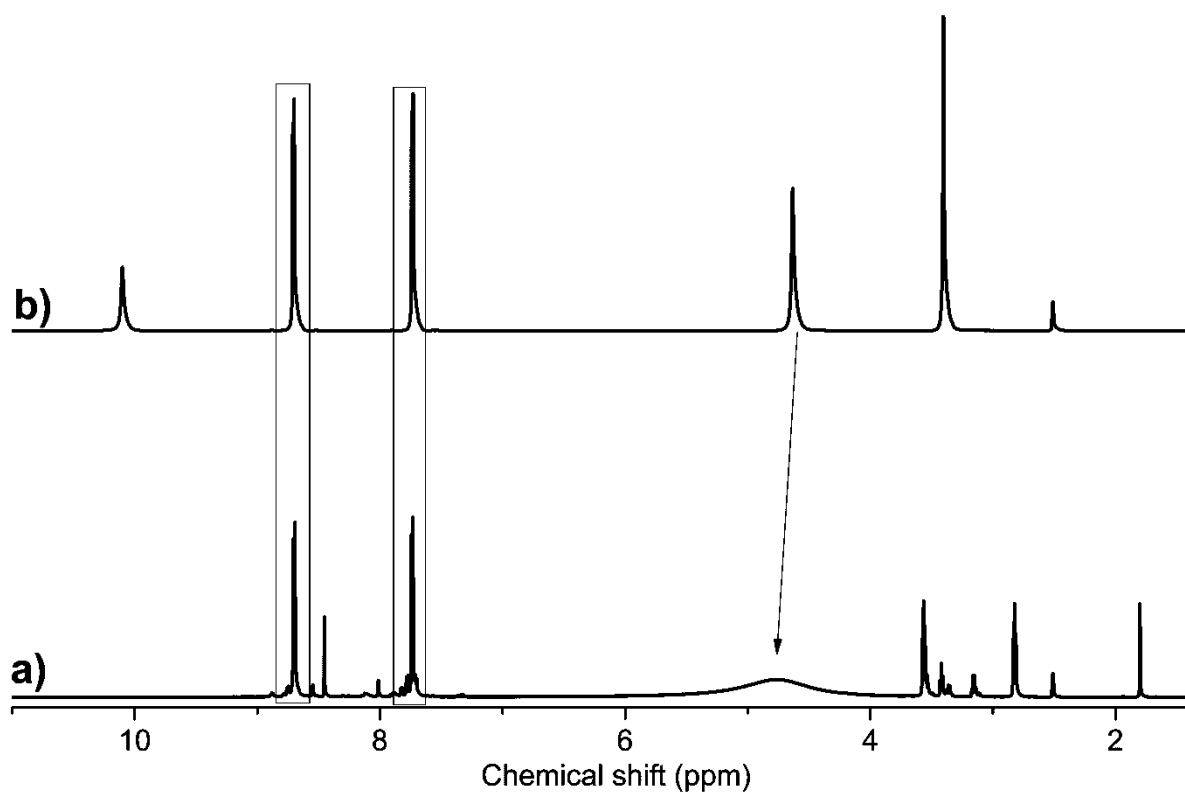
Fonte: elaborada pela autora (2021).

Figura B.6 – a) Espectro de RMN ^1H da isoniazida cristalizada no líquido iônico 2-HEAA (INH:2-HEAA) e b) Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Figura B.7 – a) Espectro de RMN ^1H da isoniazida cristalizada no líquido iônico 2-HEAF (INH:2-HEAF) e b) Espectro de RMN de ^1H da isoniazida padrão.



Fonte: elaborada pela autora (2021).