## Estudio polimórfico de la Nitazoxanida

## Juan Sebastián García Ceballos

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Químico

### **Director**

José Antonio Henao Martínez, Ph.D. en Química

### **Codirector**

Robert Antonio Toro Hernández, Ph.D. en Química Aplicada

## UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

**FACULTAD DE CIENCIAS** 

ESCUELA DE QUÍMICA

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA ESTRUCTURAL (GIQUE)
BUCARAMANGA

## Agradecimientos

Agradezco al profesor Robert Antonio Toro Hernández por su enseñanza y paciencia en el proceso de proyecto de grado.

Al Grupo de Investigación en Química Estructural (GIQUE) y al Laboratorio de Difracción de Rayos X por los servicios prestados y su colaboración para el desarrollo de este proyecto.

A Cristian Rojas, Angie Tamayo y Angie Marín amigos que con su ayuda y soporte pudimos avanzar y terminar este proceso.

A mi madre, con sus enseñanzas y educación me llevaron a donde estoy hoy.

A mi compañera de vida, Karoll Michelle Cedeño Villarreal, sin su ayuda y amor este proyecto no hubiese culminado.

# Contenido

Int	troducción	12
1.	Hipótesis	15
2.	Objetivos	15
3.	Marco teórico	16
	3.1 Polimorfismo	16
	3.2 Nitazoxanida	18
	3.3 Crecimiento de cristales.	19
	3.4 Técnicas de cristalización	19
	3.4.1 Cristalización a partir de un solvente o mezcla de solventes	20
	3.4.2 Adición de antisolvente	20
	3.4.3 Cristalización en medios gelificados	21
	3.5 Técnicas de caracterización	22
	3.5.1 Espectroscopia IR	22
	3.5.2 Espectroscopia UV- VIS	23
	3.5.3 Análisis térmico TGA-DSC	23
	3.5.4 Difracción de rayos X	24
	3.5.5. Determinación estructural a partir del cristal único	27
	3.5.6. Refinamiento estructural	28
	3.5.7. Determinación estructural a partir del patrón de polvo	29
	3.5.8. Indexado de un patrón de polvo.	30
	3.6. Superficie de Hirshfeld	33

4.	Antecedentes	35
5.	Metodología	44
	5.1. Fase 1: Caracterización de la materia prima.	44
	5.2. Fase 2: Cristalización	44
	5.2.1. Evaporación lenta de solvente:	44
	5.2.2. Solvente/anti solvente:	44
	5.2.3. Cristalización hidrotermal	44
	5.2.4. Evaporación de solvente a 70°C:	44
	5.2.5. Medios gelificados:	45
	5.3. Fase 3: Caracterización del producto sólido mediante IR, análisis térmico TGA-	DSC
	y difracción de rayos X de muestras policristalinas y monocristal	45
	5.3.1 Espectroscopia IR	45
	5.3.2 UV-VIS	45
	5.3.3 Análisis térmico TGA-DSC	45
	5.3.4 Difracción de rayos X de polvo	46
	5.3.5 Difracción de rayos X de monocristal	46
	5.3.6. Fase 4: Determinación de la solubilidad en el equilibrio de la NTZ	47
5.	Resultados y discusión	47
	6.1 Caracterización de la materia prima de Nitazoxanida	47
	6.1.1 Análisis por Espectroscopia IR de la NTZ.	48
	6.1.2 Caracterización DSC de la materia prima NTZ	50

6	6.1.3. Análisis por Difracción de Rayos X de muestras policristalinas	de la materia
p	orima NTZ	50
6	5.2. Ensayos de cristalización de la Nitazoxanida	55
6	5.3. Estudio de DRX de monocristal de Nitazoxanida	56
	6.3.1. Estudio de DRX de monocristal del Ensayo 2: E2NTZ	56
	6.3.2 Análisis de superficies de Hirshfeld del Ensayo 2: E2NTZ	65
	6.3.3 Estudio por espectroscopia IR del Ensayo 4: E4NTZ	70
	6.3.4. Estudio de DRX de monocristal del Ensayo 4: E4NTZ	71
	6.3.5 Análisis de superficies de Hirshfeld del Ensayo 4: E4NTZ	78
	6.3.6. Ensayo 10 de cristalización hidrotermal (E10NTZ)	83
6	5.4. Pruebas de solubilidad en el equilibrio	87
7.	Conclusiones	90
Ref	ferencias bibliográficas	92

## Listado de Tablas

Tabla 1 Propiedades físicas que difieren entre las formas cristalinas de un sistema polimórfic	О.
Tomado de Brittain, 2016	16
Tabla 2 Resumen de las funciones obtenidas en las superficies de Hirshfeld	34
Tabla 3 Datos cristalográficos del compuesto NTZ y los cocristales NTZ- ácido succínic	ю,
NTZ-ácido glutárico y NTZ-ácido 2,5 dihidroxibenzoico. Tomado de (Félix-Sonda et al., 201	4)
	38
Tabla 4 Lista de posibles fármacos para el tratamiento del Covid-19	11
Tabla 5 Bandas representativas de los grupos funcionales en el espectro IR de NTZ	<del>1</del> 9
Tabla 6 Soluciones de los indexados de la materia prima NTZ	51
Tabla 7 Parámetros de ajustes de los procesos WPPD	54
Tabla 8 Ensayos de cristalización de la Nitazoxanida	55
Tabla 9 Datos cristalinos de la estructura del producto E2NTZ	57
Tabla 10 Enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares presentes en la estructura cristalina d	el
E2NTZ	59
<b>Tabla 11</b> Interacciones tipo $\pi - \pi$ presentes en la estructura cristalina del E2NTZ	52
Tabla 12 Bandas representativas de los grupos funcionales en el espectro IR del ensayo 4 de la companyo de la c	de
NTZ	71
Tabla 13 Datos cristalinos de la estructura E4NTZ	72
Tabla 14 Enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares presentes en la estructura cristalina d	lel
E4NTZ	74
<b>Tabla 15</b> Interacciones tipo $\pi - \pi$ que presentes en la estructura cristalina del E4NTZ	75
Tabla 16 Bandas representativas de los grupos funcionales en el espectro IR del produc	to
hidrotermal	35
Tabla 17 Resultados de la solubilidad en el equilibrio	29

# Listado de figuras

Figura 1 Estructura molecular de la Nitazoxanida
Figura 2 Difracción de rayos X de una red cristalina que ilustra la ley de Bragg. Tomado de
(Blake et al., 2009)
Figura 3 Empaquetamiento molecular de los cristales de NTZ visto a través del eje b. Tomado
de (Bruno et al., 2010)
Figura 4 Representación esquemática de la mezcla de cocristales isomorfos NTZ. Tomado de
(Suresh et al., 2016)
Figura 5 Morfología de cristales de NTZ y cocristales NTZ-GLU, NTZ-SUC y NTZ-
25DHBA-MeCN Tomado de (Félix-Sonda et al., 2014)
<b>Figura 6</b> Estructura propuesta de los complejos NTZ M= Mn(II), Cu (II) y Zn (II), Tomado de
(Tayde et al, 2015)40
Figura 7 Materia prima Nitazoxanida
Figura 8 Espectro ATR-FTIR de la NTZ
Figura 9 Curva DSC de la materia prima de Nitazoxanida
Figura 10 Patrón de difracción de polvo de la materia prima Nitazoxanida
Figura 11 WPPD utilizando la información cristalográfica de la solución 2: a) patrón completo
y b) ampliación entre 15,8-19,0° 2θ. Nota: El patrón de polvo experimental se muestra en azul
y el patrón de polvo calculado en rojo; las flechas rojas indican los picos53
Figura 12 WPPD utilizando la información cristalográfica de la solución 3: a) patrón completo
y b) ampliación entre 18,0-31,0° 2θ. Nota: El patrón de polvo experimental se muestra en azul
y el patrón de polvo calculado en rojo; las flechas rojas indican los picos54

Figura 13 WPPD utilizando la información cristalográfica reportado en el CSD (QUZWOY):
a) patrón completo y b) ampliaciones entre 17,5-23,0° y 26,0-32,0° 2θ. Nota: El patrón de
polvo experimental se muestra en azul y el patrón de polvo calculado en rojo55
<b>Figura 14</b> Unidad asimétrica de la estructura de Nitazoxanida E2NTZ57
<b>Figura 15</b> Representación de los ejes helicoidales 21 en la estructura de la Nitazoxanida. Nota:
las flechas de color verde indican el eje helicoidal 21 paralelo al eje b58
<b>Figura 16</b> Motivo γ de la estructura del producto del ensayo 259
<b>Figura 17</b> Enlaces de hidrógenos intramoleculares presentes en la estructura60
<b>Figura 18</b> Enlaces de hidrógenos intermoleculares presentes en la estructura61
Figura 19 Interacciones entre los anillos de benceno: a) motivos en "Zig-Zag" en la proyección
a lo largo del eje c y, b) cadenas bidimensionales paralelas al eje b63
<b>Figura 20</b> Interacciones $\pi - \pi$ presentes en la estructura cristalina del material64
Figura 21 Comparación del patrón de polvo de la materia prima de Nitazoxanida (Rojo) con
el calculado usando los datos de monocristal (azul)65
Figura 22 a) E2NTZ NTZ, b) dnorm E2NTZ de NTZ66
Figura 23 Superficie de Hirshfeld (a) di y (b) de que representan las distancias entre la
superficie y los átomos cercanos
Figura 24 Shape index: (arriba) vista desde b, (abajo) vista desde b a 180°68
Figura 25 Superficie Curvatura (Curvedness) del E2NTZ de la nitaxozanida69
Figura 26 Gráficas de huellas dactilares del E2NTZ, interacciones a) O-H, b) H-H, c) C-H y
d) C-O70
Figura 27 Espectro Infrarrojo del E4NTZ de la Nitazoxanida
Figura 28 Unidad asimétrica del E4NTZ de Nitazoxanida73
<b>Figura 29</b> Enlaces de hidrógeno intramoleculares E4NTZ74
<b>Figura 30</b> Enlace de hidrógeno intermolecular del E4NTZ

$\textbf{Figura 31} \ \text{Motivo a lo largo del eje a generado por la interacción} \ Cg1 - Cg3 \ y \ Cg3 - Cg1 \ .76$
Figura 32 Motivo a lo largo del eje b generado por la interacción Cg2 – Cg2 y Cg4 – Cg4 77
Figura 33 Cadena helicoidal formada por las interacciones Cg3 – Cg1, Cg2-Cg4 y Cg2-Cg4
78
Figura 34 a) Unidad asimétrica de E4NTZ NTZ, b) Superficie dnorm E4NTZ de NTZ79
Figura 35 a) Representación di y b) de del E4NTZ de la NTZ
Figura 36 Superficie shape index del E4NTZ de la Nitazoxanida
Figura 37 Superficie Curvatura (Curvedness) de E4NTZ
Figura 38 Gráficas de huellas dactilares a) O-H, b) H-H, c) H-C y d) O-C83
Figura 39 Resultado del proceso hidrotermal
Figura 40 Espectro infrarrojo del producto hidrotermal
Figura 41 TGA-DSC del producto hidrotermal de la Nitazoxanida
Figura 42 Comparación de patrones de polvo de la Nitazoxanida y el producto hidrotermal
87
Figura 43 Espectro UV-VIS de la materia prima de Nitazoxanida
Figura 44 Curva soluciones de Nitazoxanida

#### Resumen

Título: ESTUDIO POLIMÓRFICO DE LA NITAZOXANIDA.

Autor: Juan Sebastián García Ceballos

**Palabras claves:** Nitazoxanida, cristalización, determinación estructural, difracción de rayos X, polimorfismo.

## Descripción

El polimorfismo es un campo relevante en la industria farmacéutica ya que puede afectar las propiedades en el estado sólido de un fármaco, por lo cual estudiar este fenómeno permite el desarrollo de nuevos medicamentos mediante la ingeniería de cristales.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio polimórfico de la Nitazoxanida, de los diferentes productos obtenidos en procesos de cristalización, utilizando difracción de rayos X de monocristal para su determinación estructural y posterior análisis de solubilidad en el equilibrio.

El material obtenido en el ensayo con la mezcla acetona: agua (E2NTZ), cristaliza en un sistema monoclínico con parámetros de celda a=66,9564(16) Å, b=5,36334(17) Å, c=14,5446(5) Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$ , siendo una estructura pseudosimétrica debido a que las relaciones entre los parámetros de la celda unidad corresponden a un sistema ortorrómbico pero las operaciones de simetría corresponden a un sistema monoclínico.

El sólido obtenido por la evaporación lenta de solvente en metanol (E4NTZ), cristaliza en un sistema ortorrómbico con parámetros de celda a=14,5542(2) Å, b=5,3959(1) Å, c=33,4777(4) Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$ , similar a la reportada en la base de datos CSD para el polimorfo I, indicando la transformación de fase durante este proceso. La determinación estructural del E2NTZ y E4NTZ permite establecer que la Nitazoxanida puede cristalizar en más de una forma, presentando la nueva fase una solubilidad 1,3 veces mayor.

<sup>\*</sup> Trabajo de grado

<sup>\*\*</sup> Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Jose Antonio Henao. Químico, Ph. D. Co-director: Robert Antonio Toro. Químico, Ph.D.

#### **Abstract**

Title: POLYMORPHIC STUDY OF NITAZOXANIDE.

Autor: Juan Sebastián García Ceballos\*\*\*

**Keywords:** Nitazoxanide, crystallization, structural determination, X-ray diffraction, polymorphism.

Polymorphism is of great interest in the pharmaceutical industry because it can affect the properties of a drug in the solid state. Studying this phenomenon allows the development of new drugs through crystal engineering.

The aim of this work was to conduct a polymorphic study of Nitazoxanide, of the different products obtained through crystallization processes, using monocrystalline X-ray diffraction for structural determination and their subsequent equilibrium solubility analysis.

The material obtained in the test with the acetone mixture: water (E2NTZ), crystallizes in a monoclinic system with cell parameters a=66,9564(16) Å, b=5,36334(17) Å, c=14,5446(5) Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$ , being a pseudo-symmetric structure because the relationships between the unit parameters correspond to an orthorhombic system but the symmetry operations correspond to a monoclinic system.

The solid obtained by the slow evaporation of solvent in methanol (E4NTZ), crystallizes in an orthorhombic system with cell parameters a=14,5542(2) Å, b=5,3959(1) Å, c=33,4777(4) Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$ , similar to the data reported in the CSD database for polymorph I, indicating the phase transformation during this process. The structural determination of E2NTZ and E4NTZ allows us to establish that Nitazoxanide can crystallize in more than one form, presenting the new phase a solubility 1.3 times higher.

<sup>\*</sup> Bachelor thesis

<sup>\*\*</sup> Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Jose Antonio Henao. Químico, Ph.D. Co-director: Robert Antonio Toro. Químico, Ph.D.

#### Introducción

El polimorfismo es un campo muy estudiado en la industria farmacéutica, en primer lugar porque se estima que entre el 32% al 51% de las moléculas orgánicas de bajo peso molecular (600 g/mol) pueden presentar esta propiedad (Hilfiker, 2006); algunos ejemplos de esto son la familia de los barbituratos, los cuales cerca del 70% presenta polimorfismo y las sulfonamidas 60%. Por otra parte, los polimorfos pueden afectar las propiedades del estado sólido de un medicamento, debido a que se modifican sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y farmacéuticas. Estudiar el polimorfismo es necesario en cuanto a que es un fenómeno presente en gran parte de los medicamentos y es importante para obtener información sobre el estado sólido del medicamento, del cual parten las diferentes formas de administración: oral, parenteral e inhalación; y finalmente, es un campo de estudio relevante para la mejora de propiedades intrínsecas del estado sólido de los fármacos y el desarrollo de nuevos productos mediante la ingeniería de cristales.

La Nitazoxanida (NTZ) es un agente antiparasitario de amplio espectro contra especies de protozoos como lo son *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, además se ha encontrado una efectiva inhibición en bacterias anaerobias y rotavirus. (Anderson & Curran, 2007). La Nitazoxanida es un profarmaco de la tizoxanida, que presenta baja solubilidad, permeabilidad, absorción y biodisponibilidad oral, por lo anterior es clasificada Según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (*BCS*, por sus siglas en inglés) como un medicamento clase II. Este compuesto farmacéutico es ligeramente soluble en acetona y cloroformo, muy poco soluble en metanol y prácticamente insoluble en agua, lo que conduce a una baja biodisponibilidad y velocidades de disolución variables. Hasta el 2021 solo se ha encontrado una forma polimórfica de la NTZ,

(Murthy, Khagga, & Bhavani, 2015) pero su estructura no ha sido determinada ni reportada en bases de datos cristalográficas.

Un objetivo importante en el desarrollo farmacéutico es aumentar la solubilidad y velocidad de disolución de un fármaco mientras se mantiene una estructura química estable. Según el sistema de clasificación biofarmacéutica, los principales factores que afectan la absorción oral de un medicamento son la solubilidad y permeabilidad. Una solución a este problema es encontrar posibles polimorfos del producto farmacéutico, que pueda presentar propiedades fisicoquímicas diferentes.

Considerando que una sustancia química puede tener la capacidad de existir en dos o más fases cristalinas que tienen diferentes arreglos y/o conformación de las moléculas en el cristal, y que las diferentes formas cristalinas de un mismo compuesto presentan propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas variables, los polimorfos son una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de un fármaco. Además, las formas amorfas, los polimorfos metaestables y los solvatos podrían presentar una solubilidad significativamente mayor. Por todo lo anterior, la búsqueda de polimorfos es una alternativa viable para mejorar la solubilidad y por ende la velocidad de disolución que pertenecen a las clases II del Sistema de clasificación biofarmacéutica. La Nitazoxanida es un fármaco que presenta este problema ya que es insoluble en agua  $(7,55 \times 10^{-3} \,\mu\text{g/ml})$  y a la fecha, no presenta polimorfos reportados en la base de datos cristalográficas. En consecuencia, encontrar y caracterizar un polimorfo de esta molécula que pueda tener una mejora en su solubilidad tendría ventajas en el desarrollo de una formulación.

En este trabajo se caracteriza la materia prima de la Nitazoxanida, posteriormente se cristaliza utilizando diferentes procesos de cristalización. Cada uno de los productos obtenidos se caracteriza por IR, TGA-DSC, DRX de polvo y DRX de monocristal y se realiza la

determinación estructural de dos cristales. Finalmente, se realizan pruebas de solubilidad en el equilibrio.

## 1. Hipótesis

Al someter la Nitazoxanida a diferentes procesos de cristalización, se pueden obtener modificaciones cristalinas de este compuesto farmacéutico con posibles mejoras de su solubilidad en medio acuoso.

## 2. Objetivos

## 2.1 Objetivo general

Obtener polimorfos de la Nitazoxanida bajo diferentes condiciones de cristalización.

## 2.2 Objetivos específicos

- **2.2.1** Caracterizar la materia prima Nitazoxanida.
- **2.2.2** Cristalizar la Nitazoxanida por diferentes métodos de cristalización.
- **2.2.3** Caracterizar los polimorfos obtenidos en cada proceso.
- **2.2.4** Realizar pruebas de solubilidad a los polimorfos obtenidos de la Nitazoxanida.

#### 3. Marco teórico

### 3.1 Polimorfismo

El término polimorfismo proviene del griego (poli=muchas, morph=formas) y se refiere, en el campo de la cristalografía, a la capacidad que posee un compuesto orgánico o inorgánico para cristalizar en más de un arreglo cristalino en el estado sólido. McCrone (1965) define un polimorfo como "una fase cristalina sólida de un compuesto dado que resulta de la posibilidad de al menos dos arreglos diferentes de las moléculas de dicho compuesto en el estado cristalino" (Bernstein, 2002). Las diferencias en el empaquetamiento molecular ocasionan diferencias en las propiedades físicas de las fases cristalinas. Por esta razón, los diversos polimorfos de una estructura química suelen presentar diferencias en sus comportamientos fisicoquímicos como densidad, higroscopicidad, velocidad de disolución, estabilidad térmica, solubilidad y comportamiento de suspensión, entre otros, como se observa en la Tabla 1.

**Tabla 1**Propiedades físicas que difieren entre las formas cristalinas de un sistema polimórfico.

Tomado de Brittain, 2016

Propiedades		
	Volumen molar y densidad	
Empaquetamiento	Índice de refracción	
Linpaquetaimento	Higroscopicidad	
	Conductividad térmica y eléctrica	
	Dureza	
Tecnológicas	Compactación	
_	Velocidad de flujo	
	Temperatura de fusión y sublimación	
	Energía interna o estructural	
	Entropía	
Termodinámicas	Entalpía	
	Capacidad calorífica	
	Energía libre y potencial químico	
	Presión de vapor	

Solubilidad

Transiciones de estados electrónicos
Espectroscópicas
Transiciones de estado vibraciones

Transiciones de estado de spin nuclear

Velocidad de disolución

Cinéticas Velocidad de reacciones de estado sólido

estabilidad

Energía libre de superficie Tensiones interfaciales

Habito cristalino

Dureza

**Mecánicas** Maleabilidad

**Superficiales** 

Compactibilidad

No se ha establecido un sistema internacional para nombrar polimorfos, aunque normalmente se utiliza el número romano I para identificar a la forma polimórfica que presenta mayor punto de fusión, la cual es generalmente más estable y menos soluble. De este modo, las formas menos estables se nombran con los números II, III, IV, entre otros. Por otra parte, algunos polimorfos se nombran con las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  según el orden de descubrimiento (Sánchez, Jung, Yépez, & Hernández-Abad, 2007).

El polimorfismo en los medicamentos es un aspecto importante ya que estadísticamente más del 50% de los compuestos farmacéuticos cristaliza en más de una forma cristalina (Raza *et al.*, 2014). Aunque el polimorfismo no se puede predecir, se ha observado una tendencia en algunos grupos de fármacos, por ejemplo, Reffer & Ferillo (1988) indican que "el 70% de los barbituratos de uso actual presentan polimorfismo y el 65% de las sulfonamidas"(Reffner & Ferrillo, 1988). Posteriormente, Girón (1995) publica una lista de casi 600 medicamentos de uso común que presentan polimorfos (Giron, 1995). Esta característica, en la mayoría de los casos, afecta propiedades fisicoquímicas como punto de fusión, presión de vapor, grado de higroscopicidad, estabilidad química y solubilidad, desencadenando diferencias en las propiedades farmacocinéticas como la biodisponibilidad y velocidades de disolución, un ejemplo es el fármaco Mebendazol el cual posee tres polimorfos identificados como A, B y C

(Rodriguez-Caabeiro et al., 1987), y presentan propiedades fisicoquímicas y bioquímicas diferentes. El polimorfo de uso comercial es la forma C, ya que presenta mayor solubilidad acuosa (De Villiers et al., 2005). La forma C a 180 °C presenta una transición hacia la forma A.

### 3.2 Nitazoxanida

La Nitazoxanida (NTZ) es un agente antiparasitario de amplio espectro, sintetizado en 1980 por Jean Francer en el Instituto Pasteur. Se distribuye principalmente bajo los nombres comerciales de Alinia®, Daxon®, Dexidex®, Paramix®, Kidonax®, Colufase®, Annita® y se utiliza principalmente para tratar la diarrea asociada a infecciones gastrointestinales. La FDA aprobó este compuesto para el tratamiento de este tipo de afecciones causadas por *Cryptosporidium Parvum* y *Giardia Lamblia* desde el 2002, para ser suministrada a niños de entre 1-11 años (Sweetman, 2009) (Martindale, 2009). Además de ser activa en contra de protozoos, también es utilizada para el tratamiento de helmintos, infecciones bacterianas y virales en niños, adultos, pacientes inmunocomprometidos incluyendo aquellos con VIH, enfermedades de rotavirus y colitis por *Clostridium difficile* (Anderson & Curran, 2007; Fox & Saravolatz, 2005). En adición, es activo contra el *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) y Leishmania mexicana, el patógeno causante de úlceras *Helicobacter pylori* (Bruno *et al.*, 2010). Estructuralmente, la Nitazoxanida es un derivado de nitrotiazolil-salicilamida, como se observa en la ¡Error! No se encuentra el o rigen de la referencia..

La Nitazoxanida se administra en forma de tabletas y suspensión oral ingerida con la comida y las dosis varían entre 100 y 500 mg según niños o adultos. Después de ser ingerida, es absorbida en el tracto gastrointestinal y se hidroliza rápidamente a su forma desacetilada, la tizoxanida (Sweetman, 2009).

Figura 1

Estructura molecular de la Nitazoxanida

$$O = N^{\frac{1}{2}}$$

S

O

CH<sub>3</sub>

### 3.3 Crecimiento de cristales.

El crecimiento de un cristal puede verse como una transformación de una fase líquida o vapor al estado sólido, cuando un cristal se encuentra en un equilibrio dinámico con su fase madre, la energía libre es mínima y no se produce el crecimiento. Cambios de temperatura, presión, pH, agitación, potencial químico, potencial electroquímico perturban el equilibrio y favorecen a la formación de cristales en el estado sólido (Dhanaraj *et al.*, 2010).

## 3.4 Técnicas de cristalización

Existen diferentes métodos de cristalización para la obtención de polimorfos, los cuales serán descritos a continuación:

## 3.4.1 Cristalización a partir de un solvente o mezcla de solventes.

En el proceso de cristalización con un único solvente se prepara una solución mezclando el compuesto a temperatura ambiente o en calentamiento hasta completa disolución, después se enfría gradualmente o rápidamente según se requiera. En este proceso intervienen factores como concentración del fármaco, cantidad del solvente, el calentamiento de la solución, agitación, pH, grado de sobresaturación y velocidad de enfriamiento (Tandon *et al.*, 2018).

La selección del solvente juega un papel crucial ya que la polaridad del solvente influye en el proceso de cristalización. Además, en algunos casos, la naturaleza del solvente favorece la formación de enlaces de hidrogeno, y en consecuencia de agregados moleculares. Se han clasificado solventes orgánicos de acuerdo a parámetros como tendencia donor/aceptor de enlaces de hidrogeno, viscosidad, tensión superficial, momento dipolar, constante dieléctrica y densidad de energía cohesiva (Gu *et al.*, 2004). Esta clasificación es de ayuda en el momento de seleccionar un solvente orgánico.

El uso de más de un solvente se utiliza cuando no se obtiene un polimorfo con el proceso descrito anteriormente. El método utiliza una disolución en dos o más solventes donde el compuesto se solubiliza en el solvente de mayor presión de vapor. Ya que la evaporación de ambas sustancias es diferente, la composición de la solución cambia con el tiempo por lo que el compuesto tendrá que interactuar consigo mismo, es decir aglomerarse, a medida que el volumen de la solución disminuye.

## 3.4.2 Adición de antisolvente

Esta metodología de cristalización es bastante usada en el desarrollo farmacéutico y consiste en agregar un segundo líquido a la solución que contiene la sustancia de interés a cristalizar; este líquido debe ser miscible con el solvente, pero la sustancia a cristalizar debe ser insoluble

o muy poco soluble. De esta forma se reduce la actividad del solvente puesto que como el sólido resulta menos soluble en la mezcla solvente-antisolvente, se favorece la cristalización (Cains, 2009). En este proceso se debe tener la precaución de añadir poca cantidad de antisolvente, de forma gradual, puesto que de otro modo podría ocasionar la precipitación de la sustancia y generar una forma metaestable.

## 3.4.3 Cristalización en medios gelificados

El método de crecimiento en gel se utiliza para preparar una amplia variedad de cristales inorgánicos, orgánicos y proteínas. El gel proporciona un medio en el que se transporta masa mediante el proceso de difusión lenta de moléculas o iones en una región en la que puede reaccionar durante el proceso de cristalización, las variaciones del tamaño de los cristales pueden variar desde unos micrones hasta milímetros, esto depende, como en otros métodos de cristalización, según el sistema de estudio. Los medios gelificados generalmente que se utilizan son gel de silicato, agar (derivado de algas) y gelatina (Nishinaga, 2014). Los cristales se pueden crecer en gel en diferentes técnicas como lo son; método reacción química, método reducción química, método de reducción de solubilidad y método de dilución de complejos químicos (Henisch, 1996).

En el método de reducción de la solubilidad, se emplea para el crecimiento de cristales de sustancias insolubles en agua. Las sustancias a cultivar se disuelven en un solvente y se prepara la solución de gel en base acuosa después de la gelificación, se agrega el gel a un tubo de ensayo, y se adiciona la solución del solvente con el analito a cristalizar, al entrar en contacto se reduce la solubilidad poco a poco del analito sobre el gel fraguado para iniciar la cristalización.

Los medios gelificados de agarosa se utilizan procedimientos de cristalización, por el proceso de difusión, a continuación, se describe el procedimiento de preparación del gel (Gallardo, 2006).

- Se pesa 0.1 g de agar y se agrega en un vaso 100 ml de solución de trabajo (agua)
- Se calienta la solución en baño de agua y se agita a 250 rpm hasta completa disolución.
- Se deja de agitar y se agrega a un tubo de ensayo la cantidad de gel y se deja enfriar.
- Se agrega la solución con el analito y se tapa.

## 3.5 Técnicas de caracterización

A continuación, se presentan algunas de las principales técnicas que se emplean para la caracterización de polimorfos.

### 3.5.1 Espectroscopia IR

La espectroscopia infrarroja ampliamente utilizada en la caracterización física de solidos de interés farmacéutico, el fundamento físico es la medición de los modos vibraciones de los enlaces de los átomos, en la región de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, un espectro infrarrojo puede ser considerado una huella dactilar del compuesto farmacéutico. Este se puede comparar con los reportados en las bases de datos. La espectroscopia infrarroja es útil cuando el empaquetamiento de una molécula de interés afecta las frecuencias de los modos vibracionales en relación con las energías de los modos de una la molécula en estado libre, estos cambios en los espectros se pueden utilizar como un medio para estudiar la química del estado sólido del compuesto. Los cambios en la conformación molecular entre diferentes formas dan como resultado diferencias en los espectros de absorción y pueden ser utilizados para evaluar el

espacio polimórfico de una sustancia farmacéutica. Los espectros IR de diferentes polimorfos exhiben diferencias en algunos compuestos que demuestran en bandas particulares, que pueden, proporcionar marcadores distintivos para la caracterización polimórfica.

## 3.5.2 Espectroscopia UV- VIS

La espectroscopia UV-VIS es usada en el campo de la industria farmacéutica para estudios de solubilidad y disolución de compuestos como moléculas orgánicas, sales, hidratos y polimorfos. El principio básico detrás de la espectroscopia UV-VIS es la absorción de radiación (180-800 nm) se asocia con la excitación de electrones, tanto en átomos como en moléculas, desde niveles de energía más bajos a más altos. (Cuesta & Meneses, 2015).

### 3.5.3 Análisis térmico TGA-DSC

La técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) detecta las variaciones en la energía térmica al calentar o enfriar una muestra. El principio básico detrás del cambio en el grafico DSC, es la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y un patrón de referencia en función de la temperatura y el tiempo, el cual se altera debido un evento térmico (Hilfiker, 2006).

Este fundamento sencillo permite diferenciar las formas polimórficas puesto que las fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno difieren entre polimorfos debido al cambio en la estructura cristalina y, por lo tanto, se observarán diferencias en el punto de fusión y el comportamiento del cambio de fase (Namatame & Sato, 2013).

El análisis termogravimétrico relaciona la pérdida de masa de una muestra en función de la temperatura y el tiempo, utilizando una balanza de alta precisión, es una técnica muy útil para el estudio de hidratos y solvatos, ya que permite diferenciar las diferentes maneras en las que

se puede asociar el agua con compuestos sólidos. En los hidratos, el agua es incorporada en la red cristalina (Brittain, 2016).

## 3.5.4 Difracción de rayos X

Las técnicas de difracción de rayos X comprenden la difracción de rayos X de polvo y la difracción de rayos X de monocristal. De manera general se basan en el fenómeno de difracción de los rayos X el cual consiste en la dispersión coherente del haz de rayos X a través de la estructura cristalina de un material teniendo en cuenta que la longitud onda de los rayos X es de magnitud similar a la distancia de separación de los átomos en un cristal. Este fenómeno es de gran utilidad en materiales cristalinos puesto que una característica distintiva es la repetición periódica y regular de los átomos y moléculas en las tres dimensiones (Giacovazzo *et al.*, 1998).

Al ocurrir la dispersión coherente, que puede ser vista como una colisión completamente elástica, el fotón dispersado tiene la misma fase y energía que el fotón incidente. Además, resulta una onda esférica debido a la naturaleza dual de los rayos X. Por ende, como anteriormente se mencionó, la repetición periódica de los átomos y moléculas en los sólidos cristalinos posibilita que la relación de fases entre las ondas dispersadas sea periódica y se obtenga un patrón de interferencia entre ellas. Así, las ondas dispersadas después de interactuar con los átomos del material cristalino van a interferir de forma destructiva o constructiva, y al final se obtendrá un patrón de difracción característico para el material (Blake et al., 2009).

Es importante resaltar que una propiedad importante de los materiales cristalinos es la repetición periódica y regular de átomos y moléculas en las tres dimensiones de modo que se puede representar como una red formada de paralelepípedos elementales de igual tamaño. Para representar el empaquetamiento de los átomos de forma simple puede ser representada en una

celda unidad, la porción más pequeña en el espacio que reproduce la repetición periódica al aplicarle una serie de operaciones geométricas de simetría (Hammond, 2001).

La ley de Bragg aporta las condiciones geométricas bajo las cuales se puede observar un haz difractado por la estructura cristalina ver Figura 2. Se consideraron los materiales cristalinos como capas o planos de átomos que se comportan como planos de reflexión, de modo que se produzcan haces reflectados cuando la diferencia de camino entre un grupo de planos sucesivos es igual a un número entero de longitudes de onda, de acuerdo con:

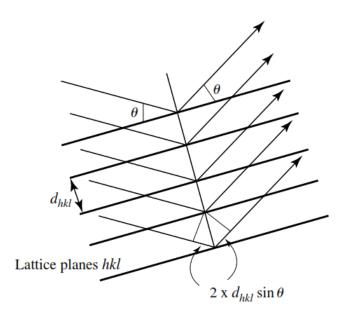
$$n\lambda = 2d_{hkl}sen\theta$$

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X, n el orden de reflexión,  $d_{hkl}$  es la distancia interplanar y  $\theta$  es el ángulo de incidencia y reflexión (Blake et al., 2009).

Los planos cristalográficos se representan utilizando indices de Miller hkl. De esta forma los planos que son paralelos se identifican por los mismos índices de Miller y se encuentran separados entre sí una distancia  $d_{hkl}$  (Blake et al., 2009).

Figura 2

Difracción de rayos X de una red cristalina que ilustra la ley de Bragg. Tomado de (Blake et al., 2009)



En la difracción de rayos X de un material cristalino cada átomo de la celda unidad contribuye en el patrón de difracción. De esta forma, la combinación de las ondas producidas por cada uno de los átomos se representa por el factor de estructura F(hkl), conocida como la transformada de Fourier que relaciona la estructura cristalina con la red recíproca.

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^{N} f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

Donde  $f_j$  es el factor de dispersión atómica;  $x_j$ ,  $y_j$ ,  $z_j$  son las coordenadas fraccionarias del átomo j; N es el número de átomos de la celda; los números hkl son los índices para una reflexión particular que ocurre en cierta dirección. El factor de estructura de cada haz difractado tiene una amplitud |F(hkl)| y una fase relativa  $\varphi(hkl)$  expresada como  $2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)$ . Estos resultados se pueden relacionar con el volumen de la unidad de celda para obtener la densidad electrónica. No obstante, experimentalmente las intensidades de los haces medidas

solo proporcional la amplitud de los factores de estructura y no las fases; esto se conoce como el problema de la fase.

Al comparar las dos técnicas principales de difracción de rayos X se observa que la naturaleza de la muestra es la diferencia principal y esto produce diferentes metodologías en el tratamiento de la muestra, el método de medición de datos, el equipo utilizado y la forma del patrón de difracción. No obstante, los patrones de difracción de polvo y de monocristal albergan de manera esencial la información necesaria para la determinación pues el método físico de difracción de rayos X explicado anteriormente es el mismo. De este modo, a continuación, se mencionan los procedimientos generales en cada una de las técnicas para realizar la determinación estructural.

## 3.5.5. Determinación estructural a partir del cristal único

Después de realizar la toma de datos experimentales se realiza la integración (determinación de los parámetros de celda) y reducción de los datos (determinación del grupo espacial). En la determinación del grupo espacial se evalúan las ausencias sistemáticas generadas a partir de las condiciones de simetría y de reflexión permitidas para familias de planos *hkl*, como resultado se obtiene una lista de grupos espaciales, para finalmente encontrar el grupo espacial apropiado que se corresponde con los datos obtenidos.

La determinación de las posiciones de los átomos en la celda unidad requiere las fases de onda difractadas, lo que se conoce como el problema de la fase. Para resolver esta situación, en cristalografía se utilizan dos herramientas matemáticas diferentes: la función de Patterson y los métodos directos.

La función de Patterson modifica la ecuación de densidad electrónica en función de la posición relativa entre pares de átomos por lo cual permite obtener una estructura parcial que permite calcular las fases de los factores de estructura usando la transformada de Fourier directa

y verificar los resultados entre la comparación de los factores de estructura observados y los calculados; la repetición de este proceso permite completar la estructura (Blake et al., 2009).

Los métodos directos utilizan varios métodos matemáticos que, de manera general, recuperan información sobre las fases contenida en las intensidades registradas, solucionar las probables relaciones entre las fases y posteriormente probar con fases posibles para satisfacer condiciones de probabilidad que se verifican al calcular las transformadas de Fourier con las amplitudes y las fases ya resueltas (Blake et al., 2009).

## 3.5.6. Refinamiento estructural

El paso anterior proporciona las coordenadas x, y, z para cada átomo de la unidad asimétrica del cristal. Sin embargo, los métodos matemáticos de determinación de la estructura cristalina generan errores que deben ser resueltos en este paso. El método más utilizado es el método de mínimos cuadrados, que calcula la suma de los cuadraros de los errores entre los valores de estructura observados y los valores de estructura calculados. Entonces, los llamados "Factores R" evalúan la convergencia de un modelo estructural propuesto con la realidad, para que esto suceda, es necesaria la correspondencia entre el patrón de difracción observado y el calculado.

$$R = \frac{\sum ||Fo| - |Fc||}{\sum |Fo|}$$

$$wR_2 = \sqrt{\frac{\sum w(Fo^2 - Fc^2)^2}{\sum w(Fo^2)^2}}$$

Donde Fo y Fc son los valores de estructura observados y calculados, respectivamente y el subíndice 2 indica que los factores de estructura están elevados al cuadrado. También es importante señalar que el valor w se refiere a la función de peso estadístico que se adiciona a cada reflexión para corregir el error de la exactitud en las reflexiones medidas. El programa SHELXL (Sheldrick, 2015a) usa la siguiente función de peso estadístico:

$$w = 1/(\sigma^2(F_o^2) + (a P)^2 + b P) \qquad (P = \frac{1}{3}\max(0, F_o^2) + \frac{2}{3}F_c^2)$$

Donde los parámetros a y b son escogidos para minimizar las diferencias de varianza en los diferentes rangos de intensidad y del ángulo de difracción.

Otro factor de evaluación del modelo estructural propuesto es conocido como bondad de ajuste "S" y se define como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum [w(Fo^{2} - Fc^{2})^{2}]}{(n-p)}}$$

Donde n es el número de reflexiones y p el número de parámetros refinados.

Una estructura se considera satisfactoria cuando el valor de wR<sup>2</sup> se encuentra por debajo de 0.15 (15 %) y S es cercano a 1.

Al finalizar este paso, se suman a las posiciones atómicas los respectivos valores de desviación estándar, los factores de ocupación térmica y los parámetros térmicos. En consecuencia, se pueden calcular las distancias de enlace entre los átomos, los ángulos de enlace, ángulos de torsión, las distancias intermoleculares de la estructura cristalina. A partir de allí, una vez determinada y refinada la estructura, se grafican e interpretan los resultados para establecer características, patrones, analizar la forma en que interactúa la estructura cristalina y realizar deducciones de la geometría observada (Blake et al., 2009)

## 3.5.7. Determinación estructural a partir del patrón de polvo

La determinación estructural a partir de un patrón de polvo se lleva a cabo mediante el siguiente procedimiento:

- 1. Determinación de los parámetros de la celda unidad
- 2. Asignación del grupo espacial por ausencias sistemáticas
- 3. Descomposición del patrón de polvo por intensidades integradas, *I*<sub>hkl</sub>

- 4. Determinación de la estructura cristalina
- 5. Refinamiento de la estructura por el método de Rietveld
- 6. Validación de la estructura cristalina

## 3.5.8. Indexado de un patrón de polvo.

El proceso de indexado es la primera etapa para determinar los parámetros de una celda unidad a partir de un patrón de difracción de polvo, en el cual se busca reproducir la posición de todos máximos del patrón registrado, de forma similar a como se realiza en monocristal. El objetivo del indexado es la reconstrucción geométrica del espacio recíproco tridimensional a partir de la distribución unidimensional de los valores **d** (distancia interpelaran) observados. Para esto se utilizan programas y métodos computacionales tales como DICVOL(Louër & Boultif, 2014), TREOR (Altomare *et al.*, 2000) e ITO (Visser, 1969), cada uno con sus respectivos procesos matemáticos, que al final permiten asignar los valores de *hkl* a cada reflexión en el patrón de polvo y a partir de allí obtener los parámetros de la celda unidad  $(a,b,c,\alpha,\beta y \gamma)$ . Para validar los resultados obtenidos en el indexado se utilizan factores de discrepancia, llamados comúnmente figuras de mérito.

La figura de mérito  $F_N$  es definida por Smith & Snyder (1979) en la siguiente expresión matemática:

$$F_N = \frac{N}{N_{poss}} \cdot \frac{1}{|\Delta 2\theta|} = \frac{N^2}{N_{poss} \sum_{i=1}^{N} |2\theta_i^{obs} - 2\theta_i^{cal}|}$$

Donde N es el número de máximos de difracción observados,  $N_{poss}$  es el número posible de máximos de difracción independientes en el rango experimental medido,  $\overline{|\Delta 2\theta|}$  es la diferencia absoluta media entre valores  $2\theta$  observados y calculados.

La figura de mérito M<sub>20</sub> propuesta por Wolff se define en la siguiente expresión matemática:

$$M_{20} = \frac{1}{N_{poss}} \cdot \frac{Q_{20}}{2|\overline{\Delta\theta}|} = \frac{10Q_{20}}{N_{poss}\sum_{i=1}^{20}|Q_i^{obs} - Q_i^{cal}|}$$

Donde,  $N_{poss}$  tiene el mismo significado que en  $F_N$ , excepto que se calcula para un  $\theta_{Max}=\theta_{20}$ , es decir, el número de puntos simétricamente independientes en la red reciproca hasta los 20 picos de Bragg observados;  $Q=d^{*2}=\frac{1}{d^2}$  representa el cuadrado de la longitud del vector recíproco;  $Q_{20}$  es el valor Q correspondiente a los 20 picos de Bragg observados  $y|\overline{\Delta\theta}|=\frac{1}{20}\sum_{i=1}^{20}|\delta Q_i|=\frac{1}{20}\sum_{i=1}^{20}|Q_i^{obs}-Q_i^{cal}|$  es la diferencia absoluta promedio entre los  $Q_{hkl}$  observada y calculada para los 20 primeros picos de Bragg.

### 3.5.8.1. Asignación del grupo espacial

La determinación del grupo espacial se lleva cabo analizando la información obtenida en el indexado y los índices (*hkl*), de forma similar a como se realiza en monocristal.

## 3.5.8.2. Descomposición del patrón de polvo por intensidades integradas, Ihkl

En este paso, determinante para la solución de la estructura cristalina, se extraen las intensidades integradas del patrón de difracción. Una de las principales dificultades es la pérdida de información del patrón de polvo, que ocurre por el solapamiento de las reflexiones de Bragg al pasar del espacio recíproco de tres dimensiones a un patrón de difracción de una dimensión. Para solucionar el problema del solapamiento de reflexiones, una de las técnicas más utilizadas es el método de Le Bail, de acuerdo con el método original propuesto por Rietveld, que indicaba que la suma de las áreas de los picos solapados evaluados era igual al área de la radiación de fondo de los picos de Bragg. De esta forma se aproximaba a las magnitudes de los factores de estructura. Le Bail extendió el método de Rietveld para determinar los factores de estructura cuando no se conoce la estructura del material, suponiendo

que las áreas integradas son iguales inicialmente (David *et al.*, 2002). De modo que se dividen los picos de Bragg observados entre las reflexiones calculadas de forma proporcional a sus intensidades en un proceso cíclico hasta ajustar los parámetros de la celda unidad, el error instrumental del cero  $2\theta_{zero}$ , los parámetros del ancho del pico U, V,W y otros parámetros de forma de pico  $\eta$ , x, y y.

### 3.5.8.3. Refinamiento de la estructura por el método de Rietveld

El proceso del refinamiento por el método de Rietveld se basa en minimizar mediante minimos cuadrados la diferencia entre el patrón calculados y el experimental. La expresión matemática que representa la intensidad en cada proceso del refinamiento de Rietveld, está dada por la siguiente expresión:

$$Y_c = Y_b + \sum Y_{hkl}$$

En la ecuación se tiene tanto la contribución del ruido de fondo  $Y_b$  y las reflexiones de de Bragg ( $Y_{hkl}$ ) del patrón de polvo y esta parametrizada por la estructura cristalina (coordenadas atómicas, desplazamiento térmico y sitios de ocupación) como por los parámetros experimentales. El patrón de difracción se genera mediante técnicas de conteo de partículas (fotones de rayos X o de neutrones) que poseen una distribución normal, en consecuencia, el número de picos de Bragg observados en el perfil excede el número de parámetros y deben ser minimizados, en ese caso por mínimos cuadrados:

$$M = \sum w \cdot (Y_o - Y_c)^2$$

El método proporciona estimaciones de parámetros de varianza mínima en cualquier composición lineal. El peso *w* se calcula a partir de la varianza de las intensidades observadas

*Yo*, generalmente se asume que no hay covarianzas distintas a cero entre los diferentes *Yo* del patrón de difracción de polvo. La intensidad del perfil de polvo calculado, *Yc*, se expresa con la siguiente ecuación:

$$Y_c = K|F_h|^2 H(\Delta T_h)$$

En esta expresión K es el producto de diversos factores de corrección, el factor de estructura  $|F_h|^2$  y el valor de la función del perfil  $H(\Delta Th)$  para cada una de las posiciones de las reflexiones de Bragg. El método consiste en aproximar la expresión de  $Y_c$  como una serie de Taylor.

Hasta el momento el método Rietveld, es una de las mejores herramientas en el estudio de materiales policristalinos, resolviendo con todo lo mostrado anteriormente la falta de información inherente de los patrones de polvo.

#### 3.5.8.4. Validación de la estructura cristalina

La validación de la estructura cristalina se puede realizar con el programa checkCIF/Platon un servicio disponible en línea en la página de la Unión Internacional de Cristalografía (IUCr por sus siglas en ingles). La función del programa Platon consiste en probar los datos del archivo CIF para verificar su integridad, calidad y consistencia, en el proceso se buscan análisis incompletos, errores y problemas relevantes que deben ser verificados, esto da como resultado un informe de validación que contiene una lista de alertas con problemas que deben corregirse.

### 3.6. Superficie de Hirshfeld

La superficie de Hirshfeld pueden ser generadas y visualizadas con el programa CrystalExplorer (Mackenzie *et al.*, 2017), se exploran, analizan y cuantifican las diversas

interacciones intra e intermoleculares de una estructura. El análisis de superficies de Hirshfeld nace en un intento de combinar las herramientas de análisis utilizadas en la cristalografía e ingeniería de cristales y de profundizar el entendimiento de las interacciones intermoleculares contextualizadas en el material cristalino por completo y no solo en enlaces puntuales. A pesar que la técnica se puede comparar con algunas otras representaciones moleculares por ejemplo las esferas difusas de Van der Waals, la superficie de Hirshfeld se realiza no solo a partir de la molécula de forma individual sino de la cercanía de los vecinos por lo cual revela información importante sobre las interacciones intermoleculares (Spackman & Jayatilaka, 2009).

Los resultados que se pueden obtener del análisis de las superficies de Hirshfeld se resumen en la siguiente tabla:

 Tabla 2

 Resumen de las funciones obtenidas en las superficies de Hirshfeld

Símbolo	Función
y definición	
de	Distancia desde un punto de la superficie al núcleo más cercano fuera de la superficie.
di	Distancia desde un punto de la superficie al núcleo más cercano dentro de la superficie.
$S = \frac{2}{\pi} * \arctan(\frac{\kappa_1 + \kappa_2}{\kappa_1 - \kappa_2})$	Shape index, es un medida de las depresiones y protuberancias definidas según las curvaturas principales $\kappa_1$ y $\kappa_2$ .
$C = \frac{2}{\pi} \ln \sqrt{\kappa_1^2 + \kappa_2^2/2}$	Curvedness es una medida que mapea las zonas planas y bordes pronunciados, definidas en términos de la raíz cuadrada de
$d_{norm} = \frac{d_i - r_i^{vdw}}{r_i^{vdw}} + \frac{d_e - r_e^{vdw}}{r_e^{vdw}}$	las curvaturas principales $\kappa_1$ y $\kappa_2$ .  Distancia normalizada de contacto, definidas en términos de <i>di</i> , <i>de</i> y los radios de van der Waals.

## 5.8 Ensayos de solubilidad

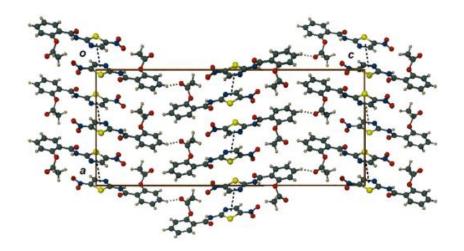
Una técnica ampliamente utilizada para el estudio de solubilidad es *The shake-flask method* (método de matraz de agitación) el cual comprende los siguientes pasos generales: (1) se prepara la muestra, (2) se lleva al equilibrio por 24 horas con el solvente de interés, (3) separación de las fases, (4) análisis de la solución saturada y (5) interpretación de datos (Veseli, *et al.*, 2019). En esta investigación se utilizó la técnica de espectroscopia UV-VIS para la determinación de la solubilidad en el equilibrio; la solubilidad se alcanza cuando se obtiene la misma solubilidad aparente en diferentes periodos de tiempo, y el equilibrio se obtiene frecuentemente a las 24 horas.

### 4. Antecedentes

El primer reporte estructural por difracción de rayos X de monocristal desde que se publicó la patente de la síntesis de la Nitazoxanida (Rossignol & Cavier, 1976), fue realizado por Bruno *et al.* (2010). En este estudio se llevó a cabo la determinación estructural por monocristal de la forma I de la Nitazoxanida, reportando que el API cristaliza como un tautómero de carboxamida en un sistema cristalino ortorrómbico, con grupo espacial  $Pna2_1$  y parámetros de celda de a = 14.302(2) Å, b = 5.2800(8) Å, c = 33.183(5) Å, V = 2505.8(6) Å<sup>3</sup>. En el empaquetamiento de la molécula, descrito en **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se observan interacciones intermoleculares de enlaces de hidrogeno C-H-O e interacciones entre anillos vecinos de tiazol, no obstante, no se realizaron ensayos de biodisponibilidad o solubilidad (Bruno et al., 2010).

Figura 3

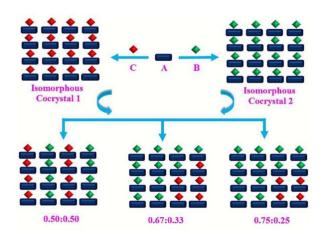
Empaquetamiento molecular de los cristales de NTZ visto a través del eje b. Tomado de (Bruno et al., 2010)



La Nitazoxanida ha sido estudiada ampliamente para mejorar su solubilidad tratando de obtener solvatos, hidratos, cocristales, complejos metálicos y polimorfos. Entre ellos destaca la única publicación en la base de datos cristalográfica del *Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)* (Suresh *et al.*, 2016), donde se reportan 2 isomorfos cocristales de Nitazoxanida, con ácido p-aminosalicílico (PASA) y ácido p-aminobenzoico (PABA), en relación estequiometria 1:1 y también se realizaron estudios de diferentes composiciones de mezcla de cocristales NTZ-PASA:NTZ-PABA en relaciones [0,75:0,25] y [0,67:0,33] (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), estas mezclas de cocristales abren la posibilidad de estudiar una nueva clase de sólidos farmacéuticos que pueden tener mejoras en las propiedades fisicoquímicas de los fármacos. Este articulo referencia el estudio realizado por Félix-Sonda *et al.* (2014), en el cual se ensayaron 32 sustancias orgánicas como generadores de cocristales de NTZ.

Figura 4

Representación esquemática de la mezcla de cocristales isomorfos NTZ. Tomado de (Suresh et al., 2016)



Únicamente con el ácido succínico y ácido glutárico se produjeron cocristales, mientras que con el ácido 2,5 dihidroxibenzoico se produjo un cocristal solvatado, los hábitos cristalinos de estos cocristales se observan en la Figura 5 y el reporte se encuentran en la Tabla 3. En los ensayos de solubilidad se encontró un ligero aumento en esta propiedad en los cocristales formados con respecto a la Nitazoxanida.

Figura 5

Morfología de cristales de NTZ y cocristales NTZ-GLU, NTZ-SUC y NTZ-25DHBA-MeCN

Tomado de (Félix-Sonda et al., 2014)

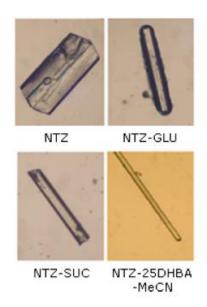


Tabla 3

Datos cristalográficos del compuesto NTZ y los cocristales NTZ- ácido succínico, NTZ-ácido glutárico y NTZ-ácido 2,5 dihidroxibenzoico. Tomado de (Félix-Sonda et al., 2014)

Datos critalograficos	NTZ	NTZ-SUC (2:1)	NTZ-GLU (1:1)	NTZ-25DHBA- CH3CN (1:1)
Formula	$C_{12}H_9N_3O_5S$	$\begin{array}{c} 2 \ C_{12} H_9 N_3 O_5 S \\ \cdot C_4 H_6 O_4 \end{array}$	$C_{12}H_{9}N_{3}O_{5}S$ $\cdot C_{5}H_{8}O_{4}$	$C_{12}H_9N_3O_5S$ $\cdot C_7H_6O_4\cdot CH_3CN$
Masa (g mol) Grupo	307.28	366.33	439.40	502.45
espacial	Pna2 <sub>1</sub>	$P2_1/c$	$P2_1/c$	P ī
a (Å)	14,302(2)	16,770(5)	12,370(4)	7,5051(14)
b (Å)	5,2800(8)	5,0216(15)	5,0586(15)	11,468(2)
c (Å)	33,183(5)	23,582(8)	31,715(9)	13,694(2)
α (°)	90	90	90	83,123(3)
β (°)	90	128,077(6)	94,495(6)	84,660(3)
γ (°)	90	90	90	82,833(4)
$V(\mathring{A}^3)$	2505(8)	1563,2(8)	1978,5(10)	1157,3(4)
Z(Z')	8 (2)	2 (0,5)	4(1)	2 (1)
μ (mm <sup>-1</sup> )	0,286	0,253	0,220	0,200

ρcalcd (g cm <sup>-</sup>				
3)	1,628	1,557	1,475	1,442
Rc,d	0,0307	0,0743	0,0699	0,0657
Rw(e,f)	0,0799	0,1658	0,1637	0,1328
GOF	1,046	1,085	1,018	1,037

En algunos estudios no reportados de complejos de Nitazoxanida se realizó una síntesis con metales de transición Mn(II), Fe(III), Cu(II) y Zn(II) (Tayde, Sarwade, Jadhav, & Khade, 2015). En este caso particular, la síntesis se realizó disolviendo la Nitazoxanida en etanol y adicionando la solución de las sales en etanol de los metales anteriormente mencionados a un sistema de reflujo con agitación continua y temperatura de 80 °C, con una relación 1:2 de NTZ/solución de sales, Se caracterizaron los productos por IR, UV-VIS, DRX polvo y TGA, y a través del estudio, los autores proponen que la Nitazoxanida se coordina octaédricamente con los metales de transición por el átomo nitrógeno de la amida y el oxígeno del acetato, como se aprecia en la Figura 6, sin embargo, no se realizan estudios de solubilidad o biodisponibilidad, ni se profundiza en la determinación estructural de los complejos (Tayde et al., 2015).

Figura 6

Estructura propuesta de los complejos NTZ M= Mn(II), Cu (II) y Zn (II), Tomado de (Tayde et al, 2015)

El único reporte en la literatura de polimorfismo de la Nitazoxanida informa una nueva fase denominada forma II (Murthy et al., 2015). En el procedimiento se realizó una disolución de 3 gramos de muestra en 60 ml de etanol a reflujo durante 3 horas y se dejó cristalizar en frío (Murthy et al., 2015), el producto obtenido fue caracterizado por DRX de polvo, IR, TGA y RMN, La solubilidad acuosa de la NTZ, realizada por HPLC, de la forma I es 2,11 μg/mL y la de la forma II es 5,83 μg/mL; esto indica un aumento del orden de 2,76 veces en la solubilidad de la forma II en comparación con la forma I, En el artículo no se realiza un estudio estructural amplio de la forma II ni se reporta el sistema cristalino, grupo espacial o constantes de celda del posible polimorfo.

En el 2016 se reporta el primer estudio de la Nitazoxanida como un posible tratamiento para el síndrome respiratorio coronavirus (Sars-Covid) (Rossignol, 2016), aunque originalmente fue planteado como tratamiento para infecciones gastrointestinales. En los estudios realizados el fármaco NTZ respondió eficientemente en el tratamiento de enfermedades virales respiratorias,

inhibiendo la replicación viral de una gran cepa de influenzas como lo son la influencia A, y B, subtipos de H1N1, H3N2, H3N2v, H3N8, H5N9. En el 2016, el fármaco se encontraba en la investigación clínica fase 3 (ensayos clínicos con una duración aproximada de 10 años) (Rossignol, 2016), pero debido a la pandemia ocasionada por el coronavirus (Sars-covid-2), en el año 2020, se intensificaron los estudios sobre este fármaco como posible tratamiento para el Covid-19 (Mahmoud *et al.*, 2020). Para este propósito, la NTZ se ha experimentado en combinación con diferentes fármacos como Azitromicina (Kelleni, 2020), Camostat (Khatri & Mago, 2020) e hidroxicloroquina (Gina, 2020). Para el 3 febrero 2021, la *Cambridge Crystallographic Data Center* (CCDC) actualizó la lista de los fármacos en estudio para el tratamiento de Covid-19 (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), entre los cuales se encuentra la Nitazoxanida; estos tratamientos siguen en fase de pruebas y demuestran el potencial que tiene el fármaco como un posible tratamiento para esta clase de influenza.

**Tabla 4**Lista de posibles fármacos para el tratamiento del Covid-19

Fármaco	CSD Refcode	Referencias a la investigación del Covid-19	Imagen de la estructura en la CSD
Ritonavir	<u>YIGPIO</u>	Liu et al, ACS Cent. Sci. 2020, 6, 3, 315-331	A THE
Darunavir	<u>NISTIV</u>	<u>Liu et al, ACS</u> <u>Cent. Sci. 2020,</u> <u>6, 3, 315-331</u>	W. F.

Fa	avipiravir	D	DOHVE	Liu et al, ACS Cent. Sci. 2020, 6, 3, 315-331	
R	emdesivir	<u>K</u>	ZARNA	Liu et al, ACS Cent. Sci. 2020, 6, 3, 315-331	THE STATES
R	ibavirina		VIRAZL	Liu et al, ACS Cent. Sci. 2020, 6, 3, 315-331	>0 (A)
A	rbidol		<u>SAJPOK</u>	Liu et al, ACS Cent. Sci. 2020, 6, 3, 315-331	
	loroquina		CDMQUI	Liu et al, ACS Cent. Sci. 2020, 6, 3, 315-331	7-1-190
N	itazoxanida	<u>Y</u>	QUZWO	Liu et al, ACS Cent. Sci. 2020, 6, 3, 315-331	
U	mifenovir		<u>SIYSEA</u>	Lu, H., BioSci Trends, 2020, 16;14(1), 69-71	BAND.
T	riazavirina	<u>B</u>	<u>NOXCU</u>	Vincent, M. J. et al, Virol J., 2005, 2, 69	<b>EXE</b>
Po	enciclovir	E	YACGU	Wang, M. et al, Cell Research, 2020, 30, 269- 271	

Indinavir	<u>DIJWOJ</u>	Chang, Y. et al, Pharmacology & Toxicology, preprint, February 2020	
Ebselen	<u>SENGOH</u>	Jin, Z. et al, BioRXiv preprint, March 2020	
Sofosbuvir	<u>CUZROG</u>	Elfiky, A., Life Sciences, 2020, 248, 117477	A L
Dexametason a	<u>DEXME</u> <u>T11</u>		

## 5. Metodología

La metodología experimental se desarrolló en 5 fases descritas a continuación:

## 5.1. Fase 1: Caracterización de la materia prima.

La materia prima se caracterizó utilizando mediante las técnicas IR, TGA-DSC, difracción de rayos X de muestras policristalina y monocristal.

Las pruebas de solubilidad para determinar los mejores solventes para realizar los procesos de cristalización se llevaron a cabo pesando en una balanza analítica 10 mg de NTZ que se mezclaron con los siguientes solventes: metanol, etanol, butanol, octanol, hexano, bencina de petróleo, dimetil sulfoxido y agua.

#### 5.2. Fase 2: Cristalización

La materia prima NTZ se sometió a las siguientes condiciones de cristalización:

- *5.2.1. Evaporación lenta de solvente:* Se añadieron 0,001 g de NTZ en diferentes solventes como metanol, etanol, butanol y DMS hasta solubilizar completamente en constante agitación, después se tapó el recipiente y se dejó evaporar lentamente a una temperatura entre 22-25°C y en refrigeración 5 °C hasta formación de cristales.
- **5.2.2.** Solvente/anti solvente: La misma cantidad de NTZ se disolvió en una mezcla 70:30 metanol-agua, acetona-agua y etanol-agua en constante agitación y se dejó evaporar lentamente a temperatura entre 22-25°C.
- *5.2.3. Cristalización hidrotermal*: Se agregaron 0,001 g de NTZ y 50 ml de agua destilada en una autoclave de teflón de 60 ml; posteriormente se selló y se sometió a 70 °C en horno *memmert* durante 72 horas.
- 5.2.4. Evaporación de solvente a 70°C: Se añadieron 200 ml de NTZ disuelta en agua en un cristalizador de vidrio y se dejó evaporar a 70 °C durante 2 días.

5.2.5. Medios gelificados: Se prepararon soluciones de NTZ de 0,2mg/ml en diferentes solventes como etanol, acetona y metanol. En un tubo de ensayo se adiciona una solución de agar al 0,05%, se sella con teflón, se deja gelificar. Una vez solidificado el gel, se adicionan 5 ml de la solución de NTZ, y se deja en reposo para que la solución difunda en el gel.

## 5.3. Fase 3: Caracterización del producto sólido mediante IR, análisis térmico TGA-DSC y difracción de rayos X de muestras policristalinas y monocristal

## 5.3.1 Espectroscopia IR

La toma de espectros IR se realizó en el equipo ALPHA II FT-IR que se encuentra ubicado en el laboratorio CODEIM en Guatiguará, La toma de datos se realizó por reflexión total atenuada (ATR) a número de scans/tiempo, para identificar los grupos funcionales y los cambios en el momento dipolar del NTZ y en la muestra obtenida por método hidrotermal,

## 5.3.2 UV-VIS

La toma de datos se realizó en el Espectrofotómetro Genesys 10s Thermo Scientific UV/ultravioleta realizando un barrido espectral entre la longitud de onda de 190 – 1100 nm, lámpara de xenón. Ubicado en el laboratorio bromatológico Cargill kilómetro 2 vía Chimita, Esta técnica se utilizó únicamente en las pruebas de solubilidad de la NTZ y la muestra hidrotermal.

#### 5.3.3 Análisis térmico TGA-DSC

Los análisis se realizaron en el equipo NETZSCH STA 449 F3 JUPITER con atmósfera inerte de nitrógeno y rango de temperatura de 25 a 500 °C con una rampa de 10 °C/min, ubicado en laboratorio instrumental de análisis químico de la escuela de química de la Universidad Industrial De Santander.

## 5.3.4 Difracción de rayos X de polvo

La muestra fue molturada en un mortero de ágata y luego fue montada en un portamuestras de polimetilmetacrilato (PMMA) usando la técnica de llenado frontal. El patrón de XRPD fue medido utilizando un difractómetro BRUKER D8 ADVANCE ubicado en el Laboratorio de Rayos X del Parque Tecnológico Guatiguará, UIS. El equipo opera con geometría Da Vinci y está equipado con un tubo de rayos X (radiación Cu- Kα1 λ=1,5406 Å, 40 kV y 30 mA), un detector unidimensional LynxEye (con ángulo de apertura de 2,93°), una rejilla divergente de 0,6 mm, dos ventanas soller axiales (primaria y secundaria) de 2,5° y filtro de níquel. La recolección de datos fue realizada en el rango de 4,3° a 70,0° (2θ), con un paso de 0,02035° (2θ) a 0,6/paso,

La identificación de fases cristalinas fue llevada a cabo usando la base de datos *Powder Diffraction File* (PDF-2) del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD) (Gates-Rector & Blanton, 2019) utilizando el programa DIFFRAC.EVA (Giencke, 2007). Los patrones de polvo se indexaron mediante el programa DICVOL14 (Louër & Boultif, 2014) y se ajustaron mediante el algoritmo Le Bail (Le Bail, 2005) usando el programa TOPAS (Dinnebier *et al.*, 2018).

## 5.3.5 Difracción de rayos X de monocristal

Los cristales fueron inspeccionados en un microscopio de luz polarizada y se seleccionaron los de mejor calidad para el registro de datos de difracción de monocristal. El registro de datos se llevó a cabo a temperatura ambiente usando un difractómetro Rigaku XTALab P200, ubicado en el Laboratorio de Rayos X del Parque Tecnológico Guatiguará, UIS. El equipo operó con radiación de Cobre (CuKα λ=1,5418 Å), con un monocromador de grafito. Las imágenes se registraron usando un goniómetro Euleriano de 3-circulos equipado con un detector de área Rigaku Pilatius 200K. La reducción y la integración de los datos de intensidades se llevó a cabo usando

el programa CrysAlisPro, propiedad de Bruker (Baker, 2013). La estructura se resolvió por Métodos Directos usando el programa ShelXT (Sheldrick, 2015b) y se refinó por Mínimos Cuadrados usando ShelXL (Sheldrick, 2008).

## 5.3.6. Fase 4: Determinación de la solubilidad en el equilibrio de la NTZ

La solubilidad termodinámica de la Nitazoxanida se determinó por el método de agitación en matraz (Veseli et al., 2019):

- Se agregó una cantidad en exceso de Nitazoxanida en un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada.
- Se agitó a 450 rpm a temperatura ambiente hasta disolver una fracción del compuesto.
- Se mantuvo en agitación por 24 horas, posteriormente se dejó en reposo por 12 horas y transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 5 mL.
- Se registró la absorbancia de la solución  $\lambda_{\text{max}}$ : 342 nm en el espectrofotómetro de UV-Vis.

## 6. Resultados y discusión

## 6.1 Caracterización de la materia prima de Nitazoxanida

La materia prima de Nitazoxanida (NTZ) fue proporcionada por una empresa farmacéutica nacional. El compuesto es un polvo amarillo como se observa en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

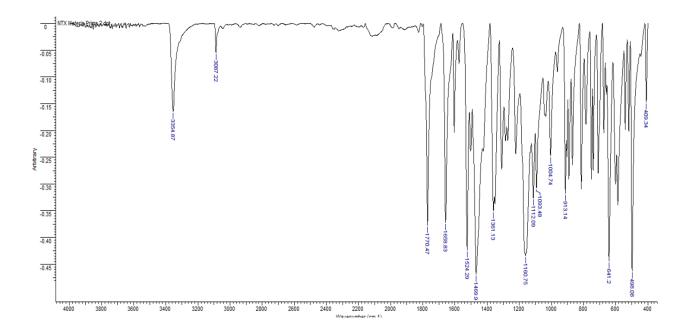
**Figura 7** *Materia prima Nitazoxanida* 



## 6.1.1 Análisis por Espectroscopia IR de la NTZ.

El espectro ATR-FTIR, ver Figura 8, muestra las bandas características del compuesto resumidas en la Tabla 5. Entre las bandas representativas que se relacionan en la Tabla, se puede considerar una banda originada por el estiramiento del enlace N-H en la región de 3354 cm<sup>-1</sup>. En la región de 3087,22 cm<sup>-1</sup> se observa un estiramiento del enlace =C-H, esto se debe a los hidrógenos en los anillos aromáticos del API. La banda 1770,47 cm<sup>-1</sup> es generada por la tensión del enlace del éster y el grupo nitro se observa en 1524,29 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 8** *Espectro ATR-FTIR de la NTZ* 



**Tabla 5**Bandas representativas de los grupos funcionales en el espectro IR de NTZ

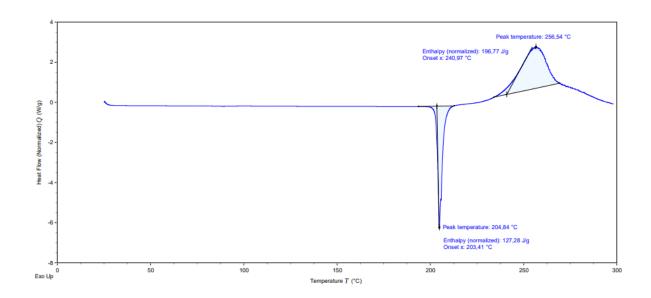
Banda	Absorbancia (cm-1)	Asignación
1	3354,87	N-H
2	3087,22	=C-H
3	1770,47	O-CO-CH3
4	1654,83	N-CO-R
5	1524,29	N=O
6	1469,90	C-H
7	1361,13	O-CO-CH3
8	1160,75	C-O

## 6.1.2 Caracterización DSC de la materia prima NTZ

La curva DSC de NTZ (Figura 9) muestra una transición endotérmica con temperatura de pico Tp= 204,84 °C correspondiente a la temperatura de fusión del compuesto, valor que coincide con la temperatura reportada por Murthy *et al.*, (2015) para una posible forma II de la Nitaxozanida. Posterior a la fusión del material se observa un pico exotérmico a T= 256,54 °C atribuible a la descomposición térmica del material.

Figura 9

Curva DSC de la materia prima de Nitazoxanida

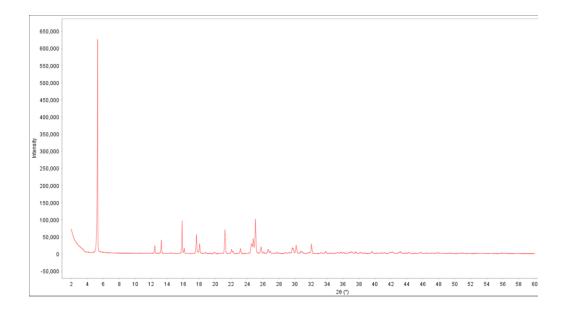


# 6.1.3. Análisis por Difracción de Rayos X de muestras policristalinas de la materia prima NTZ

El patrón de difracción de polvo de la materia prima de NTZ se muestra en la Figura 10. El indexado del patrón proporciona tres posibles soluciones denominadas Ortorrómbica 1, monoclínica 2 y Ortorrómbica 3. En la Tabla 6 se observan los respectivos parámetros de celda y figuras de mérito para las tres soluciones. Además, estos resultados se compararon con el

único reporte estructural contenido en la base de datos CSD (Refcode: QUZWOY), descrito por Bruno *et al*, (2010).

**Figura 10**Patrón de difracción de polvo de la materia prima Nitazoxanida



**Tabla 6**Soluciones de los indexados de la materia prima NTZ

Sistema	Ortorrómbica	Monoclínica	Ortorrómbica	Ortorrómbica
cristalino	1	2	3	CSD: QUZWOY*
a (Å)	66,94774	34,24050	33,45(15)	14,302(2)
b (Å)	14,54676	5,36220	14,531(5)	5,2800(8)
c (Å)	5,36345	14,53360	5,353(2)	33,183(5)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	5223,32	2608,32	2602(1)	2505,8(6)
Grupo espacial		P2 <sub>1</sub> /c	Pna2 <sub>1</sub>	Pna2 <sub>1</sub>
β (°)	90	102,185	90	90
M (20)	16,9	12,0	14,7	
F (20)	40,1	27,2	29,6	

<sup>\*</sup>Nota: Los datos de monocristal reportados fueron tomados a una temperatura de 100 °K

La solución 1 presenta las mejores figuras de mérito (M (20) y F (20)) y muestra que el parámetro a es aproximadamente el doble en comparación con las soluciones 2 y 3. Las soluciones 2 y 3 presentan similitudes en los parámetros de la celda y a su vez son similares a los reportados en la CSD (QUZWOY). La determinación del grupo espacial utilizando la información cristalográfica de la solución 1 no arrojó resultados concluyentes debido a que las ausencias sistemáticas corresponden a los posibles grupos espaciales Pmmm, Pmma, Pmmb, Pnna, Ccca y Cccb.

Se realizaron los procesos de descomposición del patrón de polvo experimental de la Nitazoxanida (WPPD) con la información de las soluciones 2, 3 y la reportada en el CSD (QUZWOY) que se observan en las Figura 11, Figura 12 y Figura 13 respectivamente. No se llevó a cabo el WPPD de la solución 1 debido a que no se logró determinar con certeza el grupo espacial. En las figuras de cada uno de los ensayos realizados se observa que los parámetros determinados del proceso de indexado y los contenidos en el banco de datos, no reproducen el patrón completo, ya que se encuentran máximos en el patrón de polvo experimental (azul) que no están incluidos en el patrón de polvo calculado (rojo); las flechas rojas indican los picos que no coinciden con el patrón calculado. Adicionalmente, los parámetros de ajuste mostrados en la Tabla 7 son mayores al 10%, lo que indica que las celdas unidades de las soluciones 2 y 3, así como la reportada CSD (QUZWOY) podrían no corresponder a la estructura cristalina de la materia prima de Nitazoxanida.

## Figura 11

WPPD utilizando la información cristalográfica de la solución 2: a) patrón completo y b) ampliación entre 15,8-19,0° 2θ. Nota: El patrón de polvo experimental se muestra en azul y el patrón de polvo calculado en rojo; las flechas rojas indican los picos

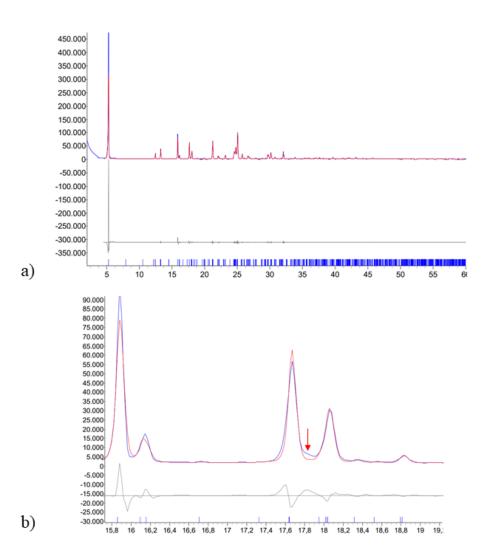
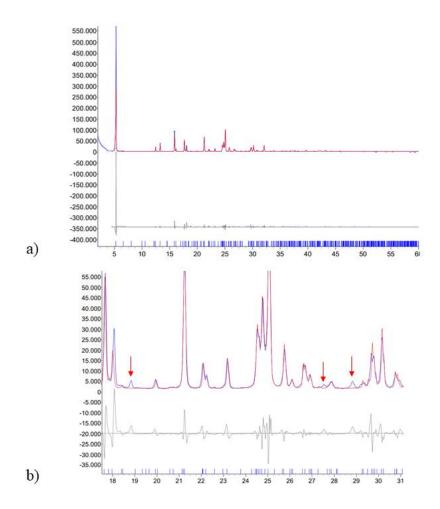


Figura 12

WPPD utilizando la información cristalográfica de la solución 3: a) patrón completo y b) ampliación entre 18,0-31,0° 2θ. Nota: El patrón de polvo experimental se muestra en azul y el patrón de polvo calculado en rojo; las flechas rojas indican los picos



**Tabla 7**Parámetros de ajustes de los procesos WPPD

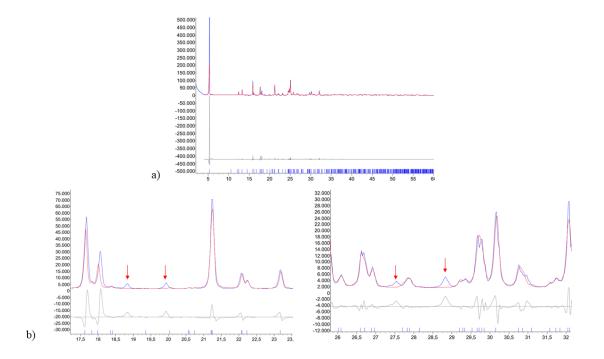
WPPD	X <sup>2</sup>	R <sub>p</sub> (%)	R <sub>wp</sub> (%)	R <sub>exp</sub> (%)
Solución 2	17,12	13,40	20,26	1,18
Solución 3	19,54	17,53	24,89	1,27
QUZWOY*	22,23	19,18	28,90	1,29

Figura 13

WPPD utilizando la información cristalográfica reportado en el CSD (QUZWOY): a) patrón

completo y b) ampliaciones entre 17,5-23,0° y 26,0-32,0° 2θ. Nota: El patrón de polvo

experimental se muestra en azul y el patrón de polvo calculado en rojo



## 6.2. Ensayos de cristalización de la Nitazoxanida

La materia prima Nitazoxanida fue sometida a diferentes condiciones de cristalización como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8**Ensayos de cristalización de la Nitazoxanida

Ensayo	Método	Solvente	Temperatura	Resultado
1	Cristalización en gel	Agua:etanol	4-7 °C	Placas

2	Evaporación lenta de	Acetona:agua	4-7 °C	Placas
	solvente/antisolvente	70:30		
3	Evaporación lenta de solvente	Acetona	4-7 °C	Placas
4	Evaporación lenta de solvente	Metanol	4-7 °C	Placas
5	Evaporación lenta de solvente	Etanol	4-7 °C	Placas
6	Evaporación lenta de solvente	DMSO	4-7 °C	Placas
7	Evaporación lenta de solvente	Acetona	ambiente	Placas
8	Evaporación lenya de solvente	Metanol	ambiente	Placas
9	Evaporación lenta de solvente	Etanol	ambiente	Placas
10	Hidrotermal	agua	70 °C	Polvo rojizo

### 6.3. Estudio de DRX de monocristal de Nitazoxanida

Se tomaron datos de DRX de monocristal de todas las muestras de los ensayos de 1 a 9. Los datos de los ensayos 2 y 4 (E2NTZ y E4NTZ respectivamente) fueron los de mejor calidad y permitieron resolver las estructuras cristalinas. Los datos de los demás ensayos arrojaron valores de confiabilidad (R<sub>int</sub>, R<sub>w</sub> y S) fuera de los rangos aceptados internacionalmente debido a que las posiciones de los átomos no se precisaron adecuadamente y los parámetros de desplazamiento térmicos eran muy altos, lo cual impidió la resolución completa de las estructuras.

## 6.3.1. Estudio de DRX de monocristal del Ensayo 2: E2NTZ

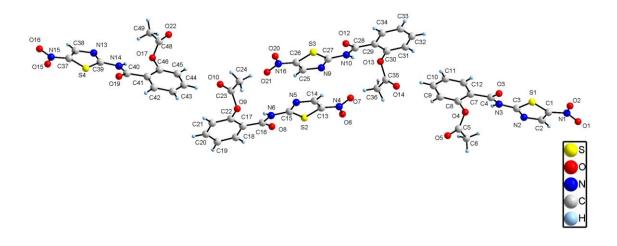
Un cristal de forma de lámina fue seleccionado para el estudio por difracción de rayos X de monocristal. La integración y reducción de los datos indicaron que la muestra cristaliza en una celda unidad monoclínica con grupo espacial P2<sub>1</sub>/c y parámetros: a = 66,9564(16) Å, b = 5.36334(17) Å, c = 14.5446(5) Å,  $\beta = 90^{\circ}$ , V= 5223,1(3) Å<sup>3</sup> y Z=16. Los datos cristalográficos y los detalles de la determinación de la estructura se muestran en la Tabla 9.

La unidad asimétrica de la estructura está conformada por cuatro moléculas de Nitazoxanida cristalográficamente independientes (Figura 14).

**Tabla 9**Datos cristalinos de la estructura del producto E2NTZ

Información cristalográfica				
Fórmula	$C_{12}H_9N_3O_5S$			
Peso molecular (g/mol)	307,28			
Sistema cristalino	Monoclínico			
Grupo espacial	$P2_{1}/c$ (No.14)			
a, b y c (Å)	66,9564(16) 5,36334(17) 14,5446(5)			
α, β, γ (°)	90, 90, 90			
Volumen (Å <sup>3</sup> )	5223,1(3)			
Z	16			
Densidad (calculado) (g/cm <sup>3</sup> )	1,563			

**Figura 14**Unidad asimétrica de la estructura de Nitazoxanida E2NTZ

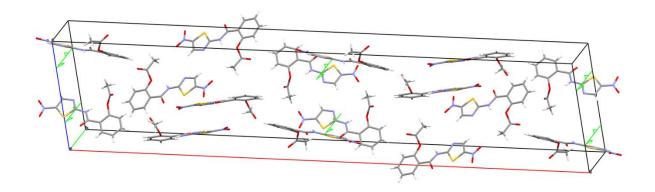


Los parámetros de la celda se corresponden con una celda unidad ortorrómbica en la cual los valores de los ejes a, b y c son diferentes y todos los ángulos a, b y a son iguales a 90°. Sin embargo, la estructura cristalina de la Nitazoxanida resuelve para un sistema monoclínico en el cual las condiciones de geometría de la celda es que todos sus lados sean diferentes y el

ángulo  $\beta \neq 90^{\circ}$ . La condición de simetría para que una celda se considere ortorrómbica es que estén presentes tres ejes binarios perpendiculares entre sí, es decir, que los ejes de orden 2 deben ser paralelos a los ejes de la celda. Por otro lado, en un sistema cristalino monoclínico solo está presente un eje binario paralelo al eje b. En la estructura determinada para NTZ se puede observar la presencia de un sólo eje helicoidal  $2_1$  paralelo al eje b (flechas de color verde en la Figura 15, que le otorga la simetría monoclínica a la celda. Esto quiere decir que la estructura es pseudosimétrica debido a que las relaciones entre los parámetros de la celda unidad corresponden a un sistema ortorrómbico pero las operaciones de simetría pertenecen a un sistema monoclínico.

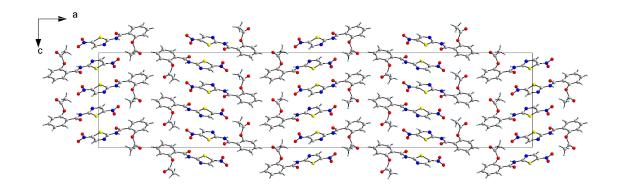
Figura 15

Representación de los ejes helicoidales 21 en la estructura de la Nitazoxanida. Nota: las flechas de color verde indican el eje helicoidal 21 paralelo al eje b



Las moléculas de Nitazoxanida empaquetan con el motivo  $\gamma$ , ver Figura 16, en la cual a lo largo del eje a las moléculas forman cadena en zig-zag y a lo largo del eje c, forman cadenas lineales con las moléculas de NTZ alternadas y relacionadas por un centro de inversión.

**Figura 16** *Motivo γ de la estructura del producto del ensayo 2* 



En la estructura cristalina están presentes 11 enlaces de hidrógenos (Tabla 10) de los cuales 7 de ellos son intramoleculares (azul claro) y cuatro son intermoleculares (magenta). Los enlaces intramoleculares en los que participa el nitrógeno de la amida como dador pueden ser descritos con el grafo S(6) mientras que el enlace donde el carbonilo del grupo amida participa como aceptor se puede representar con el grafo S(5), como se muestra en la Figura 17.

**Tabla 10**Enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares presentes en la estructura cristalina del E2NTZ

N° D-H···A		<b>D-H</b> ( <b>A</b> )°	H···A	D-H···A	D-	Grafo
11	<i>D</i> -11····A	<b>D-II</b> (A)	<b>(A)</b> °	<b>(A)</b> °	HA (°)	Graio
1	N3-H3··· O4	0,86	2,06	2,70	130	<i>S</i> (6)

2	N6-H6··· O6	0,86	2,06	2,69	130	<i>S</i> (6)
3	N10-H10A··· O13	0,86	2,09	2,75	133	<i>S</i> (6)
4	N14-H14A···O17	0,86	2,06	2,74	136	<i>S</i> (6)
5	C10-H10··· O14	0,93	2,48	3,17	131	<i>D</i> (2)
6	C18-H18···O8	0,93	2,46	2,78	100	<i>S</i> (5)
7	C20-H20··· O22	0,93	2,39	3,11	135	<i>D</i> (2)
8	C24-H24C··· O20	0,96	2,46	3,41	168	<i>D</i> (2)
9	C34-H34···O12	0,93	2,44	2,78	101	<i>S</i> (5)
10	C36-H36A··· O6	0,96	2,59	3,40	142	<i>D</i> (2)
11	C42-H42···O19	0,93	2,38	2,71	101	<i>S</i> (5)

**Figura 17**Enlaces de hidrógenos intramoleculares presentes en la estructura

Entre los enlaces de hidrógenos intermoleculares, dos de estos son formados entre el hidrógeno del anillo aromático con el oxígeno del carbonilo del grupo acetato mientras que, los otros dos enlaces participan un hidrógeno del metilo con uno de los oxígenos del grupo

nitro (Figura 18). Todos estos enlaces se pueden describir con el grafo D(2). Todos estos enlaces de hidrógeno forman cadenas lineales bidimensionales que se extienden de forma infinita paralelas al eje a.

**Figura 18**Enlaces de hidrógenos intermoleculares presentes en la estructura

La estructura cristalina revela la presencia de 20 interacciones del tipo  $\pi - \pi$  (Tabla 11), entre anillos de triazol vecinos y entre anillos de bencenos. Las interacciones entre los anillos de triazol:  $Cg_1 - Cg_1$ ,  $Cg_5 - Cg_3$  y  $Cg_7 - Cg_7$  (Cg=centro de masa del anillo), se extienden a lo largo de la dirección del eje c, como se muestra en la Figura 19a, formando cadenas helicoidales de moléculas de Nitazoxanida.

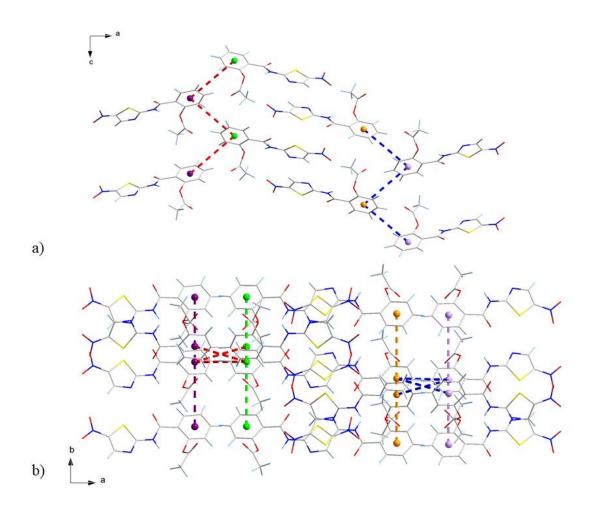
Las interacciones entre los anillos de benceno  $Cg_4$ - $Cg_8$  y  $Cg_6$ - $Cg_2$  (Figura 19b), forman motivos en "Zig-Zag" en la proyección a lo largo del eje b mientras que, en la vista a lo largo del eje c las interacciones  $Cg_3$ - $Cg_5$ ,  $Cg_6$ - $Cg_6$ ,  $Cg_2$ - $Cg_4$  y  $Cg_2$ - $Cg_2$  forman cadenas bidimensionales que se extienden en forma paralela al eje b.

**Tabla 11**Interacciones tipo  $\pi-\pi$  presentes en la estructura cristalina del E2NTZ

No.	Ca. Ca.	Cgi—Cgj		Ca. Ca.	Cg <sub>i</sub> —
140.	$Cg_i$ — $Cg_j$	$(\mathring{\mathbf{A}})$	110.	Cg <sub>i</sub> —Cg <sub>j</sub>	$Cg_{j}\left(\mathring{A}\right)$
1	$Cg_1-Cg_1$	4,793	11	$Cg_5-Cg_3$	3,540
2	$Cg_1-Cg_1$	3,517	12	$Cg_5 - Cg_3$	4,756
3	$Cg_2-Cg_2$	5,364	13	$Cg_6-Cg_2$	5,646
4	$Cg_2-Cg_2$	5,363	14	$Cg_6-Cg_6$	5,364
5	$Cg_2-Cg_6$	5,746	15	$Cg_6-Cg_6$	5,363
6	$Cg_3-Cg_5$	3,539	16	$Cg_7 - Cg_7$	4,783
7	$Cg_3-Cg_5$	4,784	17	$Cg_7-Cg_7$	3,527
8	$Cg_2$ - $Cg_4$	5,363	18	$Cg_8$ - $Cg_4$	5,628
9	$Cg_2$ - $Cg_4$	5,363	19	$Cg_8$ - $Cg_8$	5,363
10	$Cg_4$ - $Cg_8$	5,763	20	$Cg_8$ - $Cg_8$	5,364

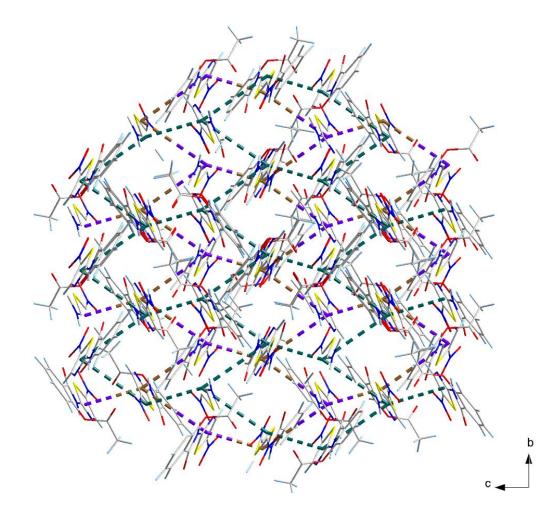
Figura 19

Interacciones entre los anillos de benceno: a) motivos en "Zig-Zag" en la proyección a lo largo del eje c y, b) cadenas bidimensionales paralelas al eje b



Todas las interacciones  $\pi - \pi$  forman una red compleja en "forma de panal" (Figura 20) que, en conjunto con los enlaces de hidrógeno, estabilizan la estructura tridimensional del ensayo 2 de la Nitazoxanida.

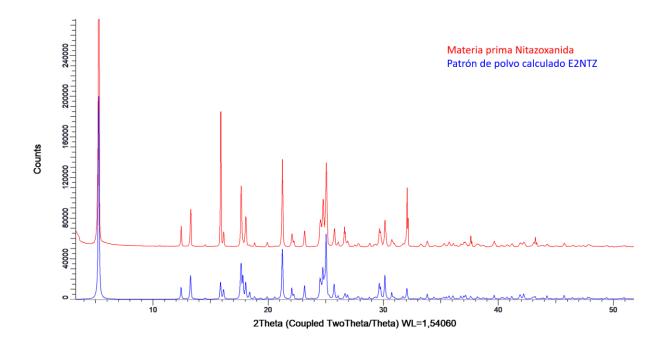
Figura 20  $Interacciones \ \pi-\pi \ presentes \ en \ la \ estructura \ cristalina \ del \ material$ 



En la comparación del patrón de difracción de polvo obtenido de la materia prima con el patrón calculado utilizando los datos de monocristal (Figura 21), se observa coincidencia de las posiciones de los máximos de difracción, por lo cual, se puede aseverar que la estructura de la materia prima corresponde a la determinada por monocristal y al E2NTZ de Nitazoxanida. Las diferencias en las intensidades de los máximos de difracción se deben a la orientación preferencial.

Figura 21

Comparación del patrón de polvo de la materia prima de Nitazoxanida (Rojo) con el calculado usando los datos de monocristal (azul)



## 6.3.2 Análisis de superficies de Hirshfeld del Ensayo 2: E2NTZ

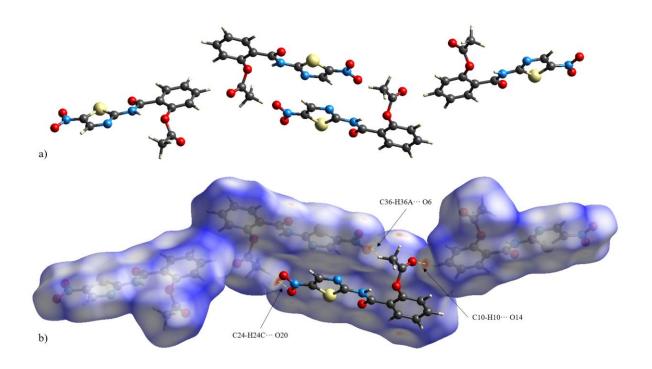
El empaquetamiento cristalino generalmente hace referencia a fuerzas orientadoras, sin embargo, en un cristal existe gran cantidad de contribuciones de distintas energías y es de gran importancia tomarlas en cuenta para describir el empaquetamiento de una estructura. El análisis de las superficies de Hirshfeld permite identificar la contribución de cada densidad electrónica a una superficie y esto permite corroborar si existen interacciones adicionales que contribuyan al arreglo cristalino. Este análisis se lleva a cabo usando el programa CrystalExplorer (Mackenzie et al., 2017).

En el análisis de la superficie de Hirshfeld realizado a la estructura de Nitazoxanida obtenida del Ensayo 2, se determinó que el volumen ocupado por la molécula es de 5151,76 Å<sup>3</sup>, que

representa el 98,64 % de la red cristalina, por lo tanto, la molécula se encuentra compacta en la red y puede presentar algunos intersticios. La Figura 22 muestra la superficie Hirshfeld  $d_{\text{norm}}$  donde se observan zonas rojas que se deben a las interacciones de los enlaces de hidrogeno que están descritos en la Tabla 10 y representados en la Figura 18. En estas áreas de color rojo el átomo está más cerca de la superficie a diferencia de las zonas azules donde estas distancias son más grandes.

Figura 22

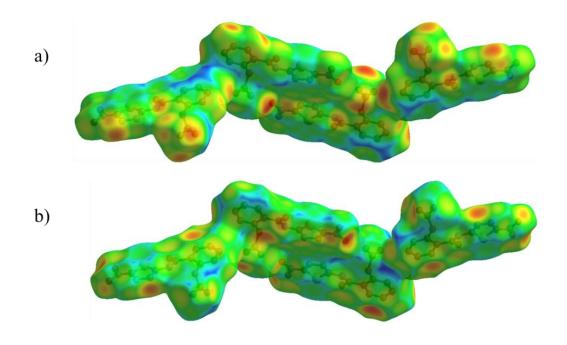
a) E2NTZ NTZ, b) dnorm E2NTZ de NTZ



En la Figura 23 se pueden identificar las fuerzas de las interacciones entre los átomos por medio del gráfico de superficie di y de. La superficie más próxima a los anillos de seis miembros presentan una coloración cálida, esto puede ser debido a que esas nubes de electrones interaccionan con átomos de hidrógeno, sin embargo, el grafico di (Figura 23a) muestra que estos anillos se encuentran lejos de la superficie, por lo que una interacción muy cercana no es

determinante. Los átomos de oxígeno (zonas rojas) son los que presentan en mayor medida una distancia cercana tanto en *d*i como en *d*e y son determinantes en el empaquetamiento de la estructura cristalina como se puede observar en las Figura 17 y 18 y participan en los enlaces intra e intermoleculares lo que permite generar motivos a lo largo de los ejes cristalinos.

Figura 23
Superficie de Hirshfeld (a) di y (b) de que representan las distancias entre la superficie y los átomos cercanos



Comparando la superficie de Hirshfeld "shape index" mostrada en la Figura 24, se observan las zonas azules que indican las protuberancias y en naranja las zonas profundas de la estructura vista a lo largo del eje b. Se puede inferir que las moléculas se empaquetan unas sobre otras a lo largo del eje b debido a que los espacios (abolladuras y protuberancias) son complementarios, lo que indica que las interacciones descritas en las Tabla 10 y 11 contribuyen al empaquetamiento en la dirección de este eje. Este efecto puede ser la responsable de la

orientación preferencial que presenta el patrón de polvo del E2NTZ. En la Figura 25 se describe la superficie de curvatura que presenta zonas bien definidas de planos, en esas áreas se acoplan y empaquetan los anillos de benceno y tiazol.

**Figura 24**Shape index: (arriba) vista desde b, (abajo) vista desde b a 180°

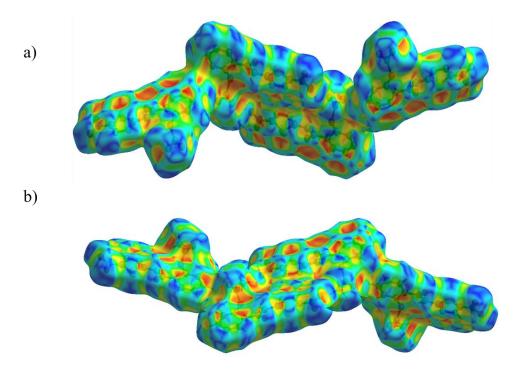
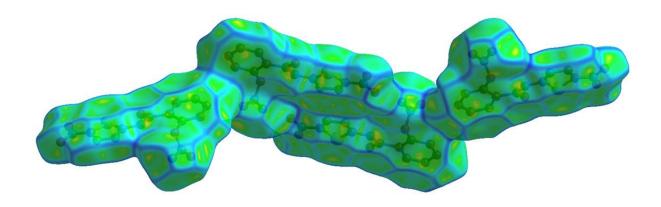


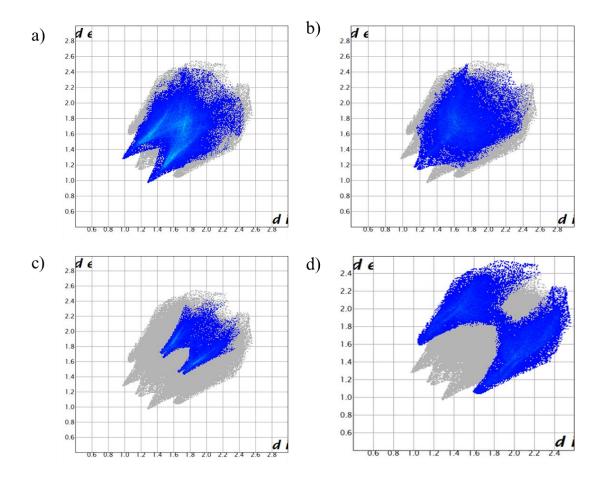
Figura 25
Superficie Curvatura (Curvedness) del E2NTZ de la nitaxozanida



Las interacciones entre átomos también se pueden representar por medio de gráficas de huellas dactilares, estas permiten relacionar la distancia interna y externa a la superficie de cada tipo de átomos (Figura 26). Las interacciones más frecuentes son entre los átomos de O-H con un 34,9 %. Las interacciones H-H ocupan un 17,0 % en la huella dactilar y muestran un comportamiento concentrado en rangos de *de* y *di* 1,2 a 2,4 Å.

Figura 26

Gráficas de huellas dactilares del E2NTZ, interacciones a) O-H, b) H-H, c) C-H y d) C-O



## 6.3.3 Estudio por espectroscopia IR del Ensayo 4: E4NTZ

Se seleccionó un espécimen de la muestra y se realizó un registro de datos por espectroscopía infrarroja (**Figura 27**), observándose las bandas características presentadas en la Tabla 12. Al comparar estos datos con el espectro infrarrojo del E2NTZ (Figura 8) y de las bandas de la Tabla 5 no se observan cambios significativos o aparición/desaparición de bandas en el espectro, por lo que se puede concluir que en la estructura química de la molécula no sufrió cambios en la transición del E2NTZ al E4NTZ.

Figura 27

Espectro Infrarrojo del E4NTZ de la Nitazoxanida

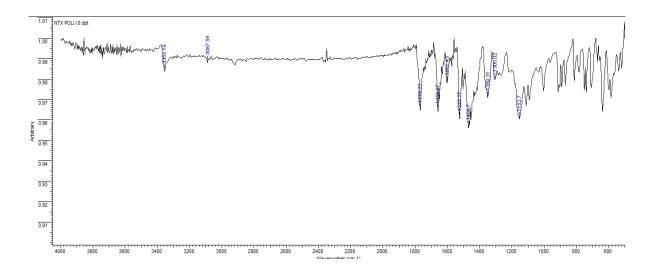


Tabla 12

Bandas representativas de los grupos funcionales en el espectro IR del ensayo 4 de NTZ

Banda	Absorbancia (cm-1)	Asignación
1	3355,19	N-H
2	3087,59	=C-H
3	1770,47	N-CO-R
4	1659,07	C=O
5	1525,27	N=O
6	1469,70	С-Н
		O-CO-
7	1350,31	CH3
8	1152,70	C-O

## 6.3.4. Estudio de DRX de monocristal del Ensayo 4: E4NTZ

El cristal de tamaño y calidad adecuada para la toma de datos por difracción de monocristal presentó un hábito cristalino en forma laminar. La integración y reducción de los datos indican que el material cristaliza en una celda ortorrómbica con los parámetros mostrados en la Tabla 13. Los parámetros cristalográficos del E4NTZ son similares a los reportados por Bruno et al.

(2010), este resultado indica que durante el proceso de cristalización se obtiene un cambio en la estructura cristalina del material. Luego de determinar la estructura cristalina, se realizó un análisis de la misma para determinar el tipo de interacciones y cómo afectan en las propiedades macroscópicas de la molécula. Usando el programa Platon (Spek, 2003) se llevó a cabo la validación de las distancias, ángulos y torsión entre distintos átomos, y se generó una lista detallada de las diferentes interacciones presentes en la estructura: enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi - \pi$  y  $\pi$ -H entre otros.

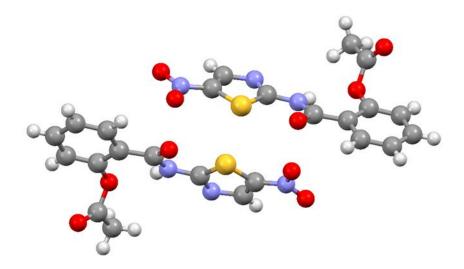
**Tabla 13**Datos cristalinos de la estructura E4NTZ

Información cristalográfica				
Fórmula	$C_{12}H_9N_3O_5S$			
Peso molecular (g/mol)	307,28			
Sistema cristalino	Ortorrómbico			
Grupo espacial	Pna2 <sub>1</sub> (No.33)			
a, b y c (Å)	14,5542(2) 5,3959(1) 33,4777(4)			
α, β, γ (°)	90, 90, 90			
Volumen (Å <sup>3</sup> )	2614,49(7)			
Z	4			
Densidad (calculado) (g/cm <sup>3</sup> )	2,477			

En la Figura 28 se muestra la unidad asimétrica, la cual es similar a la reportada en la base datos CSD. Aunque la estructura cristalina del material está contenida en la CSD, en la publicación realizada por Bruno *et al.*, los datos fueron registrados a baja temperatura y no se realiza la descripción de la misma. Con la finalidad de realizar un estudio detallado y comparativo de las estructuras cristalinas de ambos polimorfos de NTZ, en este trabajo se llevó a cabo la descripción estructural del E4NTZ. La unidad asimétrica del E4NTZ presenta dos unidades cristalográficamente independientes mientras que el E2NTZ posee cuatro moléculas independientes.

Figura 28

Unidad asimétrica del E4NTZ de Nitazoxanida

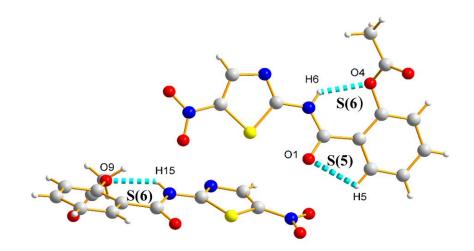


En la estructura del E4NTZ se reportan tres enlaces de hidrógeno intramoleculares y uno intermolecular. En la Tabla 14 se muestran estos enlaces con su respectivo grafo. El enlace formado entre el oxígeno del grupo acetato y un hidrógeno perteneciente a un carbono de un anillo de benceno no posee un grafo definido debido a que este enlace se presenta entre dos unidades cristalográficamente independientes. Los enlaces intramoleculares se muestran en la Figura 29 y el intermolecular en la Figura 30. Los enlaces intramoleculares descritos por los grafos S(5) y S(6) generan mayor rigidez y planaridad en la estructura mientras que el enlace de hidrógeno intermolecular se encuentra dentro de la categoría de los enlaces de hidrógeno fuertes y es un enlace de hidrógeno finito que puede ser descrito con el grafo D(2).

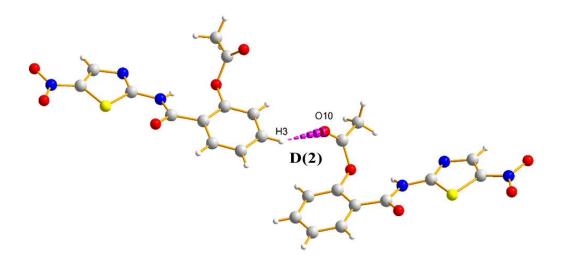
**Tabla 14**Enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares presentes en la estructura cristalina del E4NTZ

N°	D-H···A	<b>D-H</b> ( <b>A</b> )°	H····A (A)°	<b>D-H···A</b> (A)°	D- H····A (°)	Grafo
1	N1-H6··· O4	0,86	2,07	2,720	132	<i>S</i> (6)
2	N4-H15··· O9	0,86	2,06	2,705	131	<i>S</i> (6)
3	C3-H3··· O10	0,93	2,51	3,218	133	<i>D</i> (2)
4	C5-H5···O1	0,93	2,42	2,749	101	S(5)

**Figura 29** *Enlaces de hidrógeno intramoleculares E4NTZ* 



**Figura 30**Enlace de hidrógeno intermolecular del E4NTZ



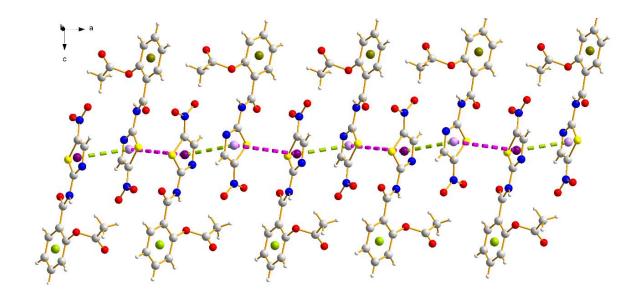
Los anillos tipo benceno y tiazol muestran interacciones  $\pi \cdots \pi$  que se representan por medio de diferentes distancias y ángulos entre centroides (Tabla 15). Las interacciones entre los anillos tiazol,  $Cg_I - Cg_3$  y  $Cg_3 - Cg_I$ , generan un motivo de cadena lineal a lo largo del eje a que contiene un plano de reflexión ac, como lo indica el grupo espacial el cual muestra un plano tipo n a lo largo de la dirección cristalográfica [1 0 0].

**Tabla 15**Interacciones tipo  $\pi - \pi$  que presentes en la estructura cristalina del E4NTZ

No.	Cg <sub>i</sub> —Cg <sub>j</sub>	Cg <sub>i</sub> —Cg <sub>j</sub> (Å)
1	$Cg_1-Cg_3$	4,761
2	$Cg_3-Cg_1$	3,532
3	$Cg_2-Cg_2$	5.366
4	$Cg_4-Cg_4$	5.366
5	$Cg_3-Cg_1$	4,805

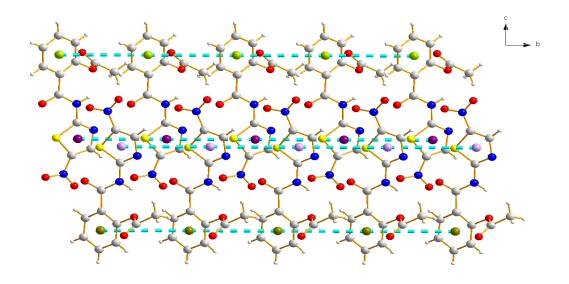
6	$Cg_2$ - $Cg_4$	5.657
7	$Cg_2$ - $Cg_4$	5.739

Figura 31  $Motivo\ a\ lo\ largo\ del\ eje\ a\ generado\ por\ la\ interacción\ Cg1-Cg3\ y\ Cg3-Cg1$ 



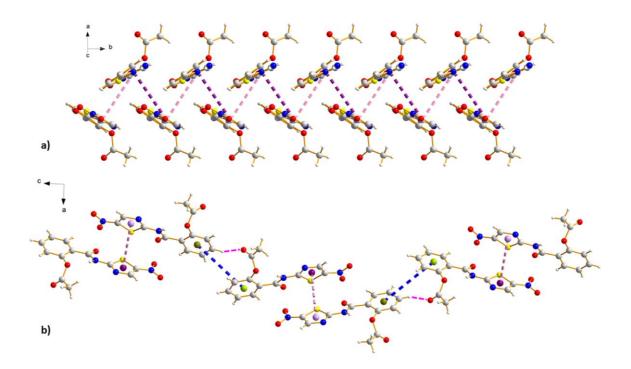
Las interacciones entre los anillos,  $Cg_2 - Cg_2$  y  $Cg_4 - Cg_4$ , generan un motivo de cadena lineal a lo largo del eje **b**.

**Figura 32**Motivo a lo largo del eje b generado por la interacción Cg2 – Cg2 y Cg4 – Cg4



Las interacciones Cg3 - Cg1, Cg2-Cg4 y Cg2-Cg4 junto con el enlace de hidrógeno intermolecular, producen un motivo de cadena lineal a lo largo del eje b y una cadena helicoidal a lo largo del eje c, como se muestran en la Figura 33.

**Figura 33**Cadena helicoidal formada por las interacciones Cg3 – Cg1, Cg2-Cg4 y Cg2-Cg4



Todas las interacciones de los enlaces de hidrogeno y  $\pi - \pi$  forman una estructura robusta que estabilizan el enrejado cristalino del E4NTZ y permite que se extienda en dirección cristalográfica del eje a.

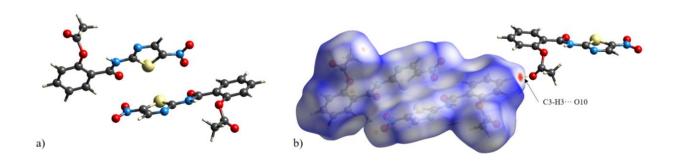
## 6.3.5 Análisis de superficies de Hirshfeld del Ensayo 4: E4NTZ

En el análisis de superficie de Hirshfeld se determinó que el volumen ocupado por la molécula en la red cristalina es de 2578,12 Å<sup>3</sup>, que equivale al 98,61 % del espacio en la red, por lo tanto, la molécula se encuentra compacta y puede presentar algunos intersticios. La superficie de Hirshfeld  $d_{\text{norm}}$  señala en rojo las distancias cortas entre el átomo más cercano y la superficie, en azul las distancias más largas. En la Figura 30 y Figura 34 se observa que la

interacción más corta está dada por el enlace de hidrógeno (C3-H3··· O10) entre el carbono de un anillo de benceno como dador y un oxígeno del éster de la nitaxozanida.

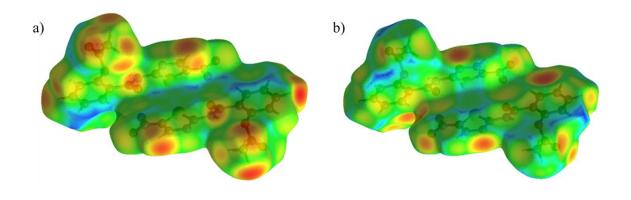
Figura 34

a) Unidad asimétrica de E4NTZ NTZ, b) Superficie dnorm E4NTZ de NTZ



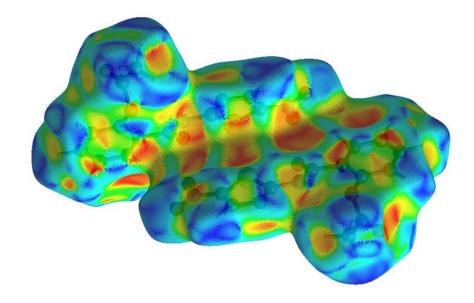
En la Figura 35a (superficie *d*i) se aprecia que las interacciones más cortas desde los átomos internos a la superficie corresponden a los hidrógenos que están cercanos a zonas de alta densidad electrónica y los más largos son los hidrógenos de los anillos aromáticos que no están sustituidos. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**b (superficie *d*e) presenta un comportamiento similar, pero las interacciones más largas se corresponden a las zonas planas de los anillos de aromáticos.

Figura 35
a) Representación di y b) de del E4NTZ de la NTZ



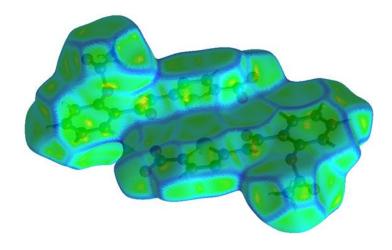
La superficie "shape index" posee zonas que se elevan y se representan mediante un color azul, estas zonas se acoplan con las zonas de las superficies que están hundidas y en color rojo de las moléculas adyacentes, como se observa en la Figura 36. De esta manera, se puede apreciar que las interacciones representadas en la sección anterior se superponen con la superficie descrita, además, este gráfico muestra que los anillos aromáticos se pueden ordenar de forma apilada a lo largo de la estructura cristalina debido a que presentan las marcas complementarias características en ese tipo de arreglos, esto podría inducir a una estructura más compacta y así evitar la inclusión de moléculas de solvente.

**Figura 36**Superficie shape index del E4NTZ de la Nitazoxanida



En la Figura 37, se muestra la curvatura de la superficie del E4NTZ y presenta grandes zonas planas, especialmente en los anillos tanto tiazol como benceno y esto concuerda con la conformación mostrada en la sección anterior de los parámetros de asimetría. Esta figura indica que la estructura posiblemente se encuentra apilada en la dirección normal al plano visto en la superficie. Los anillos tiazol que se encuentra en el plano efectivamente se apilan entre ellos a lo largo del eje a.

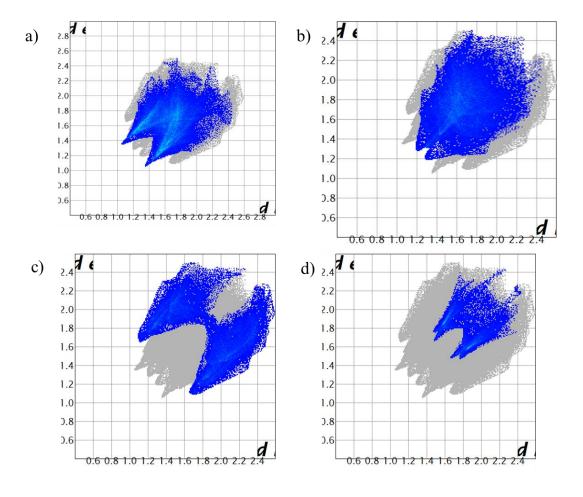
Figura 37
Superficie Curvatura (Curvedness) de E4NTZ



Los contactos atómicos también se pueden representar por medio de las gráficas de huellas dactilares que relacionan la distancia interna y externa a la superficie de cada tipo de átomos. Las interacciones más frecuentes son: O-H 35,6% del total de las interacciones, aparece como dos crestas simétricas concentradas en distancias internas y externas de longitud media a alta. Aunque hay muchas interacciones de este tipo, debido a la longitud de enlace son interacciones débiles, excepto por la indicada en las puntas de la huella dactilar, que son características de enlaces de hidrógeno fuerte. La interacción H-H 21.7% se muestran como una mancha concentrada con el mismo comportamiento que la descrita anteriormente. Las interacciones H-C 17.0%, tiene una apariencia de "alas de mariposa", lo que es indicativo que la estructura contiene átomos de carbono dadores y aceptores  $\pi$  de enlace. Interacciones del tipo O-C equivalentes al 6.3% están concentradas a altas distancias y presentan un porcentaje de interacciones bajo.

Figura 38

Gráficas de huellas dactilares a) O-H, b) H-H, c) H-C y d) O-C



# 6.3.6. Ensayo 10 de cristalización hidrotermal (E10NTZ)

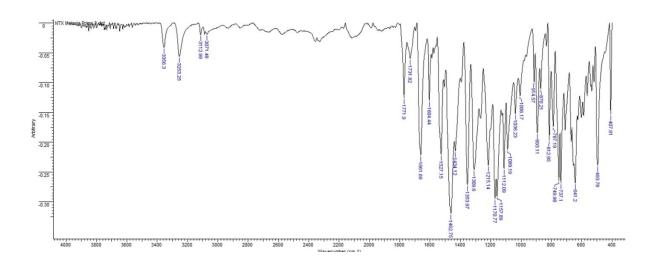
Luego del proceso de cristalización hidrotermal se obtuvo un sólido policristalino de color rojizo (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

**Figura 39**Resultado del proceso hidrotermal



El espectro infrarrojo del sólido (Figura 40), presenta bandas similares con el producto E4NTZ y E2NTZ, como se puede observar en la Tabla 5 y Tabla 16.

**Figura 40**Espectro infrarrojo del producto hidrotermal



**Tabla 16**Bandas representativas de los grupos funcionales en el espectro IR del producto hidrotermal

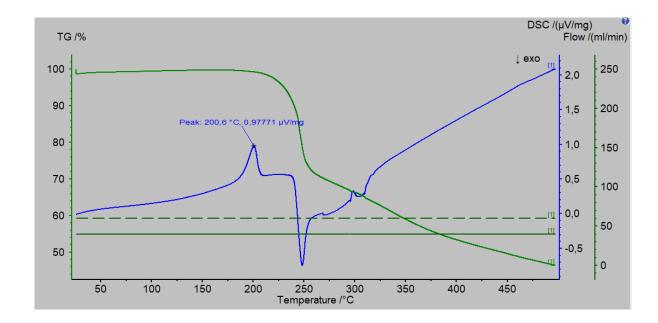
Banda	Absorbancia (cm-1)	Asignación
1	3360,84	N-H
2	3259,21	N-H o O-H
3	3087,45	=C-H
4	1773,43	O-CO-CH <sub>3</sub>
5	1605,99	N=O
6	1361,13	O-CO-CH <sub>3</sub>
7	1160,75	C-O

En el espectro se observa la aparición de una nueva banda en 3259,21 cm<sup>-1</sup> en la región característica de los estiramientos o tensiones de los enlaces N-H o O-H, esto puede deberse a una posible degradación de la materia prima debido al estrés térmico por el calentamiento en la autoclave a 70 °C durante 48 horas. En un estudio (Malesuik et al., 2012) se sometió una suspensión oral del fármaco NTZ a 60 °C durante cinco meses presentando un degradación del 20 % del producto inicial, según los autores, esto puede ocurrir por la interacción de efectos catalíticos del solvente agua y los iones hidronio [H<sup>+</sup>] al disminuir el volumen en la solución que contiene el fármaco que pudo generar una descomposición cinética.

El producto de la cristalización hidrotermal también se analizó por TGA-DSG para verificar si en el proceso realizado hubo descomposición o un producto secundario. En la curva DSC se observó una endoterma con temperatura de pico de 200,6 °C (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), asociado a la temperatura de fusión de la Nitazoxanida, un valor similar a los reportados en la literatura para la forma I.

Figura 41

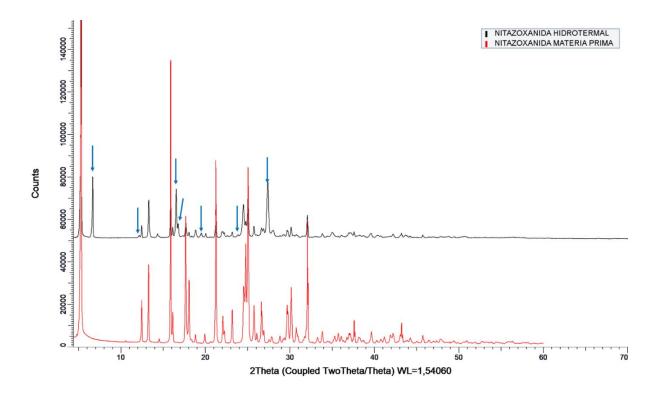
TGA-DSC del producto hidrotermal de la Nitazoxanida



La muestra policristalina se estudió por DRX de polvo y se comparó con el patrón de la materia prima (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Se observó coincidencia de los máximos de mayor intensidad, sin embargo, se aprecian que algunos picos (señalados con las flechas azules) pertenecen a otra fase cristalina diferente a las de E4NTZ y E2NTZ, y que puede deberse a algún producto de la descomposición del compuesto sometido al proceso hidrotermal o a una mezcla de fases. Este patrón de polvo no se pudo indexar debido a posible mezcla de fases cristalinas.

Figura 42

Comparación de patrones de polvo de la Nitazoxanida y el producto hidrotermal

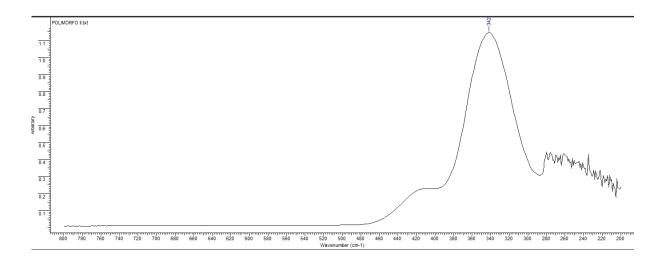


## 6.4. Pruebas de solubilidad en el equilibrio

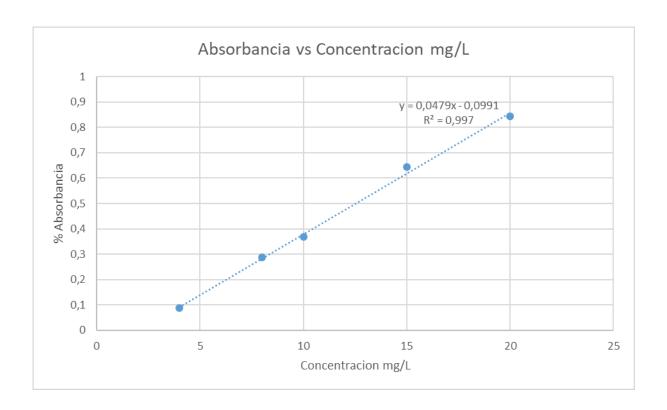
Se tomó una cantidad de 10 mg de Nitazoxanida y se disolvió en una cantidad de 10 mL de solvente (agua) se le realizo el procedimiento descrito en el apartado 0 de la métodologia y se determinó la longitud de onda del máximo de absorción en  $\lambda$ =342 nm ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., se preparó una curva con concentraciones 4, 8, 10, 15 y 20 mg/L y se midió la absorbancia

Figura 43

Espectro UV-VIS de la materia prima de Nitazoxanida



**Figura 44**Curva soluciones de Nitazoxanida



Se realizó la prueba de solubilidad en equilibrio para E2NTZ, E4NTZ y E10NTZ (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), se registró la absorbancia y se determinó la concentración. La muestra E2NTZ presenta una solubilidad en el equilibrio de 1,3 veces mayor comparada con el E4NTZ (polimorfo I) esto representa una mejora significativa en esta propiedad física. La muestra que presento mayor solubilidad es el producto hidrotermal con una concentración de 13,28 mg/L.

**Tabla 17**Resultados de la solubilidad en el equilibrio

Muestra NTZ	Absorbancia	Concentración (mg/L)
E2NTZ	0,138	6,47
E4NTZ	0,211	4,95
E10NTZ	0,537	13,28

#### 7. Conclusiones

Se realizó la caracterización de la materia prima de nitaxozanida mediante técnicas espectroscópicas, térmicas y difractométricas. El indexado de la materia prima arrojó tres soluciones diferentes. Los procesos de descomposición del patrón de polvo usando estas soluciones, arrojaron parámetros de ajuste mayores al 10% y no reproducen el patrón completo sugiriendo que las mismas podrían no corresponder a la estructura cristalina del material.

El material obtenido en el ensayo con la mezcla acetona: agua (E2NTZ), cristaliza en un sistema monoclínico con parámetros de celda a=66,9564(16) Å, b=5,36334(17) Å, c=14,5446(5) Å,  $\alpha$ = $\beta$ = $\gamma$ =90°, siendo una estructura pseudosimétrica debido a que las relaciones entre los parámetros de la celda unidad corresponden a un sistema ortorrómbico pero las operaciones de simetría corresponden a un sistema monoclínico.

La comparación del patrón de difracción de polvo de la materia prima con el patrón calculado utilizando los datos de monocristal del material E2NTZ, se observan coincidencias de las posiciones de los máximos de difracción por lo cual se puede aseverar que la estructura de la materia prima corresponde a la determinada por monocristal.

El sólido obtenido por la evaporación lenta de solvente en metanol (E4NTZ), cristaliza en un sistema ortorrómbico con parámetros de celda a=14,5542(2) Å, b=5,3959(1) Å, c=33,4777(4) Å,  $\alpha$ = $\beta$ = $\gamma$ =90°, similar a la reportada en la base de datos CSD para el polimorfo I, indicando la transformación de fase durante este proceso.

La determinación estructural del E2NTZ y E4NTZ permite establecer que la Nitazoxanida puede cristalizar en más de una forma. Cabe resaltar que el E2NTZ presenta pseudosimetría, lo cual se relaciona con los resultados referentes a la caracterización de la materia prima. El

proceso de cristalización hidrotermal induce la descomposición de la Nitazoxanida. Las pruebas de solubilidad en equilibrio muestran que la materia prima presenta una solubilidad 1,3 veces mayor comparada con el polimorfo I de Nitazoxanida.

## Referencias bibliográficas

- Altomare, A., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G., Rizzi, R., & Werner, P.-E. (2000). New techniques for indexing: N-TREOR in EXPO. *Journal of Applied Crystallography*, 33(4), 1180–1186.
- Anderson, V. R., & Curran, M. P. (2007). Nitazoxanide. *Drugs*, 67(13), 1947–1967.
- Baker, D. (2013). CrysAlisPro: Data Collection and Processing Software for Agilent X-ray Diffractometers.
- Bernstein, J. (2002). Polymorphism in molecular crystals (Vol. 14). Oxford University Press.
- Blake, A. J., Cole, J. M., Evans, J. S. O., Main, P., Parsons, S., & Watkin, D. J. (2009). *Crystal structure analysis: principles and practice* (Vol. 13). Oxford University Press.
- Brittain, H. G. (2016). Polymorphism in pharmaceutical solids. CRC Press.
- Bruno, F. P., Caira, M. R., Monti, G. A., Kassuha, D. E., & Sperandeo, N. R. (2010). Spectroscopic, thermal and X-ray structural study of the antiparasitic and antiviral drug nitazoxanide. *Journal of Molecular Structure*, 984(1–3), 51–57.
- Cains, P. W. (2009). Classical methods of preparation of polymorphs and alternative solid forms. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, 192, 76–138.
- Cuesta, S., & Meneses, L. (2015). Estudio espectroscópico experimental y computacional de Ibuprofeno y sus precursores de síntesis. *La Granja*, 21(1), 5–16.
- David, W. I. F., Shankland, K., Baerlocher, C., & McCusker, L. B. (2002). Structure determination from powder diffraction data (Vol. 13). Oxford University Press on Demand.
- De Villiers, M. M., Terblanche, R. J., Liebenberg, W., Swanepoel, E., Dekker, T. G., & Song,

- M. (2005). Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *38*(3), 435–441.
- Dhanaraj, G., Byrappa, K., Prasad, V., & Dudley, M. (2010). Springer handbook of crystal growth. Springer Science & Business Media.
- Dinnebier, R. E., Leineweber, A., & Evans, J. S. O. (2018). *Rietveld refinement: practical powder diffraction pattern analysis using TOPAS*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Félix-Sonda, B. C., Rivera-Islas, J., Herrera-Ruiz, D., Morales-Rojas, H., & Höpfl, H. (2014).

  Nitazoxanide cocrystals in combination with succinic, glutaric, and 2, 5-dihydroxybenzoic acid. *Crystal Growth & Design*, *14*(3), 1086–1102.
- Fox, L. M., & Saravolatz, L. D. (2005). Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. Clinical Infectious Diseases, 40(8), 1173–1180.
- Gallardo, J. A. G. (2006). Cristalización de proteínas en geles por métodos contradifusivos. Editorial de la Universidad de Granada.
- Gates-Rector, S., & Blanton, T. (2019). The Powder Diffraction File: a quality materials characterization database. *Powder Diffraction*, *34*(4), 352–360.
- Giacovazzo, C., Monaco, H., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G., & Catti, M. (1998). Fundamentals of Crystallography. IUCr Texts on Crystallography. Oxford: Oxford University Press.
- Giencke, J. (2007). Introduction to EVA: A Complete Orientation to Features and Functions.
- Gina, P. (2020). Nitazoxanide with hydroxychloroquine in patients with enhanced risk for severe COVID-19 infection. *African Journal of Thoracic and Critical Care Medicine*, 26(2), 62. https://doi.org/10.7196/ajtccm.2020.v26i2.100

- Giron, D. (1995). Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. *Thermochimica Acta*, 248, 1–59.
- Gu, C.-H., Li, H., Gandhi, R. B., & Raghavan, K. (2004). Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening.

  International Journal of Pharmaceutics, 283(1–2), 117–125.
- Hammond, C. (2001). The basics of cristallography and diffraction (Vol. 214). Oxford.
- Henisch, H. K. (1996). Crystal growth in gels. Courier Corporation.
- Hilfiker, R. (2006). *Polymorphism in the pharmaceutical industry* (Vol. 2). Wiley Online Library.
- Kelleni, M. T. (2020). Nitazoxanide/azithromycin combination for COVID-19: A suggested new protocol for early management. *Pharmacological Research*, *157*(April). https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104874
- Khatri, M., & Mago, P. (2020). Nitazoxanide/Camostat combination for COVID-19: An unexplored potential therapy. *Chemical Biology Letters*, 7(3), 192–196. Retrieved from http://thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/137
- Le Bail, A. (2005). Whole powder pattern decomposition methods and applications: A retrospection. *Powder Diffraction*, 20(4), 316–326.
- Louër, D., & Boultif, A. (2014). Some further considerations in powder diffraction pattern indexing with the dichotomy method. *Powder Diffraction*, 29(S2), S7–S12.
- Mackenzie, C. F., Spackman, P. R., Jayatilaka, D., & Spackman, M. A. (2017). CrystalExplorer model energies and energy frameworks: extension to metal coordination compounds, organic salts, solvates and open-shell systems. *IUCrJ*, 4(5), 575–587.

- Mahmoud, D. B., Shitu, Z., & Mostafa, A. (2020). Drug repurposing of nitazoxanide: can it be an effective therapy for COVID-19? *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1–10.
- Malesuik, M. D., Gonçalves, H. M. L., Garcia, C. V., Trein, M. R., Nardi, N. B., Schapoval, E. E. S., & Steppe, M. (2012). Identification, characterization and cytotoxicity in vitro assay of nitazoxanide major degradation product. *Talanta*, 93, 206–211.
- McCrone, W. C. (1965). Polymorphism in Physics and Chemistry of the Organic Solid State, edited by D. Fox, MM Labes & A. Weissberger, Vol. II. New York: Wiley Interscience.
- Murthy, S. C., Khagga, M., & Bhavani, R. (2015). Monotropically More Stable Novel Polymorph of Nitazoxanide with Improved Aqueous Solubility. *Asian Journal of Chemistry*, 27(12).
- Namatame, Y., & Sato, H. (2013). Evaluation of polymorphic forms by powder X-ray diffraction and thermal analysis methods. *Rigaku J*, 29(3), 8–15.
- Nishinaga, T. (2014). Handbook of Crystal Growth: Fundamentals. Elsevier.
- Raza, K., Kumar, P., Ratan, S., Malik, R., & Arora, S. (2014). Polymorphism: The Phenomenon Affecting the Performance of Drugs. SOJ Pharm Pharm Sci, 1 (2), 10. *Polymorphism: The Phenomenon Affecting the Performance of Drugs*.
- Reffner, J. A., & Ferrillo, R. G. (1988). Thermal analysis of polymorphism. *Journal of Thermal Analysis*, *34*(1), 19–36.
- Rodriguez-Caabeiro, F., Criado-Fornelio, A., Jimenez-Gonzalez, A., Guzman, L., Igual, A., Perez, A., & Pujol, M. (1987). Experimental chemotherapy and toxicity in mice of three mebendazole polymorphic forms. *Chemotherapy*, *33*(4), 266–271.
- Rossignol, J. (2016). Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of Middle East

- respiratory syndrome coronavirus. Journal of Infection and Public Health, 9(3), 227–230.
- Rossignol, J., & Cavier, R. (1976, April 13). *New derivatives of 2-benzamido-5-nitro thiazoles*. Google Patents.
- Sánchez, E., Jung, H., Yépez, L., & Hernández-Abad, V. (2007). Relevancia del polimorfismo en el área farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(2), 57–76.
- Sheldrick, G. M. (2008). A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A:*Foundations of Crystallography, 64(1), 112–122.
- Sheldrick, G. M. (2015a). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 71(1), 3–8.
- Sheldrick, G. M. (2015b). SHELXT–Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, 71(1), 3–8.
- Smith, G. S., & Snyder, R. L. (1979). FN: A criterion for rating powder diffraction patterns and evaluating the reliability of powder-pattern indexing. *Journal of Applied Crystallography*, *12*(1), 60–65.
- Spackman, M. A., & Jayatilaka, D. (2009). Hirshfeld surface analysis. *CrystEngComm*, 11(1), 19–32.
- Spek, A. L. J. (2003). Single-crystal structure validation with the program PLATON. *Journal of Applied Crystallography*, *36*(1), 7–13.
- Suresh, K., Mannava, M. K. C., & Nangia, A. (2016). Cocrystals and alloys of nitazoxanide: enhanced pharmacokinetics. *Chemical Communications*, *52*(22), 4223–4226.
- Sweetman, S. C. (2009). Martindale: the complete drug reference (Vol. 3709). Pharmaceutical

# ESTUDIO POLIMÓRFICO DE LA NITAZOXANIDA press London.

- Tandon, R., Tandon, N., Gupta, N., & Gupta, R. (2018). Art of synthesis of desired polymorphs: A review. *Asian J. Chem*, *30*, 5–14.
- Tayde, D., Sarwade, S. S., Jadhav, W. N., & Khade, B. C. (2015). A study on the complexes of transition metals with nitazoxanide. *Archives of Applied Science Research*, 7(1), 28–35.
- Veseli, A., Žakelj, S., & Kristl, A. (2019). A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(11), 1717–1724.
- Visser, J. W. (1969). A fully automatic program for finding the unit cell from powder data. *Journal of Applied Crystallography*, 2(3), 89–95.