



INTERAÇÃO FÁRMACO-FÁRMACO: CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE UM NOVO EUTÉTICO DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E PIRAZINAMIDA

DRUG-DRUG INTERACTION: SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF A NEW EUTECTIC OF ACETYLSALICYLIC ACID AND PYRAZINAMIDE

Luis H. S. Queiroz^{1*}, Ariene de M. Alves¹, Ylana M. M. Lima¹, Clenilton C. Santos²,
Paulo R. S. Ribeiro¹

1. Núcleo de Ciências Farmacêuticas e Química Analítica Aplicada (NUPFARQ), Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM), Centro de Ciências de Imperatriz (CCIM), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Imperatriz, MA, Brasil, CEP: 65.900-410.
2. Departamento de Física, CCET, Universidade Federal do Maranhão, CEP: 65085-580, São Luís, MA, Brasil

*luis.queiroz@discente.ufma.br

RESUMO

A pirazinamida (PZA) é um pró-fármaco utilizado no tratamento da tuberculose, que pode causar efeitos adversos como dor poliarticular, sendo que é recomendado o uso de ácido acetilsalicílico (AAS) para aliviar essas dores. O AAS é um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal. Neste estudo foi obtido um novo eutético de AAS-PZA utilizando o método da moagem mecanoquímica líquido-assistida. As amostras foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia Raman (ER) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A partir das curvas DSC, foram construídos o diagrama de fases binário e triângulo de Tamman para determinar a estequiometria para a formação do eutético. Os espectros FT-IR e Raman não evidenciaram a ocorrência de interações intermoleculares entre os compostos de partida. Entretanto, a mistura binária AAS-PZA na proporção molar de 2:1 apresentou fusão congruente e maior entalpia de fusão, confirmando a ocorrência de interação física entre os compostos de partida e, portanto, esta razão molar equivale à relação estequiométrica para formação do eutético. Além disso, observou-se que este material apresentou ponto de fusão inferior a aqueles apresentados pelos seus precursores, indicando o aumento da hidrossolubilidade destes fármacos quando dispersos na mistura eutética. Assim, o material obtido neste trabalho é muito atrativo para a produção de medicamentos tuberculostáticos, pois ele contribuirá para o aumento da biodisponibilidade e da eficácia terapêutica destes fármacos.

Palavras-chave: Eutético, pirazinamida, ácido acetilsalicílico, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman.

ABSTRACT

Pyrazinamide (PZA) is a prodrug used in the treatment of tuberculosis, which can cause adverse effects such as polyarticular pain, and the use of acetylsalicylic acid (AAS) is

recommended to reduce this pain. AAS is a non-steroidal anti-inflammatory drug. In this study, a new AAS-PZA eutectic was obtained using the liquid-assisted grinding method. The samples were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Raman spectroscopy (ER) and differential scanning calorimetry (DSC). From the DSC curves, the binary phase and Tamman's triangle diagrams were constructed to determine the stoichiometry for the formation of the eutectic. The FT-IR and Raman spectra showed no intermolecular interactions between the starting compounds. However, the AAS-PZA binary mixture at a molar ratio of 2:1 showed congruent melting and a higher melting enthalpy, confirming the occurrence of physical interaction between the starting compounds and, therefore, this molar ratio is equivalent to the stoichiometric ratio for the formation of the eutectic. In addition, it was observed that this material had a lower melting point than its precursors, indicating an increase in the water-solubility of these drugs when dispersed in the eutectic mixture. Thus, the material obtained in this work is very attractive to produce tuberculostatic drugs, as it will contribute to increasing the bioavailability and therapeutic efficacy of these drugs.

Keywords: Eutectic, pyrazinamide, acetylsalicylic acid, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* [1,2]. A TB foi a patologia infecciosa que causou o maior número de mortes em 2021 [3]. Segundo informações da Organização Mundial da Saúde (OMS), entre os anos de 2019 e 2020, houve um aumento no número de mortes (de 1,4 milhão para 1,5 milhão) causadas pela TB. Entretanto, o número de novos casos diagnosticados reduziu de 7,1 milhões para 5,8 milhões no mesmo período, representando uma redução de 18% em relação aos dados de 2012 com 1,3 milhões de mortes por TB [3,4].

O tratamento de primeira linha da TB consiste em um esquema combinado de medicamentos contendo isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (PZA) durante seis meses. Este tratamento é tão eficaz que, no caso de uma cepa não resistente e de uma terapia seguida até ao fim, o risco de reincidência é de apenas 5-8%. A introdução da PZA neste tratamento reduziu a sua duração em três meses [3]. Entretanto, o uso da PZA, em período prolongado, pode causar dor poliarticular (poliartralgia) e, neste caso, recomenda-se o uso de ácido acetilsalicílico (AAS) para o tratamento deste sintoma. Além disso, a PZA não deve ser administrada aos pacientes com antecedentes de artrite gotosa aguda devido à sua capacidade de aumentar as concentrações de ácido úrico [5].

O AAS, conhecido quimicamente como ácido 2-acetoxibenzóico, é um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal [6]. Ele possui ação antitérmica, analgésica, antitrombótico e anti-inflamatória [7]. Este fármaco é classificado como Classe I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), pois apresenta boa hidrossolubilidade (3,3 mg/mL) e alta permeabilidade membranar [8]. O AAS apresenta dois polimorfos denominados Formas I e II e possui $pK_a = 3,5$ devido ao grupamento carboxílico [9,10].

A PZA, conhecida quimicamente como pirazina-2-carboxamida, é um pró-fármaco derivado da nicotinamida e metabolizado por uma enzima bacteriana (pirazinamidase) para se converter em ácido pirazinóico [3]. Seu uso reduziu o tempo de tratamento de 9 meses para 6 meses [11]. Este fármaco pertence à Classe III do SCB, apresentando boa solubilidade aquosa (12 mg/mL) e baixa permeabilidade membranar [8]. A PZA apresenta $pK_a = 0,5$ referente ao grupamento amida e pode ser encontrada em quatro formas polimórficas, nomeadas como α ,

β , γ e δ . A forma α é a mais estável e encontrada comercialmente [12]. As formas β , γ e δ são metaestáveis e transitam para forma α em temperatura ambiente [13]. Até o momento, foram relatados um composto eutético de PZA com a isoniazida e outros tipos de dispersões sólidas da PZA para melhorar sua solubilidade aquosa e dissolução intrínseca [11,14-16].

A mistura eutética pode ser formada pela mistura de dois ou mais componentes que, quando fundidos juntos, formam uma mistura líquida com uma temperatura de fusão mais baixa que aquela apresentada pelos componentes individuais. Essa mistura líquida exibe uma solubilidade máxima na proporção estequiométrica específica, na qual os componentes estão completamente miscíveis. Assim, um composto eutético é uma mistura de composição específica que possui um ponto de fusão mínimo, onde todos os componentes estão completamente solubilizados [17]. A construção do diagrama de fases e do triângulo de Tamman é realizada para determinar o ponto eutético utilizando a temperatura e entalpia de fusão, respectivamente, dos compostos de partida e das misturas binárias obtidas para investigar o sistema eutético [18].

Neste estudo, preparou-se uma mistura eutética entre o ácido acetilsalicílico e a pirazinamida pelo método de moagem mecanoquímica líquido-assistida (MMLA). Diagramas de fase binário e triângulo de Tamman do sistema AAS-PZA foram construídos para determinar a estequiometria do composto eutético. As caracterizações no estado sólido foram realizadas com as técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e espectroscopia Raman (ER).

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação da mistura eutética AAS-PZA (2:1)

Todos os reagentes e solvente utilizados foram da marca Sigma-Aldrich e apresentavam elevado grau de pureza ($\geq 99,0\%$). Para a obtenção do eutético AAS-PZA (2:1) foram pesadas 75,28 mg de AAS e 25,72 mg de PZA. Em seguida, essas massas foram trituradas em um almofariz de ágata com seis gotas de etanol durante 20 min pelo método da moagem mecanoquímica líquido-assistida (MMLA). Posteriormente, os materiais foram colocados em uma estufa com circulação forçada de ar, a $50,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Para verificação da estequiometria de formação do composto eutético AAS-PZA, foram preparadas proporções molares de 5:1 a 1:5. A mistura física AAS-PZA (2:1)_{MF} foi preparada com uma mistura simples das massas dos compostos de partida em um almofariz de ágata com auxílio de uma espátula durante 2 min.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros FT-IR foram obtidos em um espectrômetro marca *Bruker* modelo *Vertex 70V*. Foram realizadas 32 varreduras, em resolução espectral de 2 cm^{-1} na região de número de onda de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. As análises foram realizadas utilizando a técnica de pastilhas de brometo de potássio (KBr), com composição percentual de 98% de KBr e 2% de amostra, prensadas sob uma carga de 8 toneladas por um tempo médio de 30s.

Espectroscopia Raman (ER)

Os espectros de ER foram obtidos utilizando Espectrômetro Triplo, marca HORIBA Jobin-Yvon e modelo T64000, equipado com detector CCD (Dispositivo Sensível a Carga) e resfriado a ar. A fonte de excitação utilizada foi um laser verde operando na linha de 532 nm,

com resolução espectral de 2 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente ($25,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) na região compreendida entre 70 e 3600 cm^{-1} .

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC das amostras foram obtidas em um analisador térmico marca *Shimadzu Instruments* modelo *DSC-60* realizando ciclos únicos de aquecimento dentro da faixa de temperatura de estabilidade térmica de cada composto, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min e com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$. Foram utilizados cadinhos de alumínio fechado para realização das análises. O equipamento de DSC foi previamente calibrado para a temperatura e energia utilizando como padrão a temperatura e entalpia de fusão do Índio metálico ($T_{\text{onset}} = 156,4\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus}} = 28,5\text{ J/g}$) com pureza de $99,99\%$. Os fatores de correção foram calculados conforme procedimento e especificação do fabricante. Todas as medidas foram realizadas sob pressão atmosférica, utilizando-se massas de amostras aproximadamente de $2,00\text{ mg}$.

Diagrama de fases binário e triângulo de Tamman

O diagrama de fases binário e o triângulo de Tamman foram obtidos com as frações molares de AAS-PZA de $0,16$, $0,20$, $0,25$, $0,33$, $0,50$, $0,66$, $0,75$, $0,80$ e $0,83$. As temperaturas e entalpias de fusão dos compostos eutéticos foram utilizadas para construir o diagrama de fases binário e o triângulo de Tamman, respectivamente. O diagrama de fases binário teórico foi calculado utilizando a Eq. 1 de Schröder-Van Laar:

$$\ln(X) = \frac{\Delta H_0}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \quad (1)$$

onde ΔH_0 é o calor de fusão (J mol^{-1}) e T_0 é a temperatura de fusão (K) dos compostos de partida na mistura eutética. T é o ponto de fusão da mistura binária em uma determinada fração molar, X , e R é a constante dos gases ($8,314\text{ J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$) [11].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As misturas binárias de AAS-PZA em diferentes razões molares ($5:1$ até $1:5$) foram preparadas pelo método da moagem mecanoquímica líquido-assistida (MMLA). A partir dos resultados obtidos das análises desta mistura binárias, observou-se que a razão estequiométrica para formação do eutético foi de $2:1$, como mostrado pelo diagrama de fases binário e pelo triângulo de Tamman.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A Fig. 1 mostra os espectros FT-IR dos compostos de partida triturados por MMLA (AAS_{LAG} e PZA_{LAG}), do eutético AAS-PZA ($2:1$) e da mistura física AAS-PZA ($2:1$)_{MF}. O espectro do AAS_{LAG} apresentou bandas vibracionais características da sua Forma I [19]. As regiões espectrais $3040\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$ e $2970\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ estão atribuídas as vibrações de estiramento do CH do anel aromático e as vibrações de estiramento simétrico e assimétrico do grupo metil $-\text{CH}_3$, respectivamente. Em 1754 cm^{-1} e 1692 cm^{-1} , são observadas bandas intensas relacionadas à vibração do $\text{C}=\text{O}$. A vibração aromática $\nu\text{C}=\text{C}$ ocorre em 1605 cm^{-1} , uma vibração no plano $\nu\text{C}-\text{O}-\text{H}$ é caracterizada pela absorção em 1457 cm^{-1} . Bandas em 1419

cm^{-1} e 1371 cm^{-1} são caracterizadas pela vibração no plano $\nu\text{O-H}$. Observou-se uma intensa banda em 1307 cm^{-1} que corresponde pela vibração de deformação $\delta_{\text{as,s}}\text{C-H}$. A vibração $\nu\text{C-O}$ apresenta uma banda em 1221 cm^{-1} e uma banda com intensidade moderada em 1188 cm^{-1} está atribuída a vibração $\nu\text{O-C=C}$. As bandas em 917 , 840 , 803 e 754 cm^{-1} caracterizam-se pelo dobramento fora do plano do C-H do anel fenil. A vibração do dobramento fora do plano C-C ocorre em 704 cm^{-1} .

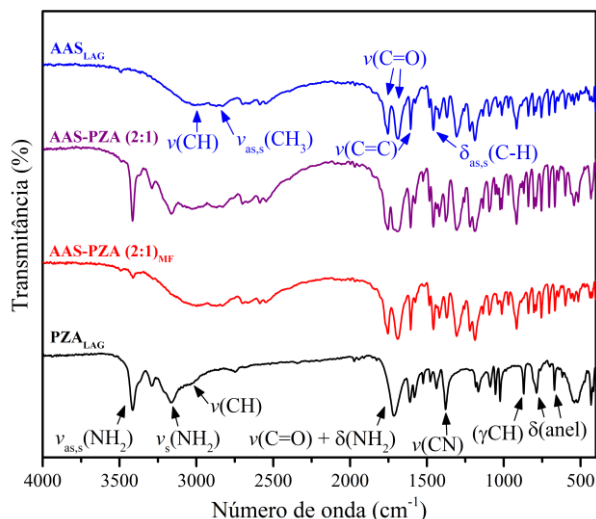


Fig. 1 – Espectros FT-IR do AAS_{LAG} , do eutético AAS-PZA (2:1) , da mistura física $\text{AAS-PZA (2:1)}_{\text{MF}}$ e da PZA_{LAG} .

O espectro da PZA_{LAG} apresentou vibrações características da sua Forma α [20]. As principais bandas de vibração estão destacadas na Figura 2. A vibração de estiramento assimétrico e simétrico do grupo NH_2 foi observada em 3412 cm^{-1} . Vibrações simétricas $\nu(\text{NH}_2)$ foram observadas em 3364 cm^{-1} (sh), 3211 cm^{-1} (sh) e 3163 cm^{-1} . A vibração $\nu(\text{CH})$ ocorre em 3086 cm^{-1} . Observou-se uma banda intensa em 1714 cm^{-1} caracterizada pela vibração $\nu(\text{C=O}) + \delta(\text{NH}_2)$ da amida. A vibração de dobramento no plano $\delta(\text{NH}_2)$ ocorre na banda em 1611 cm^{-1} . As bandas em 1582 , 1525 , 1479 e 1438 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações do anel pirazina. A vibração $\nu(\text{C-N})$ da amida ocorre em 1379 cm^{-1} . Outras vibrações em menores números de ondas estão relacionadas com dobramento no plano e fora do plano do anel pirazina da PZA.

De acordo com os dados apresentados na Fig.1, nota-se que os espectros da mistura eutética AAS-PZA (2:1) e da mistura física $\text{AAS-PZA (2:1)}_{\text{MF}}$ apresentaram bandas vibracionais características dos grupos funcionais dos compostos de partida. Logo, não há evidência da ocorrência de interações intermoleculares entre o AAS e a PZA, tal como ocorre nos compostos eutéticos. O espectro da mistura física apresentou resultado semelhante, comprovando que o contato imediato também não resulta em interação entre os compostos. Vale ressaltar que, quando há a ocorrência de interações intermoleculares, há alterações no número de onda das frequências vibracionais e, conseqüentemente, configura-se a formação de uma nova fase, tal como os cocristais e os sais [18].

Espectroscopia Raman (ER)

A Fig. 2 apresenta os modos de rede do AAS_{LAG} , da PZA_{LAG} , do composto eutético AAS-PZA (2:1) e da sua mistura física $\text{AAS-PZA (2:1)}_{\text{MF}}$. O intervalo espectral mais utilizado na espectroscopia Raman abrange os números de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} . O espectro vibracional de baixa frequência (abaixo de 200 cm^{-1}) mostra modos vibracionais que em geral são denominados de modos externos ou de rede, com ampla relevância na

identificação de bandas vibracionais de compostos de partida e de dispersões sólidas de fármacos utilizando Raman com variação de temperatura.

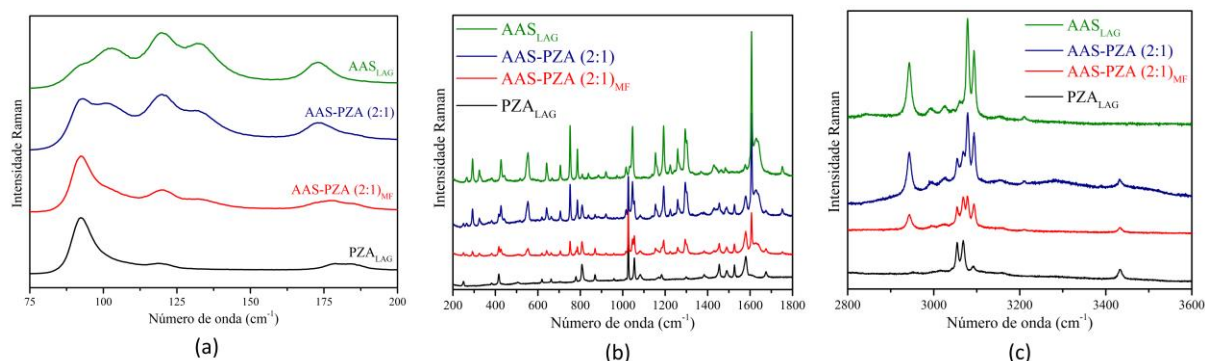


Fig. 2 - Espectros Raman obtidos para o AAS_{LAG}, a PZA_{LAG}, a mistura física AAS-PZA (2:1)_{MF} e do composto eutético AAS-PZA (2:1) preparado por moagem mecanoquímica líquida-assistida em região com número de onda entre: (a) 75 e 200 cm⁻¹, (b) 200 e 1800 cm⁻¹ e (c) 2800 e 3600 cm⁻¹.

Pela análise dos espectros Raman obtidos neste estudo, observou-se que as bandas vibracionais identificadas na mistura eutética AAS-PZA (2:1) e na mistura física apresentaram bandas vibracionais características dos grupos funcionais dos compostos de partida (AAS_{LAG} e PZA_{LAG}) como observado nos espectros FT-IR. Assim, foi possível confirmar que não há evidências de interações intermoleculares entre os compostos de partida, como esperado para as misturas eutéticas.

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e diagramas de fase binário e triângulo de Tamman

Na Fig.3 são apresentados as curvas DSC do AAS_{LAG}, da PZA_{LAG} e das proporções molares do sistema AAS-PZA, os diagramas de fases binário e triângulo de Tamman. O sistema AAS-PZA apresentou um evento térmico de fusão entre 111-114 °C.

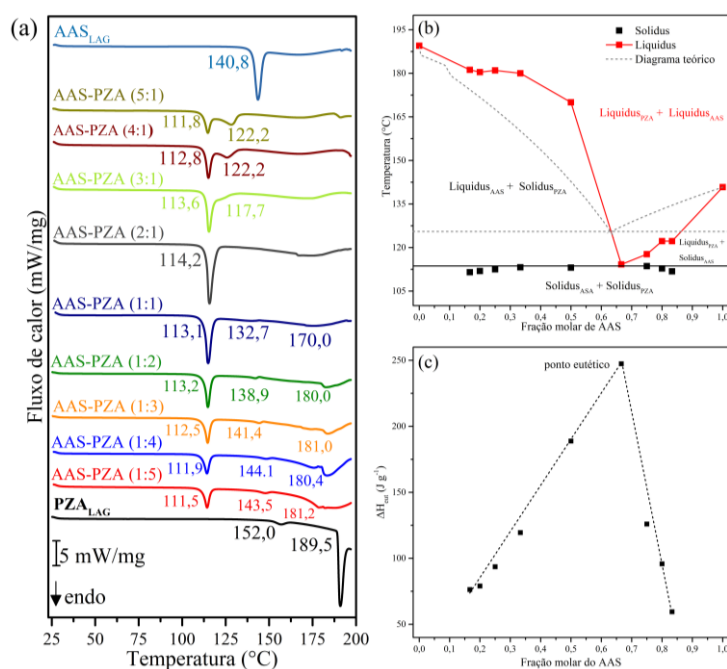


Fig. 3 – (a) Curvas DSC obtidas para o sistema AAS-PZA nas proporções molares 5:1 a 1:5; (b) Diagrama de fase binário do sistema AAS-PZA e (c) triângulo de Tamman.

A fusão congruente no diagrama de fase e a inflexão do triângulo de Tamman indicou que a proporção estequiométrica do sistema AAS-PZA é 2:1 ou 0,67 de fração de AAS. O perfil destes diagramas são característicos de compostos eutéticos como relatado por Bazzo (2020) [18].

CONCLUSÕES

A caracterização espectroscópica do eutético AAS-PZA (2:1) não evidenciaram o estabelecimento de interações intermoleculares. A estequiometria do composto eutético do sistema AAS-PZA foi determinada pela fusão congruente observada no diagrama de fases binário e pelo calor de fusão no triângulo de Tamman construídos a partir das curvas DSC. O ponto de fusão do eutético é inferior aos pontos de fusão dos compostos de partida, indicando o aumento da hidrossolubilidade do AAS e da PZA, além da possibilidade de utilizar esses dois fármacos para tratamento da tuberculose e dos efeitos adversos causados durante a terapia medicamentosa como dor poliarticular, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMA, ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Singh, V.; Chibale, K. *Accounts of Chemical Research* **2021**, 54, 2361-2376, <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00878>.
2. Salem, A.; Khanfar, E.; Nagy, S.; Széchenyi, A. C *International Journal of Pharmaceutics* **2022**, 623, 121924, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121924>.
3. Bourguignon, T.; Godinez-Leon, J.A.; Gref, R. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 393. doi: 10.3390/pharmaceutics15020393
4. Shah, T.; Shah, Z.; Yasmeen, N.; Baloch, Z.; Xia, X. *Frontiers in immunology* **2022**, 13, 909011, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.909011>.
5. Hall II, R.G.; Leff, R.D.; Gumbo, T. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **2009**, 29, 1468-1481, doi:<https://doi.org/10.1592/phco.29.12.1468>.
6. Osmanović Omerdić, E.; Alagić-Džambić, L.; Krstić, M.; Pašić-Kulenović, M.; Odović, J.; Vasiljević, D. *Applied Sciences* **2020**, 10, 4792. doi: 10.3390/app10144792
7. Bianconi, V.; Violi, F.; Fallarino, F.; Pignatelli, P.; Sahebkar, A.; Pirro, M. *Drugs* **2020**, 80, 1383-1396. doi: 10.1007/s40265-020-01365-1
8. Amidon, G.L.; Lennernäs, H.; Shah, V.P.; Crison, J.R. *Pharmaceutical Research* **1995**, 12, 413-420, doi:10.1023/A:1016212804288.
9. Vieira, A.W.; Molina, G.; Mageste, A.B.; Rodrigues, G.D.; de Lemos, L.R. *Journal of Molecular Liquids* **2019**, 296, 111775, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111775>.
10. Peksa, P.; Trzmiel, J.; Ptak, M.; Kostrzewa, M.; Szatanik, R.; Barascu, A.; Enke, D.; Sieradzki, *Journal of Materials Science* **2019**, 54, 404-413, doi:10.1007/s10853-018-2853-8.
11. Ngilirabanga, J.B.; Aucamp, M.; Pires Rosa, P.; Samsodien, H. *Frontiers in chemistry* **2020**, 8, 595908. doi: 10.3389/fchem.2020.595908/full
12. Maharana, A.; Sarkar, D. *Fluid Phase Equilibria* **2019**, 497, 33-54. doi: 10.1016/j.fluid.2019.06.004
13. Zhang, J.; Liang, Z.; Ji, S.; Wang, X.; Lan, P. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, 329, 115572. doi: 10.1016/j.molliq.2021.115572
14. Rajbongshi, T.; Sarmah, K.K.; Sarkar, A.; Ganduri, R.; Cherukuvada, S.; Thakur, T.S.; Thakuria, R. *Crystal growth & design* **2018**, 18, 6640-6651. doi: 10.1021/acs.cgd.8b00878
15. Al-Otaibi, J.S.; Mary, Y.S.; Armaković, S.; Thomas, R. *Journal of Molecular Structure* **2020**, 1202, 127316. doi: 10.1016/j.molstruc.2019.127316
16. Al-Otaibi, J.S.; Mary, Y.S.; Mary, Y.S.; Panicker, C.Y.; Thomas, R. *Journal of Molecular Structure* **2019**, 1175, 916-926. doi: 10.1016/j.molstruc.2018.08.055
17. Chow, K.; Tong, H.H.; Lum, S.; Chow, A.H. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, 97, 2855-2877. doi: 10.1002/jps.21212
18. Bazzo, G.C.; Pezzini, B.R.; Stulzer, H.K. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, 588, 119741. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119741
19. Tita, D.; Jurca, T.; Fulias, A.; Marian, E.; Tita, B. *Journal of thermal analysis and calorimetry* **2013**, 112, 407-419. doi: 10.1007/s10973-013-2937-2
20. Castro, R.A.; Maria, T.M.; Évora, A.O.; Feiteira, J.C.; Silva, M.R.; Beja, A.M.; Canotilho, J.; Eusébio, M.E.S. *Crystal growth & design* **2010**, 10, 274-282. doi: 10.1021/cg900890n