



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS FORMAS
POLIMÓRFICAS DE CEFADROXILA E CEFALEXINA
POR RMN DE SÓLIDOS**

Daniel Lima Marques de Aguiar

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Rosane Aguiar da Silva San Gil

Rio de Janeiro, Abril de 2011

A282

Aguiar, Daniel Lima Marques de.
Preparação e caracterização de novas formas polimórficas de cefadroxila e cefalexina por RMN de sólidos / Daniel Lima Marques de Aguiar – Rio de Janeiro : UFRJ, 2011.
xvii, 130 f.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós graduação em Química, 2011.

Orientador: Rosane Aguiar da Silva San Gil.

1. Polimorfismo. 2. Cefadroxila. 3. Cefalexina. 4. RMN de sólidos. I. San Gil, Rosane Aguiar da. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

CDD 543.0877

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS FORMAS POLIMÓRFICAS DE CEFADROXILA E CEFALEXINA POR RMN DE SÓLIDOS

Daniel Lima Marques de Aguiar

Orientador: Rosane Aguiar da Silva San Gil

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada por:

Prof^a.Rosane Aguiar da Silva San Gil (DSc) – UFRJ/IQ

Profa Vera Lúcia Pereira Soares (PhD) – UFRJ/IQ

Prof. Peter Rudolf Seidl (PhD) – UFRJ/EQ

Prof.Lúcio Mendes Cabral (DSc) – UFRJ/FF

Ao Senhor Deus, que sempre me acompanhou e proveu todos os meios necessários para que esta dissertação um dia fosse escrita.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Rosane Aguiar da Silva San Gil, pelos ensinamentos técnicos, de vida (que não encontram-se nos livros), e principalmente pela alegria em fazer ciência genuína.

À minha família, D. Ilza (mãe), Seu Gercy (pai), Beth (irmã), Gareth (irmã), Felipe (sobrinho), Lucas (sobrinho), Isabelle (sobrinha), Raphael (sobrinho) e Wagner (cunhado), que a cada ida para Vitória me recebiam com sorrisos e a cada despedida me encorajavam a prosseguir, mesmo que com a voz embargada.

Ao Prof. Roberto Pereira Santos, que me acolheu, me orientou na Iniciação científica, mesmo após eu graduado.

À Farmácia Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pela doação de excipientes.

Ao Laboratório de avaliação e síntese de substâncias Bioativas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo uso do aparelho de FTIR.

Ao Laboratório de Análise Instrumental do Instituto de Macromoléculas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo uso do difratômetro de raios X e do aparelho de TG e DSC.

Ao Laboratório de Físico-Química de Minerais e Catálise, da Universidade Federal do Ceará, pelas análises de TG e DSC.

À Fundação Oswaldo Cruz/Farmanguinhos pelas análises de DSC.

Ao Laboratório de ensaios não destrutivos, corrosão e soldagem (LNDC) da COPPE-UFRJ, e ao Centro de Pesquisas de Energia Elétrica (CEPEL), pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Pamonha e Cabeçudo, vulgo Paulo Henrique e Rodolfo, que sempre me apoiaram desde o início deste projeto.

À Fábio Jr., que além de amigo é um homem verdadeiramente de Deus e que me ajudou muito, mesmo sem saber, nesse tempo no Rio de Janeiro.

À equipe do LabRMN (Leandro, Madame Zenaide, Marcelo, Claudinha, Luciana, Hélio, Luís, Beth e Prof. Kaiser) pela acolhida, pelo companheirismo, e pela excelente convivência cotidiana.

Aos amigos da República de Niterói (Icaraí e Ingá) que mesmo sem querer me fizeram uma pessoa melhor.

À Milena B. Barreto, pela paciência, pela amizade e pelo companheirismo incondicional

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse como é.

Resumo

Aguiar, D.L.M. **Preparação e caracterização de novas formas polimórficas de cefalexina e cefadroxila por RMN de sólidos**. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Um novo polimorfo da cefadroxila e quatro novos polimorfos da cefalexina foram preparados e caracterizados por difratometria de raios X (DRX), termogravimetria (TG/DTG), calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia de infravermelho médio (FTIR), ressonância magnética nuclear em solução (RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$) e de sólidos (RMN CPMAS de ^{13}C e ^{15}N) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A ressonância magnética nuclear de sólidos evidenciou as diferenças entre as amostras estudadas, incluindo-se o polimorfo amorfo. Para a amostra padrão de cefalexina foram encontrados sinais triplicados nos espectros de RMN CPMAS de ^{13}C e de ^{15}N , enquanto para a amostra padrão de cefadroxila, apenas um sinal foi observado para cada carbono e cada nitrogênio presente. Adicionalmente à caracterização dos polimorfos preparados também foram analisadas amostras de medicamentos comerciais disponíveis no comércio, assim como os distribuídos na rede pública de saúde brasileira. Os resultados das análises permitiram a identificação de formas polimórficas similares em todos os medicamentos analisados e idênticas a do fármaco padrão Sigma Aldrich. Os espectros de FTIR e RMN CPMAS de ^{13}C apresentaram-se sobreponíveis, salvo os sinais de excipientes encontrados em alguns medicamentos. Apenas um dos polimorfos preparados nesta dissertação foi encontrado nos medicamentos analisados. A RMN de sólidos mostrou ser uma ferramenta adequada para a caracterização de diferentes polimorfos da cefadroxila e da cefalexina.

Palavras-chave: Polimorfismo, Cefalexina, Cefadroxila, RMN de sólidos, Biodisponibilidade.

Abstract

Aguiar, D.L.M. **Preparation and characterization of new polymorphic types of cephalexin and cefadroxil through solid NMR.** Rio de Janeiro, 2011. Dissertation (Masters in Chemistry), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

A new cefadroxil polymorph and four new polymorphs of cephalexin were prepared and characterized through X-ray diffractometry (XRD), thermal gravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance in solution (^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$) NMR and in solid state (^{13}C and ^{15}N CPMAS NMR) and scanning electron microscopy. Solid state nuclear magnetic resonance evidenced the differences between the samples under study, including the amorphous polymorph. For the standard cephalexin sample it was found triplicated signals in ^{13}C and ^{15}N NMR CPMAS spectra, whereas for the standard sample of cefadroxil only one signal was observed for each carbon and each nitrogen present. In addition to the polymorphs characterization of prepared samples. The commercial medicines available in the Brazilian market were also analyzed, so as the ones distributed through Brazilian public health service. The results enabled the identification of similar polymorphic types in all the medicine analyzed, which are identical to the Sigma Aldrich standard drug. FTIR and ^{13}C CPMAS NMR spectra seemed to be overlapping, except for the signals from excipients found in some medicines. Only one of the polymorphs studied in this dissertation was found in the medicines analyzed. Solid state NMR has proved to be an adequate tool for the characterization of different cefadroxil and cephalexin polymorphs.

Keywords: Polimorphism, Solid state NMR, Cephalexin, Cefadroxil, Biodisponibility

ÍNDICE GERAL

	Pág.
Ficha catalográfica	ii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Estruturas cristalinas de um sólido	7
2.2 Polimorfismo	8
2.3 Polimorfismo na indústria farmacêutica aplicado a medicamentos, fármacos e excipientes	12
2.4 Antibacterianos β lactâmicos: Cefalosporinas	14
2.5 Técnicas de caracterização de polimorfos	16
2.5.1 Difractometria de raios X	16
2.5.2 Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varredura	17
2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura	19
2.5.4 Espectroscopia na região do infravermelho	19
2.5.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	20
2.6 Caracterização de sistemas polimórficos β -lactâmicos:cefalosporinas	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Reagentes e solventes	24
3.2 Fármacos, medicamentos e excipientes	24
3.3 Preparação de polimorfos	26
3.3.1 Cefadroxila anidra	26
3.3.2 Cefalexina per-hidratada	26
3.3.3 Cefalexina contaminante	26
3.3.4 Cefalexina liofilizada	26
3.3.5 Cefalexina recristalizada em metanol	27
3.3.6 Cefalexina anidra	27
3.4 Técnicas de Caracterização	27
3.4.1 Ponto de Fusão	27
3.4.2 Difractometria de raios X	27
3.4.3 Termogravimetria	27
3.4.4 Calorimetria diferencial de varredura	28
3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho	29
3.4.6 Ressonância magnética nuclear em solução: RMN de ^1H e	29

	de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	
3.4.7	Ressonância magnética nuclear de sólidos: RMN CPMAS de ^{13}C e ^{15}N	30
3.4.8	Microscopia eletrônica de varredura	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Cefadroxila	33
4.1.1	Caracterização de polimorfos da cefadroxila	34
4.1.1.1	Difratometria de raios X	34
4.1.1.2	Termogravimetria	37
4.1.1.3	Calorimetria diferencial de varredura	39
4.1.1.4	Espectroscopia na região do infravermelho	42
4.1.1.5	Ressonância magnética nuclear em solução: RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	44
4.1.1.6	Ressonância magnética nuclear de sólidos	46
4.1.1.7	Microscopia eletrônica de varredura	51
4.1.2	Medicamentos de cefadroxila	53
4.2	Cefalexina	57
4.2.1	Caracterização da cefalexina padrão Sigma Aldrich	57
4.2.1.1	Difratometria de raios X	57
4.2.1.2	Análise termogravimétrica	59
4.2.1.3	Calorimetria diferencial de varredura	61
4.2.1.4	Espectroscopia na região do infravermelho	62
4.2.1.5	Ressonância magnética nuclear em solução: RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	65
4.2.1.6	Ressonância magnética nuclear de sólidos	67
4.2.1.7	Microscopia eletrônica de varredura	71
4.2.2	Caracterização de polimorfos de cefalexina obtidos em laboratório	73
4.2.2.1	Difratometria de raios X	73
4.2.2.2	Análise termogravimétrica	75
4.2.2.3	Calorimetria diferencial de varredura	81
4.2.2.4	Ressonância magnética nuclear de sólidos	83
4.2.3	Caracterização de medicamentos de cefalexina	86
5.	CONCLUSÕES	93
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
7.	ANEXOS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1	Formas de organização possíveis de um material sólido	2
Figura 1.2	Estrutura da Cefalosporina C	4
Figura 2.1	Esquemas iconográficos de sistemas polimórficos: a) enantiotrópicos e b) monotrópicos	9
Figura 2.2	Esquemas que evidenciam alguns dos diferentes tipos de polimorfismo existentes. (a) Polimorfismo conformacional: Exibido em substâncias nas quais as moléculas são flexíveis o suficiente para adotar diferentes conformações ao cristalizar-se. (b) Polimorfismo de empacotamento: Ocorre quando as moléculas são rígidas e empacotam-se de maneira diferente para formar um cristal	10
Figura 2.3	Esquemas ilustrativos da competição entre as conformações para produção de um polimorfo específico (Adaptado de DERDOUR, 2011)	11
Figura 2.4	Estrutura da primeira Penicilina isolada	14
Figura 2.5	Reação catalisada pelas transpeptidases	15
Figura 2.6	Esqueletos presentes nas estruturas das cefalosporinas (I) e das penicilinas (II). Estão evidenciados os arranjos dos amino-ácidos valina (Val) e cisteína (Cys) em cada caso (PATRICK, 1995).	15
Figura 4.1	Estrutura química da cefadroxila	33
Figura 4.2	Difratograma de raios X. (A) cefadroxila padrão Sigma Aldrich (B) cefalexina anidra	35
Figura 4.3	Difratogramas apresentados nos trabalhos de (A) Brittain, 2007 e (B) Letho e Laine, 1998	36
Figura 4.4	Análise termogravimétrica da Cefadroxila padrão Sigma Aldrich	38
Figura 4.5	Análise termogravimétrica da cefadroxila Anidra	39
Figura 4.6	Calorimetria diferencial de varredura da cefadroxila padrão Sigma Aldrich. (A) primeiro aquecimento. (B) resfriamento. (C) segundo aquecimento	41
Figura 4.7	Calorimetria diferencial de varredura da cefadroxila anidra	42
Figura 4.8	Espectro de infravermelho da cefadroxila monoidratada Fármaco Padrão Sigma Aldrich	43
Figura 4.9	Espectro de RMN ¹ H da cefadroxila monoidratada. Fármaco padrão Aldrich	45
Figura 4.10	Espectros de RMN CPMAS ¹³ C da (A) cefadroxila padrão Sigma Aldrich e (B) cefadroxila anidra	47
Figura 4.11	Espectro de RMN CPMAS de ¹⁵ N do fármaco padrão Aldrich	50
Figura 4.12	Micrografias da cefadroxila Padrão Sigma Aldrich. Magnificações entre 500 e 5000X	52

Figura 4.13	Difratogramas de raios X das amostras de (A) cefadroxila cápsula e (B) cefadroxila padrão Sigma Aldrich.	54
Figura 4.14	Espectro de Infravermelho das amostras de (A) cefadroxila padrão Sigma Aldrich e (B) cefadroxila cápsulas	55
Figura 4.15	Espectro de RMN CPMAS de ^{13}C da (A) cefadroxila cápsulas e da (B) cefadroxila padrão Sigma Aldrich	56
Figura 4.16	Estrutura química da cefalexina	57
Figura 4.17	Difratograma de raios X da cefalexina padrão Sigma Aldrich	58
Figura 4.18	Difratogramas de raios X de amostras de cefalexina com diferentes graus de cristalinidade: (A) publicados por Otsuka, 2006; (B) das formas monoidratada e anidra publicadas por Stephenson, 1998.	59
Figura 4.19	Análise termogravimétrica da cefalexina padrão Sigma Aldrich	60
Figura 4.20	Calorimetria diferencial de varredura da cefalexina padrão Sigma Aldrich. (A) primeiro ciclo de aquecimento; (B) resfriamento; (C) segundo ciclo de aquecimento.	62
Figura 4.21	Espectro de infravermelho médio da cefalexina padrão Sigma Aldrich	63
Figura 4.22	Espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da cefalexina monoidratada, fármaco padrão Aldrich	66
Figura 4.23	Espectros de RMN CPMAS de ^{13}C do Fármaco Padrão Sigma Aldrich. (*) denota bandas rotacionais	68
Figura 4.24	Espectro de RMN CPMAS de ^{15}N da cefalexina padrão Sigma Aldrich	70
Figura 4.25	Micrografias da Cefalexina Monoidratada. Magnificações entre 178 e 7340X.	72
Figura 4.26	Difratogramas de raios X.(A) Cefalexina per-hidratada; (B) cefalexina anidra; (C) cefalexina liofilizada; (D) cefalexina Padrão Sigma Aldrich; (E) cefalexina recristalizada em metanol	73
Figura 4.27	Expansão dos Difratogramas de raios X dos polimorfos de cefalexina preparados em laboratório: (A) Cefalexina per-hidratada; (B) cefalexina anidra; (C) cefalexina liofilizada; (D) cefalexina Padrão Sigma Aldrich; (E) cefalexina recristalizada em metanol	74
Figura 4.28	Curva de termogravimetria para a cefalexina per-hidratada	76
Figura 4.29	Isoterma em 40°C da cefalexina per-hidratada	76
Figura 4.30	Curva de termogravimetria para a cefalexina recristalizada em metanol	78
Figura 4.31	Curva de termogravimetria da cefalexina liofilizada	79
Figura 4.32	Curva de termogravimetria da cefalexina anidra	80
Figura 4.33	Curva de calorimetria diferencial de varredura da cefalexina per-hidratada	81
Figura 4.34	Curva de calorimetria diferencial de varredura da cefalexina recristalizada em metanol: (A) Primeiro ciclo	82

	de aquecimento; (B) resfriamento; (C) segundo ciclo de aquecimento	
Figura 4.35	Espectros de RMN CPMAS ^{13}C de raios X: (A) Cefalexina per-hidratada; (B) cefalexina seca; (C) cefalexina liofilizada; (D) cefalexina Padrão Aldrich; (E) cefalexina recristalizada em metanol; (F) cefalexina contaminante	84
Figura 4.36	Difratogramas de raios X: (A) Cefalexina padrão Sigma Aldrich; (B) Suspensão pronta; (C) Pó para suspensão; (D) Pó para Manipulação; (E) Cápsulas comerciais	87
Figura 4.37	Expansão dos difratogramas de raios X: (A) Cefalexina padrão Sigma Aldrich; (B) Suspensão pronta; (C) Pó para suspensão; (D) Pó para Manipulação; (E) Cápsulas comerciais	88
Figura 4.38	Espectros de infravermelho: (A) Fármaco Aldrich; (B) Suspensão pronta; (C) Pó para manipulação; (D) Cápsulas	89
Figura 4.39	RMN CPMAS ^{13}C : (A) Fármaco Aldrich; (B) Suspensão pronta; (C) Pó para suspensão; (D) Cápsulas; (E) Pó para manipulação	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Parâmetros avaliados para diferenciação entre formas polimórficas	5
Tabela 2.1	Os 14 tipos de rede em três dimensões	7
Tabela 2.2	Fármacos cefalosporínicos divididos em gerações	16
Tabela 3.1	Reagentes e solventes utilizados	24
Tabela 3.2	Fármacos, medicamentos e excipientes utilizados	25
Tabela 3.3	Parâmetros das análises de TG/DTG	28
Tabela 3.4	Parâmetros utilizados nas análises de DSC	28
Tabela 3.5	Condições de aquisição dos espectros de RMN em solução	29
Tabela 3.6	Condições de aquisição dos espectros de RMN de sólidos	30
Tabela 4.1	Comparação entre as perdas de massa das diferentes formas polimórficas da cefadroxila	40
Tabela 4.2	Frequências de absorção na região do infravermelho do monodrato de cefadroxila	44
Tabela 4.3	Assinalamento dos espectros de ^1H e ^{13}C em D_2O das amostras de monodrato de cefadroxila	46
Tabela 4.4	Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C CPMAS e RMN de ^{13}C em solução	48
Tabela 4.5	Deslocamentos químicos de RMN de ^{15}N CPMAS da cefalexina monoidratada	51
Tabela 4.6	Frequências de absorção na região do infravermelho da cefalexina padrão Sigma Aldrich.	64
Tabela 4.7	Assinalamentos dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C em D_2O das amostras de cefalexina padrão Sigma Aldrich.	67
Tabela 4.8	Deslocamentos químicos da cefalexina monoidratada RMN de ^{13}C em solução e RMN de ^{13}C CPMAS	68
Tabela 4.9	Deslocamentos químicos da cefalexina padrão Sigma Aldrich RMN de ^{15}N em solução e RMN de ^{15}N CPMAS	71
Tabela 4.10	Comparação entre as perdas de massa dos polimorfos de cefalexina	80

Lista de Abreviaturas

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
DRX	Difração de raios X
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
TG	Termogravimetria
CEFPSA	Cefadroxila padrão Sigma Aldrich
CEXPSA	Cefalexina padrão Sigma Aldrich
CEFPSAP2O5TOL	Cefadroxila anidra
CEXPSAP2P5TOL	Cefalexina anidra
CP	Polarização Cruzada
CPMAS	Polarização Cruzada com rotação no ângulo mágico
MAS	Rotação no ângulo mágico

Parte dos resultados obtidos nessa Dissertação foi apresentada nos seguintes congressos e reuniões científicas:

Aguiar, D.L.M.; San Gil, R.A.S.; Altoé, R.; Coelho, L.B.

“Avaliação de polimorfos de cefadroxil e cefalexina em formulações comerciais por RMN CP-MAS de ^{13}C e difração de raios X”

49º Congresso Brasileiro de Química. Porto Alegre, 2009.

Aguiar, D.L.M.; San Gil, R.A.S.; Caldarelli, S.

“Avaliação de polimorfos de cefalexina e cefadroxil por RMN CP-MAS de ^{15}N em amostras padrões”

XII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. Rio de Janeiro, 2010.

Aguiar, D.L.M.; San Gil, R.A.S.; Caldarelli, S.; Lopes, L.

“Evaluation of Polymorphs of cephalosporins by ^{13}C and ^{15}N Solid state NMR”

51nd Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference. Daytona Beach, USA, 2010.

Publicações:

Aguiar, D.L.M.; San Gil, R.A.S.; Borre, L.B.; Marques, M.C.R.; Gemal, A.L.

“Evaluation of polymorphic forms in cephalixin medicines by ^{13}C solid state NMR”. *Int J Pharmacy Pharm Sci*, 2011 (aceito para publicação)

Aguiar, D.L.M.; San Gil, R.A.S.; Freitas, G.B.L.; Alencastro, R.B. “Polimorfismo de fármacos: uma abordagem farmacêutica”. *Revista Virtual de Química* (em preparação)

Aguiar, D.L.M.; San Gil, R.A.S.; Caldarelli, S.; Gemal, A.L.; Marques, M.R.C.; Lopes, L.; Silva, S.S.; Mattos, O.R.; Santos, K.S.; Defaveri, A.C.A.; Borre, L.B.; Sato, A. “ ^{15}N solid state NMR characterization of cefadroxil and cephalixin polymorphic forms”. *J. Pharm. Biomed.*(em preparação)

Aguiar, D.L.M.; San Gil, R.A.S.; Lopes, L.; Silva, S.S. “Thermal analysis of cefadroxil polimorphs”, *J. Therm. Anal. Calorimetry*. (em preparação)

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

Substâncias no estado sólido podem ser classificadas como cristalinas ou amorfas. Tal classificação considera na realidade extremos de um conceito único que diz respeito a organização do estado sólido, ou seja, considera-se uma amostra como sendo cristalina quando o menor arranjo dos átomos, a célula unitária, se repete indefinida e organizadamente ao longo de toda a partícula estudada (SOUZA, 2005).

Etmologicamente polimorfismo é uma palavra de origem grega que significa 'muitas formas'. Em Química, o termo define o fenômeno pelo qual uma substância pode se apresentar no estado sólido com mais de uma forma de organização, conforme indicado na FIGURA 1.1 (BERNSTEIN, 2002). Na literatura, as discussões acerca de uma definição criteriosa do que seria o polimorfismo são acaloradas e mudam de acordo com o entender de cada autor. VIPPAGUNTA et al (2000) consideram como polimorfos as substâncias que apresentam diferentes estados cristalinos, o que criteriosamente exclui sólidos amorfos e solvatos. NAPOLITANO et al (2005) definem como polimorfos todas as formas sólidas de uma mesma substância que apresentam a mesma fase vapor, líquida ou em solução. Dessa forma, para esse autor polimorfos verdadeiros, solvatos e compostos amorfos são todos considerados polimorfos. Neste trabalho, será utilizada a definição mais abrangente sobre o fenômeno.

Historicamente, o polimorfismo não é um fenômeno recente, já que na metade do século XVIII já se tinha conhecimento de que algumas substâncias poderiam apresentar mais de uma forma cristalina, ou seja, que uma mesma substância poderia existir em pelo menos dois estados sólidos diferentes e que algumas propriedades desses estados também seriam diferentes (SAIFEE et al, 2009).

As propriedades termodinâmicas de um determinado sistema polimórfico são importantes para a determinação da estabilidade dos polimorfos em questão. Isso ocorre porque apesar de uma substância poder existir em mais de uma forma de arranjo cristalino, apenas um desses arranjos é termodinamicamente estável. Todos os

outros são considerados metaestáveis, já que são mais energéticos e tendem a transformar-se na fase mais estável com o tempo.

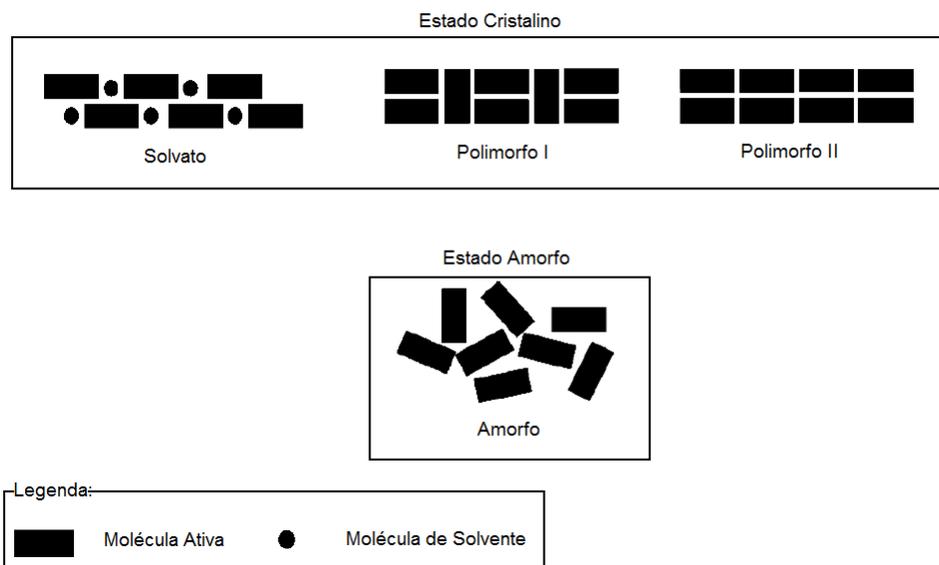


FIGURA 1.1 - Formas de organização possíveis de um material sólido (BERNSTEIN, 2002).

Uma questão relevante no estudo do polimorfismo é que polimorfos diferentes podem apresentar também propriedades físicas bastante diferentes. Dessa forma, conhecer os fatores que governam as transições entre diferentes polimorfos e o tipo de polimorfo (metaestável ou não) que está presente em um determinado sólido é fundamental para que as características físicas deste sólido possam seguramente ser preditas com o tempo. De maneira geral, o polimorfo mais estável exibe ponto de fusão mais alto e menor solubilidade em um solvente específico comparado com os demais polimorfos de um mesmo composto, ou seja, o cristal mantém sua integridade física com as mesmas propriedades e características durante todo o período de armazenamento. Entretanto, vale a pena ressaltar que dependendo da proposta de aplicação do sólido, nem sempre

o polimorfo mais estável é o mais interessante do ponto de vista tecnológico (SOUZA, 2005).

Fármaco é definido como a substância química que é o princípio ativo de um medicamento, ou seja, é o princípio ativo de um produto farmacêutico, tecnicamente obtido e elaborado, com propriedades profiláticas, curativas, paliativas ou para fins de diagnóstico (ANVISA, 2005). Os medicamentos podem conter uma ou mais substâncias ativas (fármacos), além dos excipientes, que devem ser veiculadas aos pacientes segundo uma via de administração adequada, e em uma forma farmacêutica apropriada (sólida, semi-sólida ou líquida). Dentre essas, as mais utilizadas são as 'Formas Farmacêuticas Sólidas de uso Oral, as FFSO (PEZZINI et al, 2007). Substâncias sólidas são fundamentais para a indústria farmacêutica. A maioria dos fármacos comercializados sob FFSO, tais como comprimidos e cápsulas, e mesmo outras formas farmacêuticas como as de uso parenteral (pós líofilos) e preparações inalatórias são mais estáveis, química e biologicamente, do que esses mesmos fármacos comercializados em solução (HILFIKER, 2006).

Para moléculas pequenas (até 600g/mol), há uma predominância de polimorfismo verdadeiro que vai de 32% a 51%, isto é, diferentes formas de empacotamento/conformação cristalina das moléculas de uma substância. Entretanto essas variações podem chegar a 87%, caso sejam incluídos solvatos. Tal fato implica que o polimorfismo de fármacos/excipientes assume um papel fundamental na elaboração de novos medicamentos, já que aproximadamente 90% das drogas moleculares apresentam baixo peso molecular, e dessa forma as etapas de pré-formulação de novos medicamentos devem ser sempre à luz do polimorfismo de fármacos/excipientes (HILFIKER, 2006), ou seja, o polimorfismo é considerado um parâmetro fundamental para a produção e o controle de qualidade de medicamentos. É importante ressaltar que o fenômeno do polimorfismo não é exclusivo de fármacos, ou seja, excipientes sólidos também são passíveis de apresentar diferentes formas de empacotamento em seus cristais. Assim, a problemática do polimorfismo na indústria farmacêutica não é restrita a etapas de pré-formulação, mas também a etapas

posteriores à produção do medicamento em si, o que pode comprometer questões que tangenciam a segurança e eficácia de uso dos produtos acabados (SOUZA, 2005).

Muito embora as penicilinas tenham sido os primeiros membros da família de fármacos β -lactâmicos, elas não são os únicos membros dessa classe terapêutica. Existem ainda os carbapenems, monobactams, e os inibidores da betalactamase, que possuem o anel β -lactama como constituinte, além do grupo farmacofórico dessa classe de antibacterianos. As cefalosporinas formam uma classe de antibacterianos semi-sintéticos que apresentam atividade e estrutura parecida com as penicilinas. A primeira cefalosporina, a Cefalosporina C (FIGURA 1.2) foi isolada em 1948 na Sardenha (PATRICK, 1995).

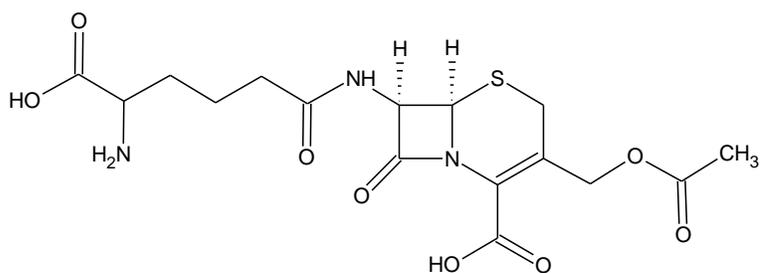


FIGURA 1.2 - Estrutura da Cefalosporina C.

Polimorfos diferentes apresentam propriedades físicas também diferentes (TABELA 1.1) e várias técnicas são usadas para detectar e caracterizar diferentes sistemas polimórficos (YU, 1998). As propriedades polimórficas das cefalosporinas têm sido amplamente estudadas e discutidas em vários artigos na literatura, porém existem poucos estudos a respeito da cefalexina e da cefadroxila especificamente.

TABELA 1.1 – Parâmetros avaliados para diferenciação entre formas polimórficas

Propriedade	Parâmetros avaliados
empacotamento	Volume da célula unitária (apenas para formas cristalinas), densidade, índice de refração, higroscopicidade
termodinâmicas	Ponto de fusão, entalpia, entropia, energia livre, solubilidade
espectroscópicas	Transições eletrônicas, vibracionais, rotacionais, e de spin nuclear
cinéticas	Padrão da velocidade de dissolução, estabilidade e reatividade na forma sólida
mecânicas	Compressibilidade, dureza, fluidez

OTSUKA e KANENIWA (1982) estudaram os perfis de dissolução e o comportamento térmico de algumas formas polimórficas de cefalexina, e sugeriu a possibilidade de existirem para esse fármaco pelo menos seis diferentes fases com diferentes graus de hidratação. LETHO E LAINE (1998) encontraram quatro diferentes graus de hidratação para o cefadroxil. AGUIAR (1998) fez um estudo dos perfis dos espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido de amostras padrão de cefadroxila e de cefalexina, ambas monohidratadas e observou diferenças nos perfis dos sinais para os dois derivados. OTSUKA et al (2006) estudaram por difração de raios X (DRX) e por infravermelho próximo (NIR) as implicações do processamento da cefalexina em moinho de bolas na cristalinidade do composto.

O objetivo deste trabalho é preparar e caracterizar novas formas polimórficas de cefadroxila e de cefalexina, com emprego da RMN de sólidos com ferramenta analítica principal. Medicamentos disponíveis no mercado brasileiro também serão analisados para caracterização do polimorfo presente nessas formulações comerciais.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estruturas cristalinas de um sólido

Para que uma amostra seja considerada cristalina, é necessário que uma mesma cela unitária se repita indefinidamente, ou seja, ao menor arranjo possível sem que haja repetição dá-se o nome de cela unitária. O conceito de amorficidade é justamente o inverso, ou seja, são considerados sólidos amorfos aqueles em que não há repetição de uma cela unitária (SOUZA, 2005).

No estado sólido, o estudo da simetria de um determinado sistema cristalino é fundamental, uma vez que este tem implicações diretas nas características macroscópicas e espectroscópicas deste tipo de amostra. Em termos de simetria de cristais, as células unitárias podem ser classificadas em sete diferentes tipos de células que resultam em 14 diferentes tipos de rede cristalina. A TABELA 2.1 sumariza os 14 tipos de rede tridimensionais (KITTEL, 2005).

Tabela 2.1 – Os 14 tipos de rede em três dimensões

Sistema	Número de redes	
Triclinico	1	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$
Monoclinico	2	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
Ortorrombico	4	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	2	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Cúbico	3	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Trigonal	1	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha = \beta = \gamma < 120^\circ, \neq 90^\circ$
Hexagonal	1	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$

É importante ressaltar que a estrutura externa de um cristal pode, mas não obrigatoriamente, ser a repetição da sua estrutura atômica. Assim um cristal que tenha rede cristalina hexagonal não necessariamente possui a forma de um hexágono. Tal conceito é mais bem exemplificado quando se analisa, por exemplo, a estrutura interna de um cristal de quartzo, que não é alterada quando as superfícies são degradadas para formar grãos de areia. Outra característica fundamental das substâncias no estado sólido é a natureza do tipo de ligação majoritária que há em seus cristais. Dessa forma, importa saber se as ligações que mantêm os cristais são iônicas, moleculares, metálicas ou ligações hidrogênio. Isso é particularmente importante, uma vez que propriedades espectroscópicas e macroscópicas são diretamente dependentes dessas formas de interação entre os constituintes de um determinado cristal. Desta maneira, uma característica como ponto de fusão, que nada mais é do que a temperatura na qual a rede cristalina é desnaturada é completamente dependente das forças de interação majoritárias do cristal, ou seja, cristais cujas moléculas/átomos são mantidas por forças fracas tem pontos de fusão baixos, enquanto cristais formados por interações mais fortes (como ligações hidrogênio) tendem a ter pontos de fusão mais elevados (SOUZA, 2005). Cristais orgânicos (ou cristais moleculares) são um tipo bastante peculiar de cristal, já que as interações possíveis são de natureza variada. Para cristais moleculares além de importar a natureza da ligação majoritária, o aspecto quantitativo também deve ser levado em consideração, ou seja, mesmo interações fracas (porém numerosas) tais como as de van der Waals, assumem papel preponderante para os sólidos moleculares (NANGIA, 2008).

2.2 Polimorfismo

Como uma determinada substância pode existir em mais de uma forma cristalina, e somente uma dessas é termodinamicamente estável, pode haver transições entre as fases metaestáveis, ou seja, dependendo de fatores tais como temperatura, pressão, e de fatores intrínsecos do cristal uma fase pode se transformar em outra, e a reversibilidade (ou não) do processo de transformação é outra consideração a ser feita

no estudo de uma determinada substância no estado sólido. Assim, os sistemas são classificados em relação às transformações que ocorrem antes do ponto de fusão, como sistemas monotrópicos, no caso das transformações serem irreversíveis, ou como sistemas enantiotrópicos, no caso das mudanças no arranjo cristalino serem reversíveis (VIPAGUNTA et al, 2000).

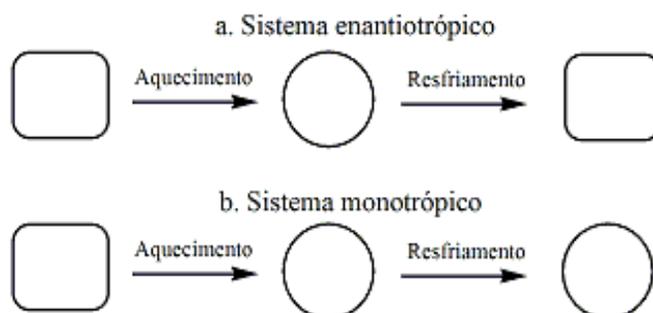


FIGURA 2.1- Esquemas iconográficos de sistemas polimórficos: a) enantiotrópicos; b) monotrópicos

Cristais diferentes de uma mesma molécula são formados basicamente através de dois mecanismos: um deles é chamado polimorfismo de empacotamento e ocorre quando as moléculas que constituem um determinado sistema polimórfico são relativamente rígidas, e o outro mecanismo é chamado polimorfismo conformacional e acontece quando as moléculas constituintes do cristal possuem flexibilidade suficiente para que se empacotem em diferentes estados cristalinos. No caso do polimorfismo de empacotamento, não existem mudanças significativas nos ângulos internos da molécula constituinte, já no caso do polimorfismo conformacional sim. Na verdade a distinção entre polimorfismo de empacotamento e conformacional é artificial, uma vez que mesmo que a molécula seja capaz de assumir nova conformação para formar um novo polimorfo, inevitavelmente ela também assumirá uma nova forma de empacotamento (AALTONEN et al, 2009). Esses conceitos estão ilustrados na FIGURA 2.2.

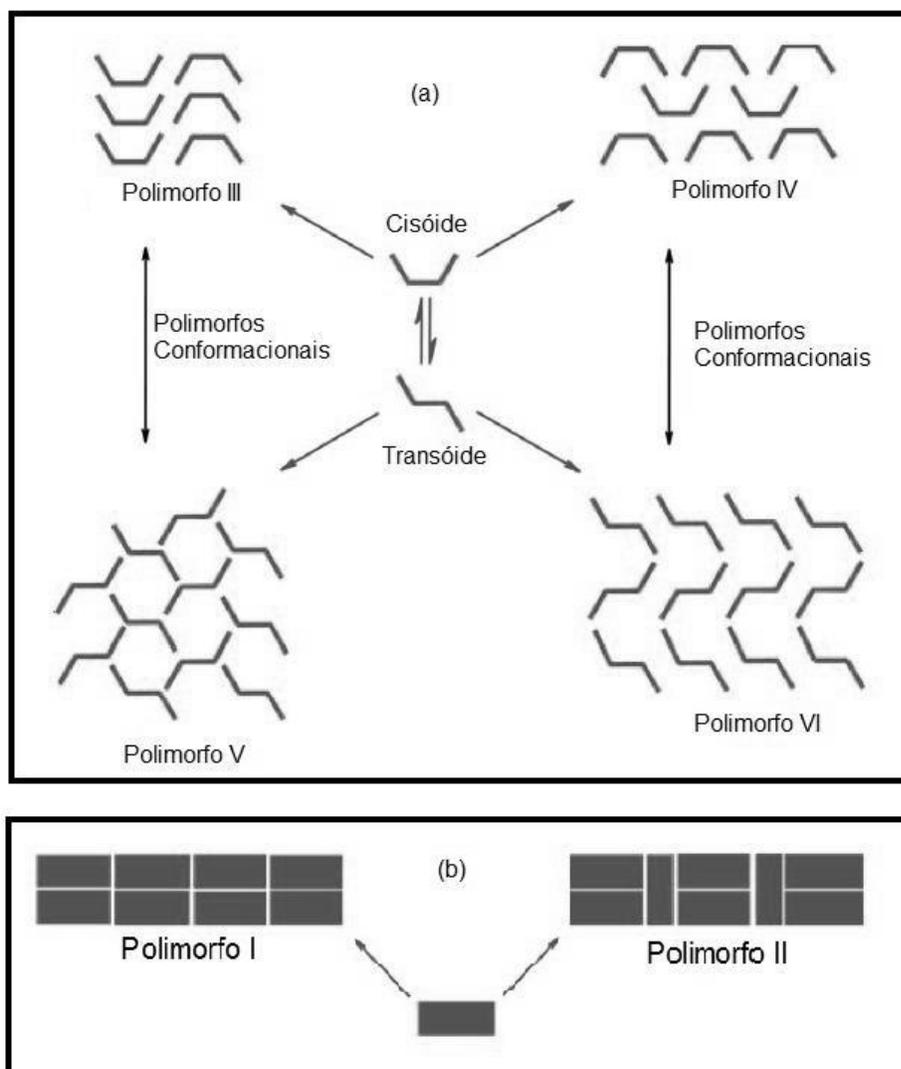


FIGURA 2.2- Esquemas que evidenciam alguns dos diferentes tipos de polimorfismo existentes. (a) Polimorfismo conformacional: exibido em substâncias nas quais as moléculas são flexíveis o suficiente para adotar diferentes conformações ao cristalizarem. (b) Polimorfismo de empacotamento: ocorre quando as moléculas são rígidas e empacotam-se de maneira diferente para formar um cristal.

Como o polimorfismo é o fenômeno que descreve a capacidade que uma substância tem de cristalizar-se em diferentes arranjos cristalinos, a principal ferramenta para entender os mecanismos de geração de novos polimorfos são os aspectos teóricos que norteiam o crescimento dos cristais. Classicamente a cristalização ocorre em dois passos: nucleação e crescimento dos cristais. É regra geral que formas estáveis são

conduzidas sob condições termodinâmicas (resfriamento lento) e que formas metaestáveis são obtidas por condições cinéticas (resfriamento rápido), ou seja, o emprego de condições e técnicas de recristalização são ferramentas poderosas para obter novas formas cristalinas, e portanto, novos polimorfos.

Outra condição crítica na recristalização é o solvente no qual o processo ocorre. Tal fator é particularmente importante, uma vez que o solvente de recristalização pode estar presente na estrutura final do cristal, ou seja, o solvente em que a recristalização se processa pode fazer parte da estrutura do produto final. Quando isso ocorre o cristal recebe o nome de solvato, e no caso especial da água, hidrato (AALTONEN et al, 2009).

DERDOUR e colaboradores (2011) estudaram o direcionamento da cristalização para a formação de um cristal específico, em condições de cristalização plenamente controladas. Os cristais obtidos apresentaram algumas propriedades físico-químicas calculadas in silico, que foram comparadas com as obtidas experimentalmente. Ao final dos experimentos, os autores concluíram que ao promover condições específicas de cristalização, apenas uma conformação adiciona-se a superfície do cristal, isto é, existe no sistema de cristalização um equilíbrio entre conformações, e este equilíbrio pode ser perturbado oportunamente para a produção de um polimorfo específico, conforme indicado na Figura 2.3.

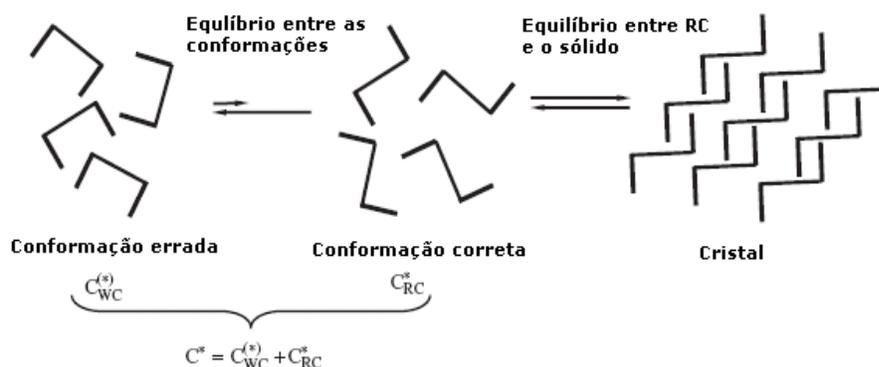


Figura 2.3 Esquemas ilustrativos da competição entre conformações para a produção de um polimorfo específico (Adaptado de Derdour, 2011)

2.3 Polimorfismo na Indústria Farmacêutica aplicado a Medicamentos, Fármacos e Excipientes

Biodisponibilidade relativa é a comparação da relação matemática entre a quantidade e a velocidade com que um princípio ativo alcança a corrente sanguínea, a partir de uma administração extravascular. Este confronto de quocientes é feito por comparação com um medicamento de referência que contenha o mesmo princípio ativo (ANVISA, 2007). Desta maneira, fármacos que são infundidos por via endovenosa são considerados 100% biodisponíveis, já que toda quantidade infundida é adicionada diretamente no compartimento vascular. Entretanto outras formas farmacêuticas que tenham que sofrer processo de absorção não estarão completamente biodisponíveis, e desta forma, os estudos de biodisponibilidade relativa, dado pela comparação com um medicamento de referência, tornam-se necessários (SOUZA, 2005).

Para que uma determinada forma farmacêutica de uso oral seja absorvida é necessário que sofra processos de desintegração e dissolução, antes que o princípio ativo atinja o compartimento vascular. Existem basicamente três fatores que influenciam em uma maior ou uma menor biodisponibilidade de um determinado fármaco:

- Fatores fisiológicos: Idade, higidez tecidual, tempo de esvaziamento gástrico, dieta;
- Fatores físico-químicos: solubilidade, fatores termodinâmicos (metastabilidade), grau de cristalinidade;
- Fatores relacionados à forma farmacêutica: excipientes, força de compressão, tipo de granulação.

Dentre os fatores supracitados, o polimorfismo interfere diretamente nos fatores físico-químicos e nos relacionados à forma farmacêutica, já que são fortemente interdependentes (SOUZA, 2005). Assim, uma consequência grave das diferenças

entre diferentes formas polimórficas de um mesmo fármaco é a diferença de biodisponibilidade que eles podem apresentar entre si (KOBAYASHI et al, 2000).

A solubilidade de um fármaco é definida como a concentração de saturação em que ocorre o equilíbrio entre a droga dissolvida e em seu estado sólido. A solubilidade aquosa de um princípio ativo é fator determinante na velocidade com que a droga é absorvido, no caso em uma forma farmacêutica de uso oral (YU et al, 2003). Diferentes redes cristalinas apresentam energias/entropias distintas, e assim há diferenças nas solubilidades e nas taxas de dissolução, o que interfere diretamente na biodisponibilidade do fármaco contido em um determinado medicamento (SAIFEE et al, 2009).

Condições de armazenamento podem favorecer a transformação de um polimorfo em outro. O controle das características farmacocinéticas do medicamento, ou seja, a possibilidade de existência de polimorfos metaestáveis (estáveis apenas por um período de tempo finito) deve ser determinada, já que condições que favoreçam as transformações de fase entre diferentes polimorfos podem alterar ou reduzir o prazo de validade dos medicamentos (SOUZA, 2005).

Alguns processos tecnológicos da indústria farmacêutica (*freeze drying, spray drying, milling*) podem gerar produtos amorfos, ou seja, reduzir a cristalinidade dos sólidos submetidos a esses processos. Fármacos/excipientes amorfos possuem menor estabilidade física/química, higroscopicidade e densidade, mas em contrapartida são mais solúveis em água (YU et al, 2001). Desta maneira, estados amorfos podem surgir em vários dos estágios do processo de cristalização ou secagem de uma substância a nível industrial, fato que torna o grau de cristalinidade de um fármaco um fator importante, uma vez que este interfere no aumento da atividade biológica e mudanças na sua estabilidade (SOUZA, 2005).

2.4 Antibacterianos β -Lactâmicos: Cefalosporinas

Em 1928, Alexander Fleming, durante estudos sobre variantes de *Staphylococcus*, observou um bolor contaminante das culturas, que na verdade era um fungo do gênero *Penicillium*, e criava ao redor de si uma região onde não havia crescimento bacteriano, ou seja, formava-se um halo de inibição de crescimento das bactérias. Tal fato levou o pesquisador a investigar mais a fundo este gênero de fungos e dar início ao estudo dos fármacos β -lactâmicos. Destes estudos mais aprofundados com os fungos do gênero *Penicillium* foi isolada, por Fleming, Florey e Chain, uma substância que fora chamada penicilina (FIGURA 2.4), que seria posteriormente o primeiro membro da família de fármacos antibacterianos β -lactâmicos (AGUIAR, 1998).

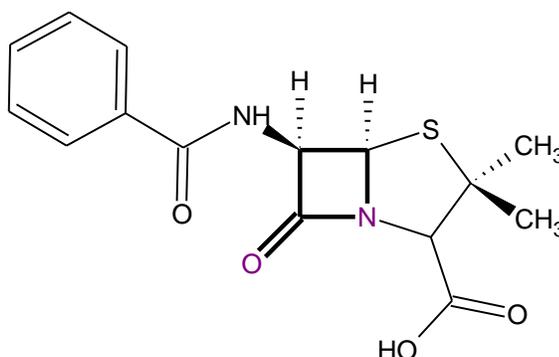


FIGURA 2.4. Estrutura da primeira Penicilina isolada.

O mecanismo de ação dos antibacterianos β -lactâmicos é atuar sobre uma classe de enzimas (DD-peptidases, transpeptidases ou proteínas ligadoras de penicilina) que catalisa os estágios finais da biossíntese da parede celular bacteriana. Nesse estágio ocorre a reação entre a cadeia carboxiterminal de um fragmento de D-Ala-D-ala com a cadeia aminoterminal de outro fragmento D-Ala-D-Ala, e a liberação de um D-ala livre e um peptídeo “cross linked” na parede celular, conforme indicado na FIGURA 2.5 (KUMAR E PRATT, 2005).

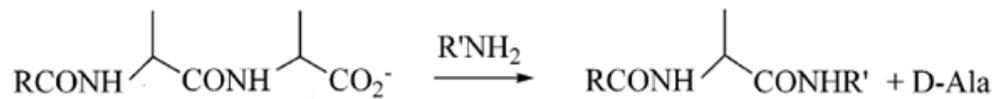


FIGURA 2.5. Reação catalisada pelas transpeptidases (adaptada de Kumar e Pratt, 2005).

Biossinteticamente, Penicilinas e Cefalosporinas derivam dos mesmos aminoácidos, Cisteína (Cys) e Valina (Val), e diferem entre si apenas no arranjo dos aminoácidos ao formar os esqueletos-base do ácido-6-aminopenicilânico (6-APA), no caso das penicilinas ou do ácido-7-aminocefalosporânico (7 ACA), no caso das cefalosporinas, como mostrado na FIGURA 2.6 (PATRICK, 1995). Estruturalmente, cefalosporinas e penicilinas diferem no anel sulfurado que está ligado ao anel β -lactâmico. Se o anel sulfurado for de 5 membros (penem ou tiazolidina), classifica-se como penicilina, e caso o anel fundido for um anel de 6 membros (diidrotiazina ou cefem), classifica-se como cefalosporina (DEPESTEL et al, 2008).

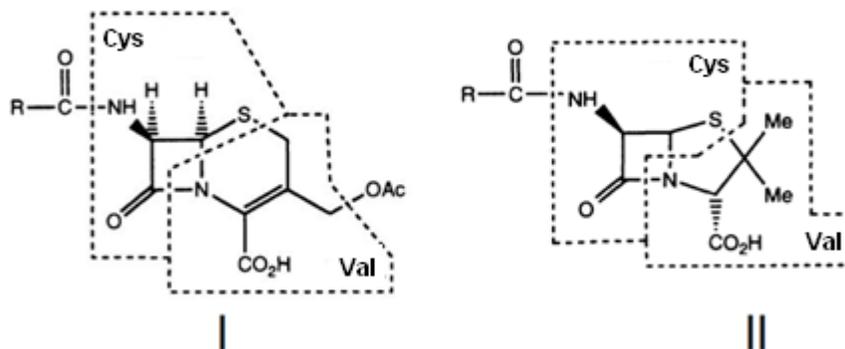


FIGURA 2.6. Esqueletos presentes nas estruturas das cefalosporinas (I) e das penicilinas (II). Estão evidenciados os arranjos dos amino-ácidos valina (Val) e cisteína (Cys) em cada caso (PATRICK, 1995).

Desde o isolamento do primeiro derivado, foram identificadas mais de trinta e duas cefalosporinas diferentes, que foram subcategorizadas em quatro gerações distintas (TABELA 2.2), as quais foram surgindo de acordo com o desenvolvimento da indústria. Em geral, o espectro de ação para bactérias Gram negativas aumenta e o espectro para Gram positivas diminui ou se mantém com o avanço das gerações (DEPESTEL et al, 2008).

TABELA 2.2 – Fármacos cefalosporínicos divididos em gerações

GERAÇÕES DAS CEFALOSPORINAS			
Primeira	Segunda	Terceira	Quarta
Cefadroxila	Cefaclor	Cefdinir	Cefepime
Cefatrizina	Cefamandazol	Cefetamet	Cefpirome
Cefazolin	Cefmatazol	Cefixima	
Cefalexina	Cefonicida	Cefoperazona	
Cefalodrina	Cefotentan	Cefotaxima	
Cefalotin	Cefoxitina	Cefotiam	
Cefapirina	Cefprozila	Cefpodoxima	
Cefradina	Cefuroxima	Cefsolutina	
	Loracarbef	Ceftazidima	
		Ceftibuten	
		Ceftizoxima	
		Ceftriaxona	
		Moxalactam	

2.5 Técnicas de Caracterização de Polimorfos

2.5.1. Difractometria de raios X

Descobertos em 1895, os raios X foram assim chamados porque na época não se conhecia a sua origem. A principal diferença entre os raios X e a luz visível é o comprimento de onda (λ) dessas radiações, 0,5 Å a 2,5 Å da radiação de raios X, contra 6000 Å da luz visível, o que permite aos raios X difratarem em fendas da mesma ordem de grandeza do seu λ .

A condição para que seja observado o fenômeno da difração é expressa pela Lei de Bragg:

$$n \lambda = 2d \sin \theta$$

onde n é um número inteiro, λ o comprimento de onda dos raios X, d é a distância entre os planos paralelos e θ o ângulo de incidência do feixe (CULLITY, 1959). Deste modo, a difratometria de raios X encerra difrações tridimensionais em um difratograma em duas dimensões (YU et al, 1998). A difratometria de raios X aplicada ao estudo de sistemas moleculares pode ser dividido basicamente em difratometria de monocristal e difratometria de policristais, ou de pó (BERNSTEIN, 2002). Embora clássica, a técnica tem sofrido aprimoramentos bastante interessantes do ponto de vista de detecção de sistemas polimórficos, dentre as quais podemos destacar tempo de coleta de dados rápidos (menores que um minuto) e estudos resolvidos no tempo, o que permite detectar eventuais mudanças de conformação dos cristais analisados (YU et al, 1998).

SHETE e colaboradores (2010) estudaram diferenças entre as formas cristalinas (polimorfos) e amorfa da atrovastatina cálcica comercial, ou seja, medicamentos vendidos no mercado indiano, através de uma combinação de técnicas que exploravam diferenças físicas das duas formas sólidas. Dentre as técnicas que o autor utilizou está a difração de raios X de pó, a qual apresentou-se como uma técnica capaz de diferenciar fases cristalinas diferentes nos medicamentos comerciais analisados. NÉMET et al (2010) utilizaram a difração de raios X combinada com o refinamento de rede (Método de Rietveld) para estudar quantitativamente a mistura de duas formas polimórficas de famotidina, forma A e forma B, com sucesso.

2.5.2. Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varredura

Historicamente o homem tem utilizado o aquecimento no estudo de materiais desde longa data, porém somente a partir do século XIX o controle do aquecimento de materiais foi dominado mais satisfatoriamente para que algumas medidas das

propriedades dos materiais pudessem ser feitas (BROWN, 2001). Cristais moleculares diferentes possuem diferentes energias de empacotamento justamente por conta de diferentes interações inter e intramoleculares. A temperatura pode ser um fator fundamental para que ocorra a transformação de um polimorfo em outro, ou seja, o fato de aquecer um sistema polimórfico poderá fornecer energia suficiente para o sistema para que este se altere. O monitoramento das alterações de um determinado sistema pode ser feito com base em alguns parâmetros, tais como a energia absorvida ou liberada pelo sistema em uma determinada temperatura, ou mesmo pela curva de perda de massa de um cristal molecular quando submetido a aquecimento (BERNSTEIN, 2002). Assim, polimorfos podem ser distinguidos por diferentes técnicas de análise térmica que avaliam diferentes parâmetros de uma mesma amostra, quando submetida a aquecimento. Dessa forma, polimorfos diferentes podem ser diferenciados por apresentarem diferentes comportamentos frente ao calor. Particularmente a calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA) são duas técnicas essenciais para distinção dos estados polimórficos (YU et al, 1998). As análises de TGA e DSC são análises complementares no estudo de fármacos polimórficos: enquanto o TGA mede a quantidade de massa perdida pela amostra a uma determinada temperatura, ou seja, mede a resistência térmica da amostra, a DSC relaciona a quantidade de energia absorvida ou liberada pela amostra, quando comparada com uma amostra de referência. Assim, TGA mostra o padrão de degradação térmica de um determinado sistema, enquanto a DSC relaciona possíveis transições entre um sistema polimórfico e outro (HILFIKER, 2006).

NGUYEN E KIM (2010) analisaram a forma anidra e monoidratada do risedronato monossódico por técnicas de análise combinadas (TGA, DSC e DRX). Foram analisadas as formas anidra e monoidratada isoladas e também em misturas. As análises de termogravimetria foram conclusivas na diferenciação entre a forma anidra e monoidratada, sobretudo na primeira perda de massa, equivalente à desidratação da substância. Por outro lado, a calorimetria diferencial de varredura não detectou picos endotérmicos em temperaturas mais baixas do que a da degradação do fármaco.

2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

O estudo de sistemas polimórficos através de técnicas de microscopia é uma alternativa interessante do ponto de vista de análise de macroestruturas. Dentre as técnicas de microscopia existentes, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) merece destaque, uma vez que possui grande resolução, e, portanto, grande capacidade analítica estrutural (YU et al, 1998). Adicionalmente, as características da superfície de um determinado fármaco podem ser prontamente estudadas por MEV, e essas características são geralmente dependentes de propriedades moleculares relativas a cada forma polimórfica em especial (BERSTEIN, 2002).

MAHER e colaboradores (2010) estudou por técnicas analíticas variadas a forma III do Piracetam. Dentre as técnicas, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura para visualizar a geometria dos cristais presentes. CRISP (2010) ao estudar os efeitos do tamanho da partícula no comportamento do processo de desidratação e reidratação da lactose, utilizou várias técnicas para caracterização do estado sólido, dentre elas a microscopia eletrônica de varredura, com a qual foi possível determinar não só a morfologia como também o tamanho das partículas da amostra estudada.

2.5.4 Espectroscopia na região do infravermelho

Métodos espectroscópicos de análise são técnicas que se fundamentam na interação da matéria com a radiação eletromagnética. Basicamente métodos espectroscópicos avaliam a absorção e emissão ou difração de radiação eletromagnética pela matéria, e as diferentes técnicas são definidas pela região no espectro eletromagnético em que se encontram (HOLLAS, 2004). Os métodos espectroscópicos, ao contrário da difração de raios X, fornecem informações de curto alcance, ou seja, são mais sensíveis a pequenas modificações em cristais moleculares. Tal fato confere aos métodos espectroscópicos capacidade analítica sobre os compostos amorfos, sobre polimorfismo conformacional e sobre mudanças em ligações hidrogênio. A

espectroscopia de amostras sólidas também é bastante útil no estudo de desolvatos isomórficos e solvatos isoestruturais (YU et al, 1998).

A região do espectro eletromagnético com comprimento de onda compreendido entre 14.290cm^{-1} e 200cm^{-1} , é conhecido como região do infravermelho e é dividida em três subregiões: infravermelho próximo, entre 14.290 e 4.000cm^{-1} , infravermelho médio, entre 4000 e 700cm^{-1} , e infravermelho distante, na região de 700 a 200cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2005). É possível reconhecer por esta técnica os grupos funcionais presentes na amostra sob análise, já que cada modo vibracional corresponde a uma quantidade de energia específica. Entretanto, é possível que o efeito do ambiente cristalino não seja suficiente para mostrar diferenças entre o espectro de infravermelho de um polimorfo ou outro, ou seja, a espectroscopia de infravermelho pode ou não evidenciar diferenças entre polimorfos de uma mesma substância (BERNSTEIN, 2002).

TRIPATHI e colaboradores (2010) estudaram polimorfos de progesterona produzidos por sonocristalização com técnicas variadas de caracterização (DSC, FTIR, Raman, DRX, difração de laser e estudos de estabilidade). Dentre as técnicas utilizadas a espectroscopia de infravermelho médio foi importante no trabalho, já que evidenciou ligações inter e intramoleculares presentes nos diferentes polimorfos.

2.5.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Em termos de técnica de determinação estrutural de compostos, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é sem sombra de dúvida uma das ferramentas espectroscópicas mais poderosas e específicas existentes. Em solução, todas as interações que mantêm as estruturas dos cristais são desfeitas, e por esse motivo a RMN em solução não pode ser utilizada para o estudo do fenômeno do polimorfismo em si, muito embora a técnica seja bastante útil para a verificação da pureza e integridade do material analisado, além de auxiliar no assinalamento dos espectros de RMN de sólidos (BERNSTEIN, 2002). A aplicação das técnicas de RMN em solução em amostras na forma sólida produz espectros de difícil interpretação analítica. O

desenvolvimento das técnicas de desacoplamento de alta potência (*High Power Proton Decoupling, HPPD*), polarização cruzada (*Cross Polarization, CP*) e Rotação no Ângulo Mágico (*Magic Angle Spinning, MAS*), propiciou que espectros com os sinais isotrópicos, comparáveis aos espectros em solução pudessem ser obtidos nas amostras na forma sólida (AGUIAR et al., 1999).

PARK e colaboradores (2010) ao investigar o comportamento da dissolução dos polimorfos de fluconazol utilizou, dentre outras técnicas, a RMN CPMAS de ^{13}C para caracterizar e diferenciar as formas polimórficas do fármaco estudado. A RMN de sólidos de ^{13}C mostrou-se bastante sensível para diferenciar diferentes formas polimórficas do fluconazol.

ZABINSKI et al (2010) utilizaram a RMN CPMAS de ^{13}C e de ^{15}N , juntamente com outras técnicas de caracterização de sólidos (DRX e modelagem molecular) na caracterização do estado cristalino de fármacos quimioterápicos. A RMN de sólidos mostrou-se uma técnica capaz de gerar dados importantes que puderam ser interpretados em conjunto com os dados de difratometria de raios X e modelos teóricos, baseados em cálculos de teoria funcional de densidade para determinar a conformação das moléculas presentes nas amostras estudadas.

A análise de sistemas polimórficos em sólidos correlacionados à produção de medicamentos, tradicionalmente tem sido feita com métodos de análise térmica, difração de raios X e metodologias ligadas à microscopia. Entretanto, a ressonância magnética nuclear de amostras sólidas é uma alternativa interessante para condução deste tipo de análise, principalmente pela característica não invasiva da técnica, o que permite eliminar etapas de preparação da amostra, além da recuperação total do material analisado. Outra vantagem da ressonância magnética nuclear de amostras sólidas, frente às metodologias clássicas de análise é a possibilidade de obtenção de espectros quantitativos, dependendo da seqüência de pulsos empregada. Dessa forma, o espectro de ressonância magnética nuclear de sólidos pode simultaneamente fornecer informações sobre a estrutura do material analisado, bem como sobre as

quantidades relativas de cada polimorfo, no caso de uma amostra policristalina (HILFIKER, 2006).

2.6 Caracterização de Sistemas Polimórficos β -Lactâmicos e Cefalosporinas

A literatura contém um grande número de artigos que discute a caracterização de sistemas polimórficos formados por membros da família de fármacos β -lactâmicos. KALINKOVA E DIMITROVA (1994) estudaram polimorfos de nafato de cefamandazol por espectroscopia de infravermelho (IV) e por análise termogravimétrica (TGA). BRITTAIN (2005) usou IV, difração de raios X (DRX) de pó e luminescência de estado sólido para estudar formas polimórficas de ampicilina e amoxicilina. KAWAKAMI et al (2005) combinaram DRX, técnicas térmicas de análise, análises de sorção e ressonância magnética nuclear para identificar formas polimórficas de uma cefalosporina experimental. GHASSEMPOUR e colaboradores (2007) utilizaram DRX, calorimetria diferencial de varredura e métodos de microscopia para estudar formas polimórficas de amoxicilina. KOLEVA et al (2008) determinaram as formas polimórficas de cefamandazol e cefalotina por espectroscopia Raman e IV. Não foram encontrados na literatura estudos sistemáticos, com emprego das diferentes técnicas de análise, para a caracterização de formas polimórficas de cefadroxila e cefalexina.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Na Tabela 3.1 estão apresentados a procedência e o grau de pureza dos reagentes utilizados nesta dissertação. Todos os solventes foram utilizados como recebidos.

TABELA 3.1 – Reagentes e solventes utilizados.

Substâncias utilizadas	Procedência	Grau de Pureza (%)
Isopropanol	Vetec	99,5
Etanol	Tedia - US	99,8
Hidróxido de potássio	Quimibrás	85,0
Metanol	VETEC	99,8
n-butanol	Sigma Aldrich	99,8
Pentóxido de Fósforo	Vetec	98,0

3.2 Fármacos, Medicamentos e Excipientes

A Tabela 3.2 relaciona os fármacos, os medicamentos e os excipientes, bem como sua procedência e grau de pureza, utilizados para as caracterizações feitas neste trabalho. Com exceção da cefalexina suspensão do laboratório Medley, todos os fármacos, medicamentos e excipientes foram utilizados como recebidos dos seus respectivos fabricantes.

A cefalexina monoidratada e a cefadroxila monoidratada foram adquiridos diretamente da Sigma Aldrich, enquanto o pó para manipulação foi recebido por doação da farmácia Pharmantiga localizada no município de Linhares no estado do Espírito Santo.

Os medicamentos de cefalexina e cefadroxila foram adquiridos de diversas fontes: a cefadroxila em cápsulas do EMS e a cefalexina suspensão da indústria Medley foram adquiridos em uma drogaria na cidade do Rio de Janeiro. O pó para suspensão de

cefalexina da indústria Hipolabor e a cefalexina cápsulas da indústria Cellofarm foram adquiridos por doação da prefeitura do município de Serra no estado do Espírito Santo.

TABELA 3.2 – Fármacos, medicamentos e excipientes utilizados

Substâncias utilizadas	Procedência	Grau de Pureza
Cefalexina monoidratada	Sigma Aldrich	P.A.
Cefadroxila monoidratada	Sigma Aldrich	P.A.
Amido de milho	Pharma Nostra	n.d.
Talco Farmacêutico	Vitafarma	n.d.
Lauril Sulfato	Sarfarm	97,77%
Amidoglicolato de sódio	n.d.	n.d.
Estearato de Magnésio	n.d.	n.d.
Croscarmelose sódica	n.d.	n.d.
Cellulose microcristalina 101	n.d.	n.d.
Cellulose microcristalina 102	n.d.	n.d.
Sacarose	n.d.	n.d.
Cefalexina comercial (suspensão)	Medley	n.d.
Cefalexina comercial (pó para suspensão)	Hipolabor	n.d.
Cefalexina comercial cápsulas gelatinosas)	Cellofarm	n.d.
Cefadroxila comercial (cápsulas)	EMS	n.d.
Cefalexina Comercial (pó para manipulação)	DEG	n.d.

*n.d. não determinado

Os excipientes utilizados nas caracterizações foram todos obtidos por doação de duas fontes distintas: O amido de milho, o talco farmacêutico e o lauril sulfato de sódio foram recebidos da Farmácia Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O amidoglicolato de sódio, a croscarmelose sódica, a celulose microcristalina 101, a celulose microcristalina 102 e o estearato de magnésio foram recebidos do laboratório do Prof. Lúcio Cabral da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

A Cefalexina suspensão do Medley foi submetida a centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos para que houvesse a separação do fármaco dos excipientes presentes na

forma farmacêutica estudada. O resíduo da centrifugação foi resuspenso em 125 mL de água e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido por três vezes, e o processo de lavagem foi acompanhado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio em solução. Após suficientemente puro, o produto das lavagens e centrifugações foi caracterizado por ressonância magnética nuclear de sólidos.

3.3 Preparação dos Polimorfos

3.3.1 Cefadroxila anidra:

A cefadroxila Sigma Aldrich foi submetida à pistola de Abderhalden com vácuo de -22,5 pol/μg, P₂O₅ e tolueno (P.E. de 110,6°C) por 1,5 horas.

3.3.2 Cefalexina per-hidratada:

Uma solução saturada de cefalexina monohidratada foi produzida e deixada secar lentamente a temperatura ambiente por 15 dias, de acordo com o método descrito por Kennedy (2003). A forma polimórfica per-hidratada é majoritária no processo descrito e apresentou cor amarelo forte.

3.3.3 Cefalexina contaminante:

Este polimorfo foi obtido durante o processo de preparação da cefalexina per-hidratada (KENNEDY, 2003), e se formou nas paredes do recipiente onde a recristalização aconteceu. Esta nova forma polimórfica apresentou cor amarelo claro. As formas per-hidratada e contaminante foram separadas por catação.

3.3.4 Cefalexina liofilizada:

Foi preparada uma solução saturada de cefalexina monohidratada em água, que foi liofilizada até a remoção completa do solvente.

3.3.5 Cefalexina recristalizada em metanol:

Foi preparada uma solução metanólica saturada de cefalexina monoidratada que levada ao evaporador rotatório até saída completa do solvente. Para isso a temperatura do banho-maria foi ajustado para 50 °C e o vácuo em 190mmHg.

3.3.6 Cefalexina anidra:

A cefalexina Sigma Aldrich foi submetida à pistola de Abderhalden com vácuo de 190mmHg, P₂O₅ e tolueno (P.E. de 110,6°C) por 1,5 horas.

3.4 Técnicas de Caracterização

3.4.1 Ponto de Fusão

Os ponto de fusão da cefadroxila monoidratada e da cefalexina anidra, foram medidos em um aparelho de ponto de fusão, marca Fisatom 430D e para uma leitura de temperatura mais precisa, foi usado um termômetro calibrado.

3.4.2 Difractometria de raios X

Os difratogramas de raios X de pó (DRX) foram adquiridos em um difratômetro de marca RIGAKU, modelo MINIFLEX utilizando radiação Cu K α ($k = 1,5418 \text{ \AA}$), operando a 30 kV e 15 mA, passo de 0,05° e um tempo de contagem de passo por segundo, no intervalo de 2 θ de 2° a 60°.

3.4.3 Termogravimetria

As análises termogravimétricas foram feitas em dois aparelhos distintos, de fabricação Thermo e Shimadzu. A TABELA 3.4 sumariza os parâmetros utilizados nas análises de TG/DTG. Os dados estão sumarizados na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 – Parâmetros das análises de TG/DTG

descrição	Thermo (Q500)	Shimadzu (modelo 51)
Material da panela	Platina	Alumina
Massa utilizada	5-8mg	Em torno de 10mg
Gás de purga	N ₂	N ₂
Vazão de gás da amostra	60mL/min	20mL/min
Vazão de gás da balança	40mL/min	40mL/min
Limites de temperatura	25° até 700°C	25° até 800°C
Velocidade de aquecimento	10°C/min	10°C/min

3.4.4 Calorimetria diferencial de varredura

As análises de calorimetria diferencial de varredura foram executadas com as amostras de cefalexina e cefadroxila adquiridos da Sigma Aldrich e com novos polimorfos produzidos neste trabalho em três equipamentos distintos, os dados das análises estão sumarizados na tabela 3.4.

TABELA 3.4 – Parâmetros utilizados nas análises de DSC

descrição	Thermo (Q1000)	Mettler Toledo (DSC822e)	Perkin Elmer (DSC7)
Material do cadinho	Alumínio	Alumínio	Alumínio
Massa utilizada	4-6mg	Aproximadamente 4mg	4-5mg
Gás de purga	N ₂	N ₂	N ₂
Limites de temperatura	10°C até 190°C	10°C até 190°C	10°C até 190°C
Velocidade de aquecimento	10°C/min	10°C/min	10°C/min

3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro AABB Inc. modelo FTLA 2000-100 com varredura de 4000-400 cm^{-1} . As amostras foram misturadas com brometo de potássio (KBr) em pó e prensadas para obtenção de pastilhas com 1% m/m.

3.4.6 Ressonância Magnética Nuclear em solução: RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e de ^1H em solução foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DPX-200 (4,7 T). As amostras foram preparadas em tubos de 5mm com solução de 5 mg/0,6mL em D_2O . Todos os espectros em solução foram obtidos em temperatura ambiente e com o tubo com rotação igual a 0Hz. Os dados de aquisição dos espectros estão sumarizados na TABELA 3.5.

Tabela 3.5 – Condições de aquisição dos espectros de RMN em solução

variável	^1H	^{13}C
Sequência de pulsos	zg30	zgpg30
Frequência do núcleo (MHz)	200	50
Comprimento do pulso ($\pi/6$, μs)	12	11
Intervalo entre os pulsos (s)	2	4
Número de acumulações	256	6144
Velocidade de rotação (KHz)	0	0
Amostra de referência	H_2O (4,74ppm)	Dioxana (67,4ppm)

3.4.7 Ressonância Magnética Nuclear de Sólidos: ^{13}C e ^{15}N

Os experimentos de RMN CPMAS de ^{13}C e ^{15}N foram feitos em espectrômetros BRUKER DRX-300 (7,05 T) e AVANCE III 400 (9,4T). As amostras foram transferidas para rotores de ZrO_2 de 4mm. As condições de aquisição encontram-se na TABELA 3.6.

TABELA 3.6 – Condições de aquisição dos espectros de RMN de sólidos

variável	DRX-300 MHz		AVANCE III 400MHz	
	^{13}C	^{15}N	^{13}C	^{15}N
Freq. do núcleo (MHz)	75,49	30,423	100,613	40,56
Comp. do pulso ($\pi/2$, μs)	5	3,4	1	1,9
Int. entre os pulsos (s)	4	2	3	2
Nº de acumulações	512	36.000- 63.000	256	30720- 31050
Vel. de rotação (KHz)	6,0-6,8	5	6,3	5
Am. de referência (ppm)	HMB* (17,3)	Glicina (-347,54)	HMB* (17,3)	Glicina (-347,54)

(*) HMB – hexametilbenzeno; o desl. químico refere-se a posição do grupo CH_3 .

3.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram feitas em dois equipamentos distintos, sendo ambos da marca Zeiss equipados com detectores EDS e EBSD, capazes de realizar análises em alto e baixo vácuo, no Laboratório de Microscopia eletrônica de varredura do Laboratório de ensaios não destrutivos corrosão e soldagem, LNDC (Modelo EVO40) e do Centro de pesquisas em energia elétrica, CEPEL (MODELO EVO-MA25).

Como as amostras de cefalexina monohidrato, metanolato de cefalexina, cefadroxila monohidrato, cefalexina diidrato e cefalexina não eram condutoras, houve a necessidade de prepará-las suportadas em uma fita adesiva de carbono, que foi colada em suporte específico para realização das análises. O conjunto de suporte, fita adesiva de carbono e amostra foi submetido à nebulização com ouro metálico.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cefadroxila

Cefadroxila é o nome dado pela Denominação Comum Brasileira (ANVISA, 2009) ao ácido 7-[D-(-)- α -amino- α -(4-hidroxifenil)acetamido]-3-cefem-4-carboxílico (FIGURA 4.1). Foram estudadas amostras de cefadroxila padrão Sigma Aldrich (CEFPSA), de um novo polimorfo produzido neste trabalho e de medicamentos comerciais disponíveis no mercado brasileiro. Inicialmente as amostras foram caracterizadas pelo seu ponto de fusão, e posteriormente por técnicas analíticas usuais para detecção de sistemas polimórficos. Para a amostra Sigma Aldrich o ponto de fusão encontrado foi de 206 °C, porém, durante a análise observou-se decomposição do material devido à provável perda de amônia, característica de compostos que apresentam estrutura de Zwitterion (LYSZCZEK, 2004).

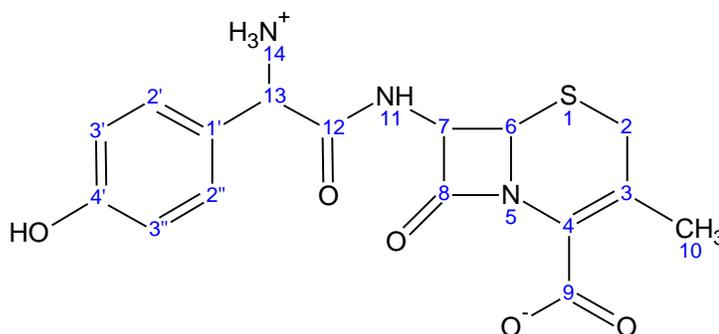


FIGURA 4.1 - Estrutura química da cefadroxila (forma Zwitteriônica do ácido 7-[D-(-)- α -amino- α -(4-hidroxifenil)acetamido]-3-cefem-4-carboxílico

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFOS DE CEFADROXILA

4.1.1.1 Difractometria de raios X

Os difratogramas das amostras de cefalexina monoidrato (Sigma Aldrich) e da cefadroxila anidra estão mostrados na FIGURA 4.2. Ambos apresentaram picos de difração no intervalo $2^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$, o que evidencia a cristalinidade dos polimorfos.

A análise comparativa dos difratogramas sugere que os cristais de cefadroxila antes e após o tratamento com a pistola de Abderhaldeen sofreram mudanças em sua constituição espacial, já que os difratogramas não são sobreponíveis. Entretanto, os picos de difração de ambos os difratogramas coincidem em várias regiões de ambos os difratogramas, o que evidencia não haver uma mudança radical da conformação da cefadroxila. Para o intervalo $5^\circ < 2\theta < 20^\circ$, encontram-se as maiores diferenças, as quais podem ser mais bem observadas na FIGURA 4.2 (parte inferior). Vale a pena ressaltar que não foram encontrados registros do difratograma de raios X da forma polimórfica anidra da cefadroxila.

SHIN E CHO (1992) estudaram amostras de cefadroxila monoidratada, por difração de raios X combinada com refinamento de rede. Os autores concluíram que o fármaco encontra-se na forma de zwitterion e que conformacionalmente o núcleo 3-cefem e a fenila estariam do mesmo lado da amida exocíclica, muito embora haja bastante flexibilidade nesse sistema. O trabalho também propõe que o empacotamento do cristal da cefadroxila monoidratada seja mantido por ligação hidrogênio entre o nitrogênio amínico, a água do próprio cristal e o oxigênio da lactama, e que haveria também ligações hidrogênio entre os oxigênios da carboxila e átomos de hidrogênio da amina protonada, assim como entre o oxigênio fenólico e os átomos de oxigênio da carboxila. Essa rede de ligações hidrogênio confere alta estabilidade ao cristal, corroborada pela característica iônica dada por conta da forma ionizada.

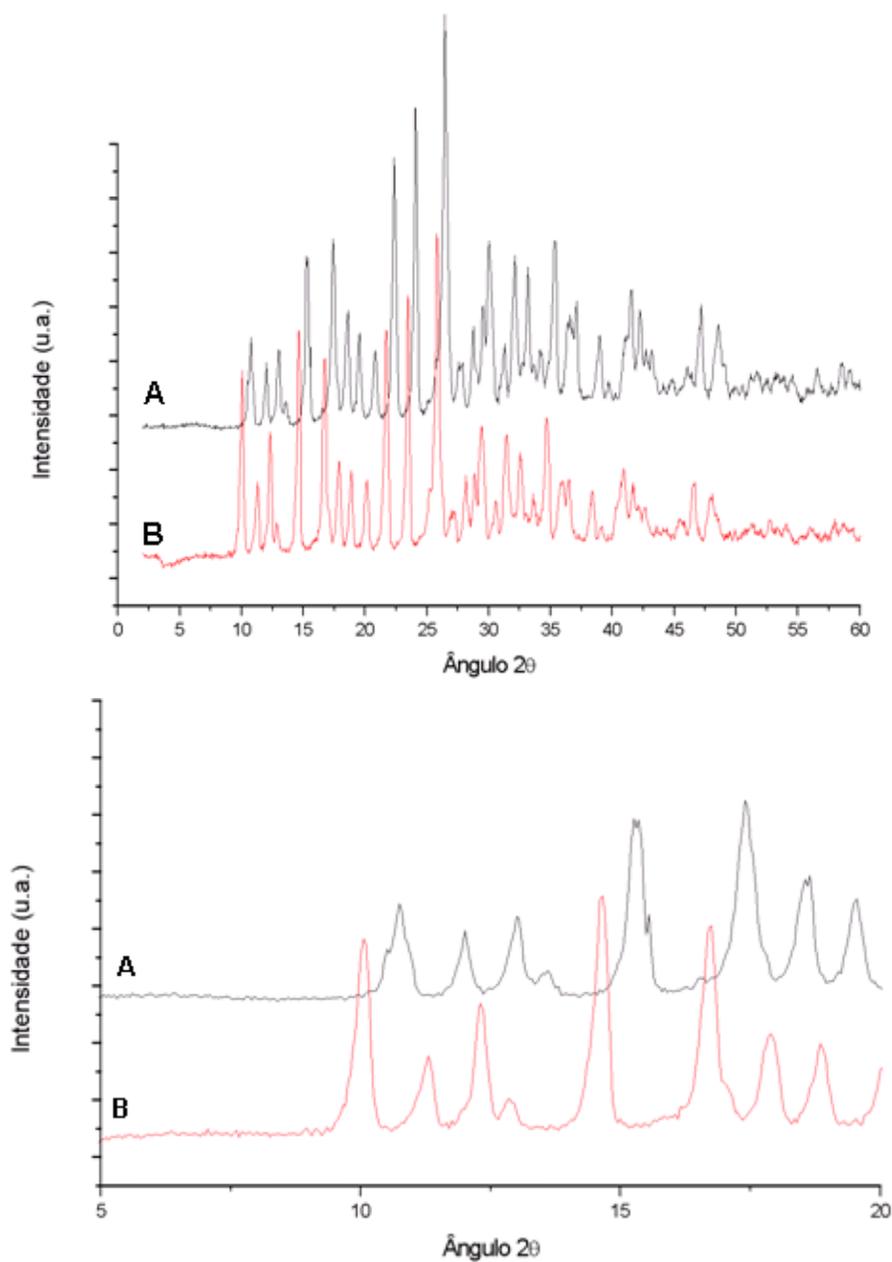


FIGURA 4.2 - Difratoogramas de raios X. (A) cefadroxila padrão Sigma Aldrich; (B) cefadroxila anidra. Os difratoogramas mostrados na parte inferior da figura são expansões do intervalo entre 5 e 20°, para melhor visualização.

SEETHARAMAN e colaboradores (1993) estudaram também por difração de raios X amostras de cefadroxila da Sigma e chegaram a conclusões muito próximas das de SHIN E CHO (1992), principalmente no que tange a manutenção do cristal por ligações hidrogênio.

LEHTO E LAINE (1998) analisaram por difração de raios X ($7^\circ \leq 2\theta \leq 24^\circ$) amostras de cefadroxila com diferentes graus de hidratação, inclusive a cefadroxila monoidratada. O difratograma publicado (FIGURA 4.3) apresentou padrão similar ao da amostra Sigma Aldrich estudada nesta dissertação, no mesmo intervalo de ângulo 2θ . BRITTAIN (2007) estudou a desidratação da cefadroxila por difração de raios X, em um intervalo de $4,75^\circ \leq 2\theta \leq 35^\circ$ (FIGURA 4.3). Também nesse caso a cefadroxila monoidratada apresentou padrão idêntico ao da cefadroxila padrão Sigma Aldrich. Desta forma, a difratometria de raios X sugere que a amostra analisada neste trabalho de fato é cefadroxila monoidratada já que os difratogramas coincidem na posição dos picos de difração, com variações apenas nas intensidades dos picos, o que evidencia apenas diferenças na cristalinidade das amostras deste trabalho quando confrontada com a literatura.

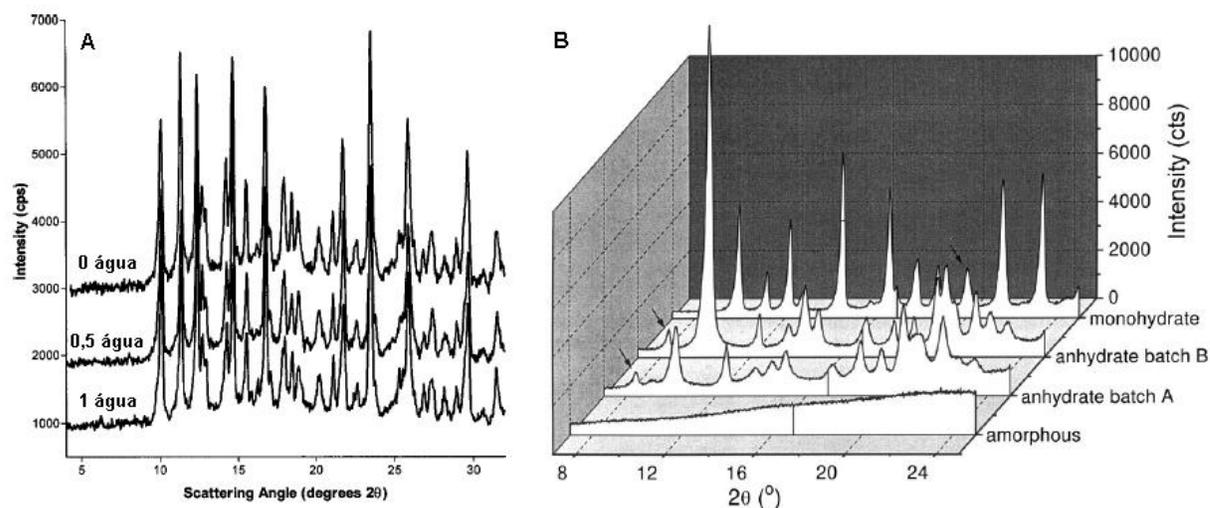


FIGURA 4.3 - Difratogramas de raios X da cefadroxila publicados e disponíveis na literatura: (A) Brittain (2007); (B) Lehto e Laine (1998)

4.1.1.2 Análise termogravimétrica (TG/DTG)

As curvas da análise termogravimétrica (TG/DTG) obtidas para as amostras de cefadroxila padrão Sigma Aldrich (CEFPSA) e cefadroxila anidra (CEFPSAP2O5TOL) foram obtidas sob atmosfera de nitrogênio. Dessa forma os fenômenos de oxidação com o ar atmosférico foram minimizados, e apenas as variações intrínsecas da amostra foram observadas, e estão mostradas na FIGURA 4.4.

À primeira perda de massa 4,5% (136,5°C) atribui-se à perda de solvente do sistema, e os cálculos indicaram que este resultado seria compatível com 1 mol de água. Acima de 200°C iniciou-se a decomposição da cefadroxila, fato evidenciado principalmente pela segunda perda de massa de 15,3% (205°C), para a qual sugere-se que tenha ocorrido uma desaminação/descarboxilação simultânea. Em temperaturas acima de 220°C as perdas de massa da cefadroxila foram lentas e pouco definidas. Não foram encontrados trabalhos publicados na literatura acerca da análise termogravimétrica de cefadroxila nas mesmas condições em que as análises foram feitas nessa dissertação. Entretanto LYSZCZEK (2004) utilizou um analisador termogravimétrico acoplado a um espectrômetro de infravermelho (TG-FTIR), sob atmosfera de ar, para que os gases perdidos na análise da cefadroxila fossem identificados, e observou que inicialmente apenas moléculas de água foram detectadas pelo espectrômetro de infravermelho, o que corrobora com a proposta de desidratação sem decomposição na primeira perda de massa desse composto.

Após a saída da água, no intervalo entre 200 e 440°C, foram identificados vários gases, tais como COS, NH₃ e SO₂, e entre 440 e 500°C foram detectados HCN, CO₂, NH₃ e COS. Os resultados obtidos por Lyszczek são similares aos observados nessa dissertação, com relação as faixas de temperatura onde ocorreram as perdas de massa da cefadroxila.

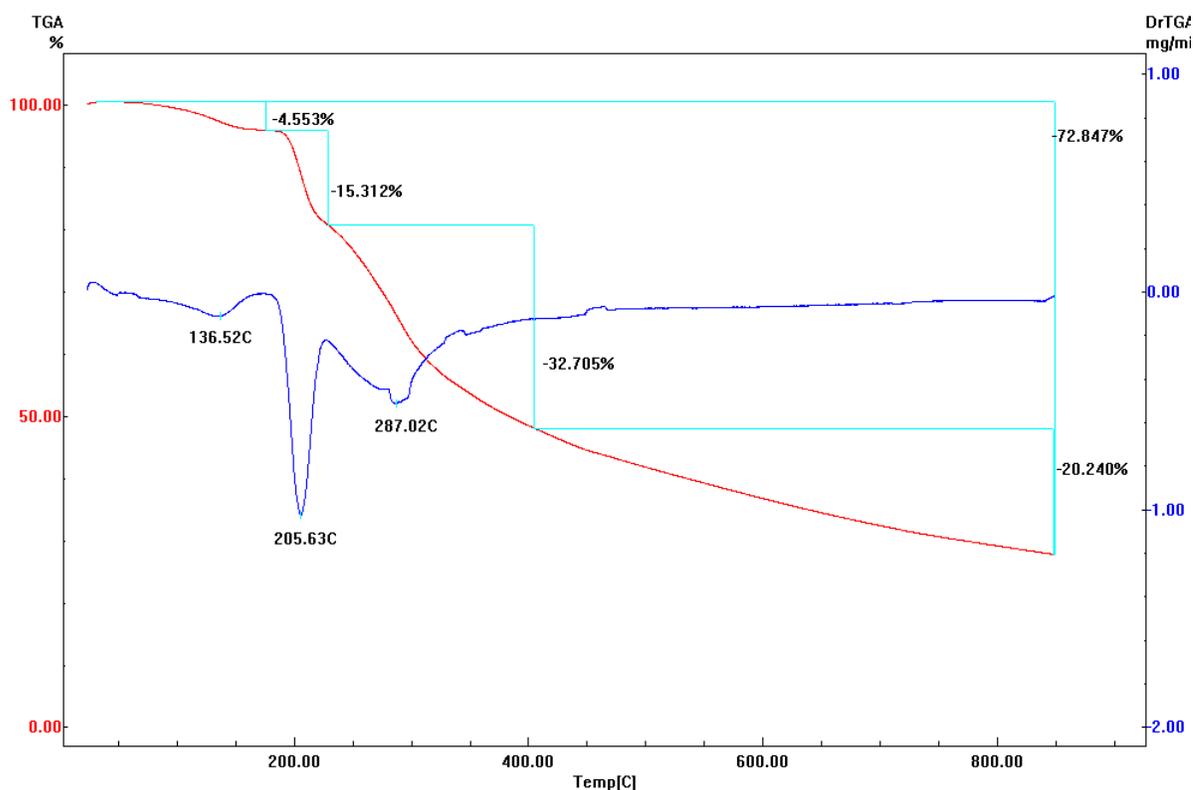


FIGURA 4.4 - Análise termogravimétrica da Cefadroxila padrão Sigma Aldrich

Ao final da análise da cefadroxila monoidratada um total de 26,81% da massa analisada foi remanescente, o que sugere a presença de compostos inorgânicos na amostra. LYSZCZEK (2004) estudou por termogravimetria amostras de cefadroxila complexada com metais de transição comumente disponíveis no corpo humano (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}). A proposta de que a cefadroxila fosse um fármaco com uma estabilidade térmica incomum foi refutada ao comparar as curvas de TGA com as publicadas na literatura (LYSZCZEK, 2004).

A curva de termogravimetria da cefadroxila anidra está mostrada na FIGURA 4.5. A primeira perda de massa, de 3,9% (127,2°C) corresponde a 0,81 mols de água. Ocorreram ainda três grandes perdas delimitadas pela curva DTG: 15,49% (201°C), 24,7% (263°C) e 56,9% (500°C). A curva de termogravimetria evidenciou que o

processo de secagem com a pistola de Abderhaldeen removeu cerca de 19% das moléculas de água da cefadroxila, provavelmente fisissorvidas.

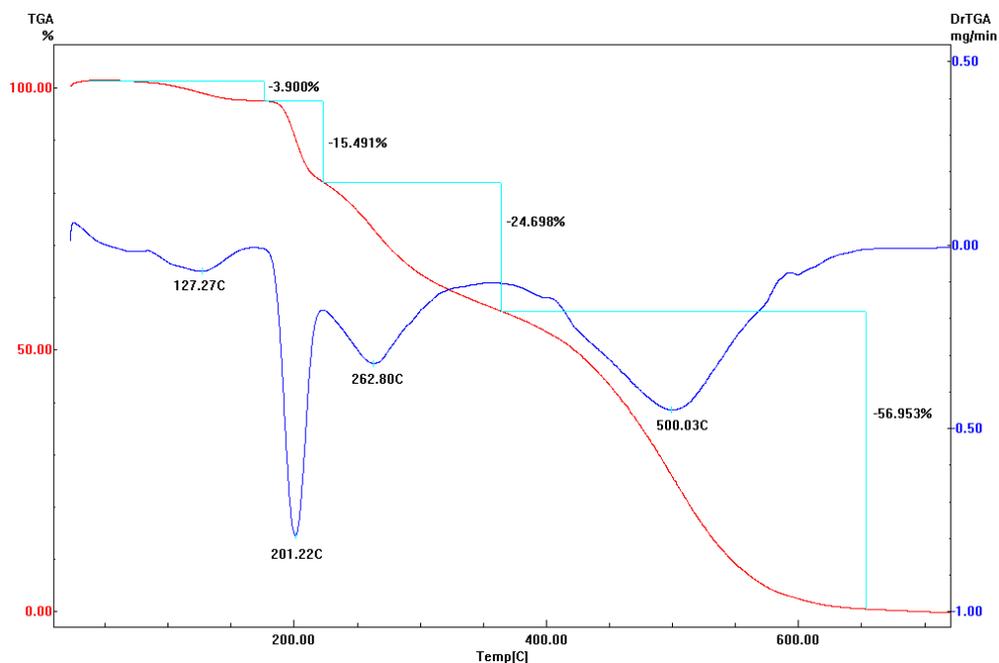


FIGURA 4.5. Análise termogravimétrica da cefadroxila anidra

A TABELA 4.1 sumariza a comparação entre as perdas de massa das diferentes formas cristalinas da cefadroxila. Comparativamente os polimorfos de cefadroxila diferem entre si do ponto de vista da estabilidade térmica.

TABELA 4.1 – Comparação entre as perdas de massa das diferentes formas polimórficas da cefadroxila.

Polimorfo	1ª Perda de massa			2ª Perda de massa		3ª Perda de massa		4ª Perda de massa	
	T (°C)	Perda (%)	Mols de H ₂ O	T (°C)	Perda (%)	T (°C)	Perda (%)	T (°C)	Perda (%)
Cefadroxila anidra	127,3	3,9	0,81	201,2	15,5	262,8	24,7	500,0	56,9
Cefalexina padrão Sigma Aldrich	136,5	4,5	0,96	205,6	15,3	287,0	32,7	n.d.	20,24

4.1.1.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise por calorimetria de varredura diferencial foi empregada com o intuito de tentar detectar alguma transição endo ou exotérmica que pudesse ocorrer antes da temperatura de decomposição do fármaco analisado.

Desta maneira, a análise foi feita até 170°C (FIGURA 4.6). As análises de DSC foram feitas com dois aquecimentos, intercalados por um arrefecimento das amostras mantidas no interior da cápsula de análise. Dessa forma foi possível determinar se o possível sistema polimórfico presente seria enantiotrópico (transições reversíveis) ou monotrópico (transições irreversíveis). Na faixa de temperatura estudada não foi observado nenhum pico nas curvas de DSC, o que permite inferir com segurança que no intervalo de observação não há transição entre possíveis polimorfos, ou seja, a amostra de cefadroxila monoidrato é formada apenas por uma forma cristalina.

LYSZCZEK (2004) obteve as curvas de DSC para a cefadroxila monoidratada e para formas complexadas de cefadroxila. Para a cefadroxila monoidratada, na faixa de temperatura analisada não foi observada nenhuma transição, o que sugere que os fármacos analisados (neste trabalho e no trabalho de Lyszczek) apresentam a mesma estrutura cristalina, ou seja, são polimorfos idênticos.

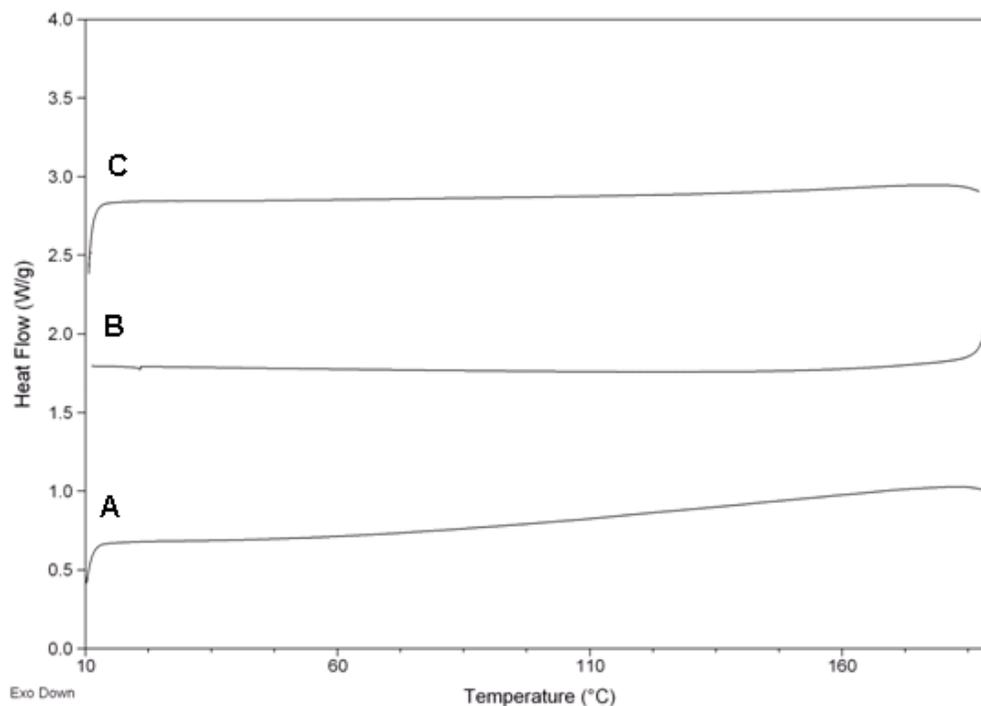


FIGURA 4.6 - Calorimetria diferencial de varredura da cefadroxila padrao Sigma Aldrich. (A) primeiro aquecimento. (B) resfriamento. (C) segundo aquecimento.

A análise por calorimetria diferencial de varredura da amostra de cefadroxila anidra está mostrada na FIGURA 4.7. Foi observado um pico endotérmico em 131°C, ou seja, nessa temperatura a cefadroxila anidra sofre uma transição polimórfica. Esta transição polimórfica evidencia que a remoção de parte da água de cristalização da cefadroxila monoidratada por um processo exaustivo é capaz de mudar as características da amostra, ou seja, o resultado de calorimetria diferencial de varredura corrobora com os resultados de difratometria de raios X, que indicaram claramente uma diferença de conformação entre as duas formas polimórficas aqui discutidas.

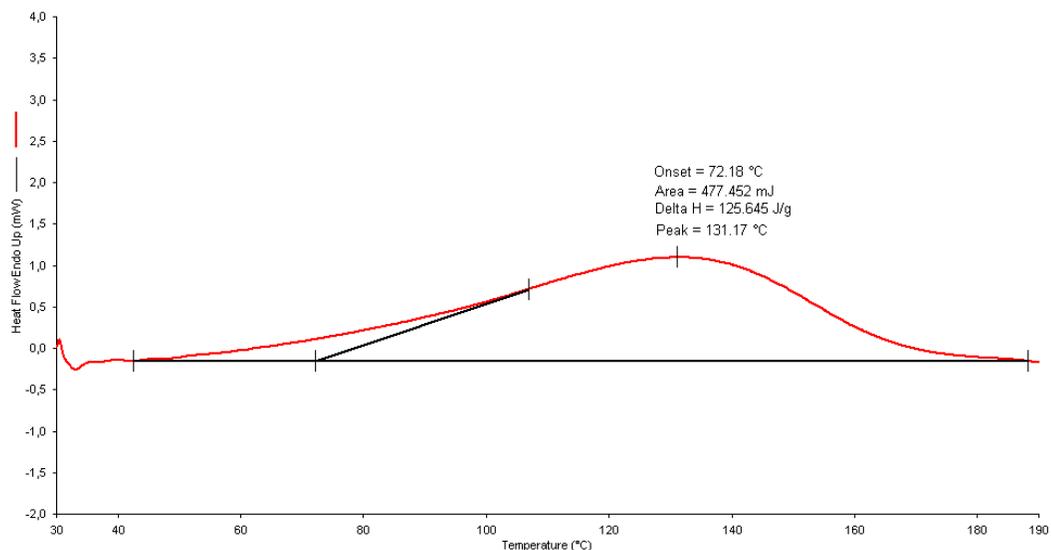


FIGURA 4.7 – Calorimetria diferencial de varredura da cefadroxila anidra.

4.1.1.4 Espectroscopia de infravermelho médio

A caracterização de uma amida por infravermelho é feita basicamente pelo estiramento assimétrico da carbonila e pela deformação axial da ligação N-H, conhecidos respectivamente como banda de amida I (deformação axial) e banda de amida II (deformação angular). A banda de amida I usualmente aparece por volta de 1640-1700 cm^{-1} quando em fase sólida, dependendo do grau de ligação hidrogênio estabelecido na amostra. A deformação angular da ligação N-H (Amida II) é uma banda com cerca de metade ou um terço da intensidade da banda de amida I (deformação axial) e esta vibração aparece usualmente entre 1590-1620 cm^{-1} . No caso de lactamas de 4 membros as absorções de estiramento assimétrico da carbonila devem estar por volta de 1730-1760 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2005).

A cefadroxila padrão Sigma Aldrich (monoidratada) e a cefadroxila anidra foram submetidas ao processo de pastilhamento com KBr (1%) e o resultado das análises foi concordante com os dados descritos na literatura (LYSZCZEK, 2004). Na FIGURA 4.8 estão mostrados os espectros vibracionais de infravermelho obtidos para os dois polimorfos estudados. Pode-se observar diversas bandas de absorção, sendo algumas

delas especialmente importantes para o entendimento e caracterização da estrutura da cefadroxila.

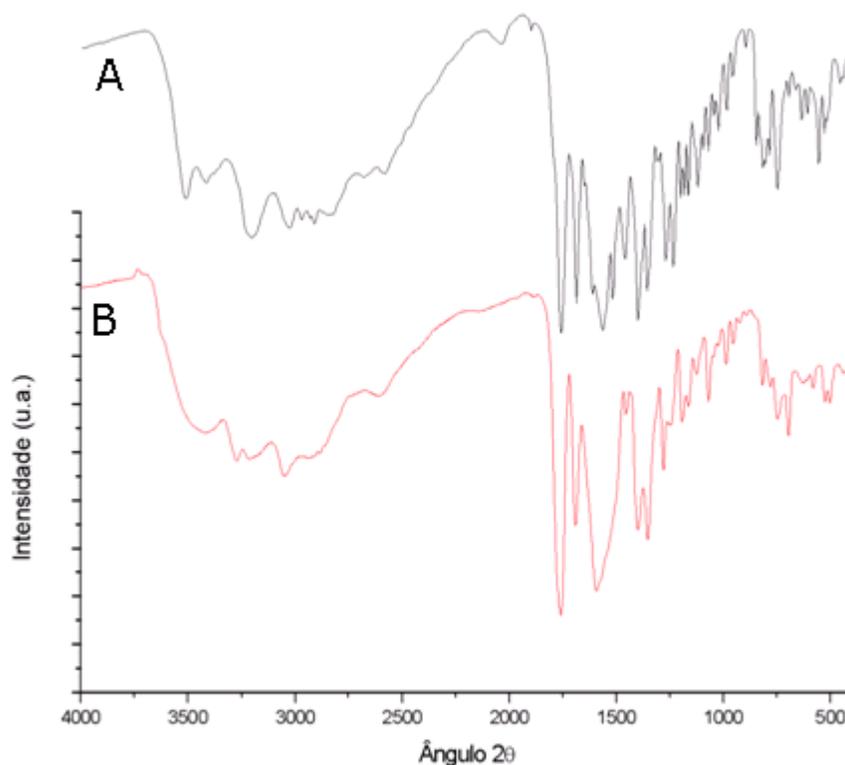


FIGURA 4.8 - Espectros de infravermelho. (A) cefadroxila monoidratada Fármaco Padrão Sigma Aldrich; (B) cefadroxila anidra.

Algumas absorções foram selecionadas segundo a proposta de LYSZCZEK (2004) e comparadas com os dados obtidos experimentalmente neste trabalho. O confronto entre os dados experimentais e os dados da literatura (TABELA 4.2) mostra que estes são consoantes entre si, já que as variações entre estas absorções foram desprezíveis, exceto pelos valores das bandas relativas à ligação N-H (deformação axial e angular), as quais tiveram menor valor de absorção nas amostras analisadas em relação à análise de LYSZCZEK (2004).

TABELA 4.2 – Freqüências de absorção na região do infravermelho das formas anidras e monoidratadas de cefadroxila

Frequências de absorção (cm ⁻¹)			Modos de absorção
Anidra	Monoidrata	Lyszczek* (2004)	
3508	3510	3505	v _{O-H}
3199	3210	3273	v _{N-H}
-	-	-	v _{O-H} (ligação de hidrogênio)
1757	1758	1758	v _{C=O} (β-Lactama)
1685	1685	1686	v _{C=O} (amida I)
1610	1612	1650	δ _{N-H} (amida II)
1515	1515	1517	v _{COO} (Assimétrico)
1398	1400	1399	v _{COO} (Simétrico)

*forma monoidratada

4.1.1.5. Ressonância magnética nuclear em solução: RMN de ¹H e ¹³C{¹H}

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C{¹H} (FIGURA 4.5) foram feitos para verificar a integridade das estruturas da cefadroxila monoidratada e seu grau de pureza, quando avaliado por esta técnica. O assinalamento dos hidrogênios baseou-se na proposta feita por ROETS (1981), enquanto o assinalamento dos carbonos foi feito de acordo com o trabalho de doutoramento de AGUIAR (1998). Os resultados das atribuições encontram-se reunidos na TABELA 4.3.

Os deslocamentos químicos, e as multiplicidades do espectro de RMN de ¹H encontrados para a cefadroxila são consonantes com os da literatura. Não foram observados no espectro de RMN de ¹H sinais de outros compostos senão os sinais característicos da amostra. Desta forma, o fármaco Sigma Aldrich foi considerado um fármaco puro, dentro dos limites de detecção da RMN. Os deslocamentos químicos (¹H e ¹³C) da amostra da cefadroxila monoidratada (Padrão Sigma Aldrich) são próximos aos dos obtidos na literatura.

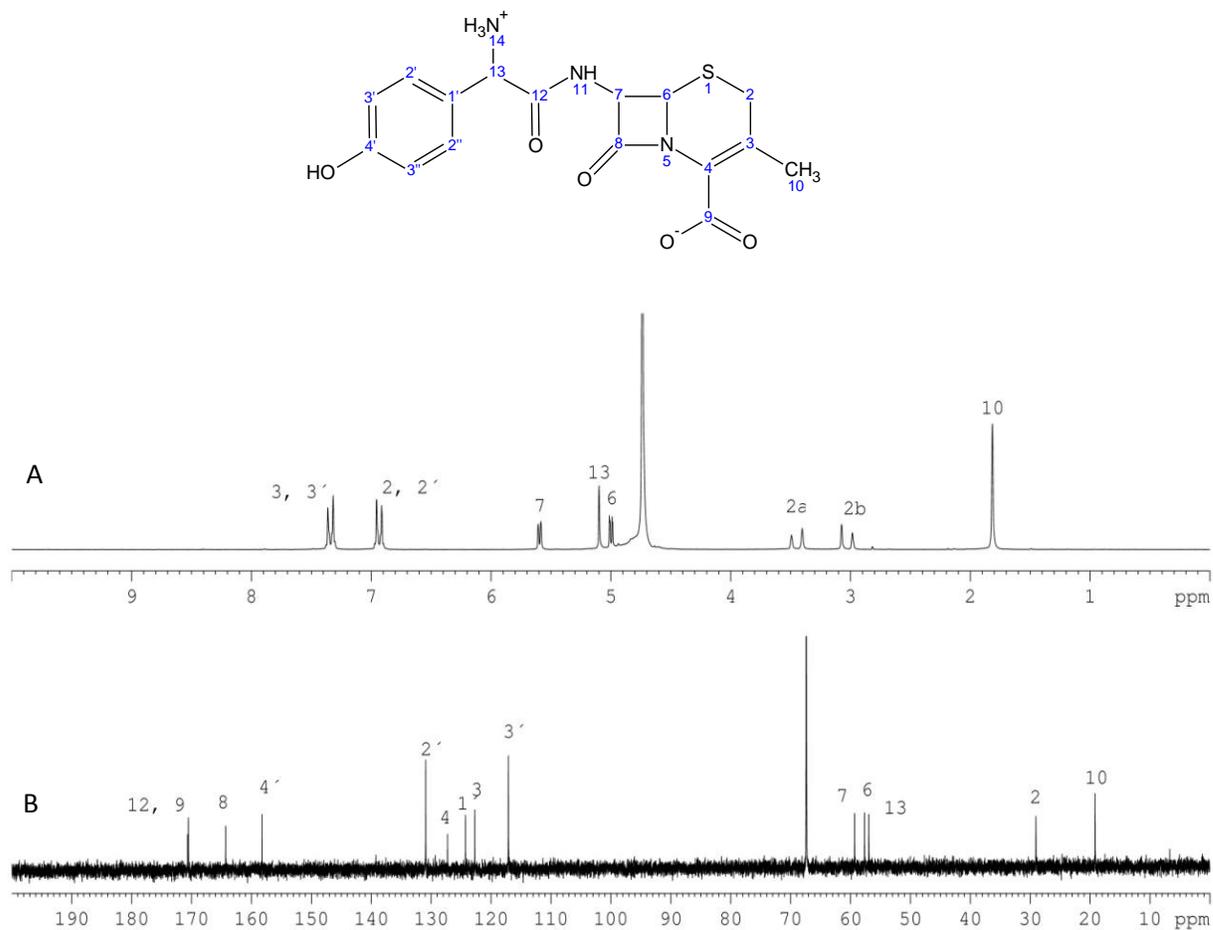


FIGURA 4.9 - Espectros de RMN ¹H (A) e de RMN de ¹³C{¹H} (B) da cefadroxila monoidratada
Fármaco padrão Aldrich (solução D₂O + 1 gota dioxana)

TABELA 4.3 – Assinalamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em D_2O das amostras de monohidrato de cefadroxila.

Carbono/ Hidrogênio	Deslocamento Químico (δ ppm)			
	Hidrogênio (^1H)		Carbono (^{13}C)	
	Aldrich	ROETS (1981)	Aldrich	AGUIAR (1998)
2a	3,0 (dd)	3,4 (dd)	29,0	30,9
2b	3,4	-	-	-
3	-	-	122,7	124,6
4	-	-	130,9	129
6	4,9 (d)	4,96 (d)	56,9	59,6
7	5,0 (d)	5,59 (d)	59,3	61,2
8	-	-	164,3	166,3
9	-	-	170,6	172,7
10	1,8(s)	1,88(s)	19,2	21,1
12	-	-	170,5	172,5
13	5,1 (s)	5,25 (s)	57,6	58,8
1'	-	-	124,3	126,2
2''	7,3 (d)	7,36(d)	127,3	132,8
3''	6,9 (d)	6,82 (d)	117,1	119
4'	-	-	158,2	160,1

*comparação entre os δ observados e publicados por ROETS (1982).

4.1.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de sólidos

Os espectros de RMN de ^{13}C CPMAS da amostra de cefadroxila anidra e padrão Sigma Aldrich foram obtidos nas mesmas condições para que as comparações fossem facilitadas. Para melhorar a intensidade dos sinais e remover os efeitos de anisotropia de deslocamento químico, foi utilizada a seqüência de polarização cruzada, combinada com a rotação no ângulo mágico (CPMAS). O resultado da análise é apresentado na FIGURA 4.10 e revela-se concordante com a difratometria de raios X, ou seja, os espectros das duas formas polimórficas analisadas cefadroxila anidra e padrão Sigma Aldrich, de fato são diferentes. Deste modo, os espectros de RMN de ^{13}C CPMAS sugerem que a cefadroxila ao ser desidratada em condições exaustivas (P_2O_5 e tolueno na pistola de Abderhaldeen), apresenta mudanças conformacionais, sobretudo na

região da fenila e do cefem, uma vez que estas foram as regiões do espectro RMN de ^{13}C CPMAS que mais diferiram entre si.

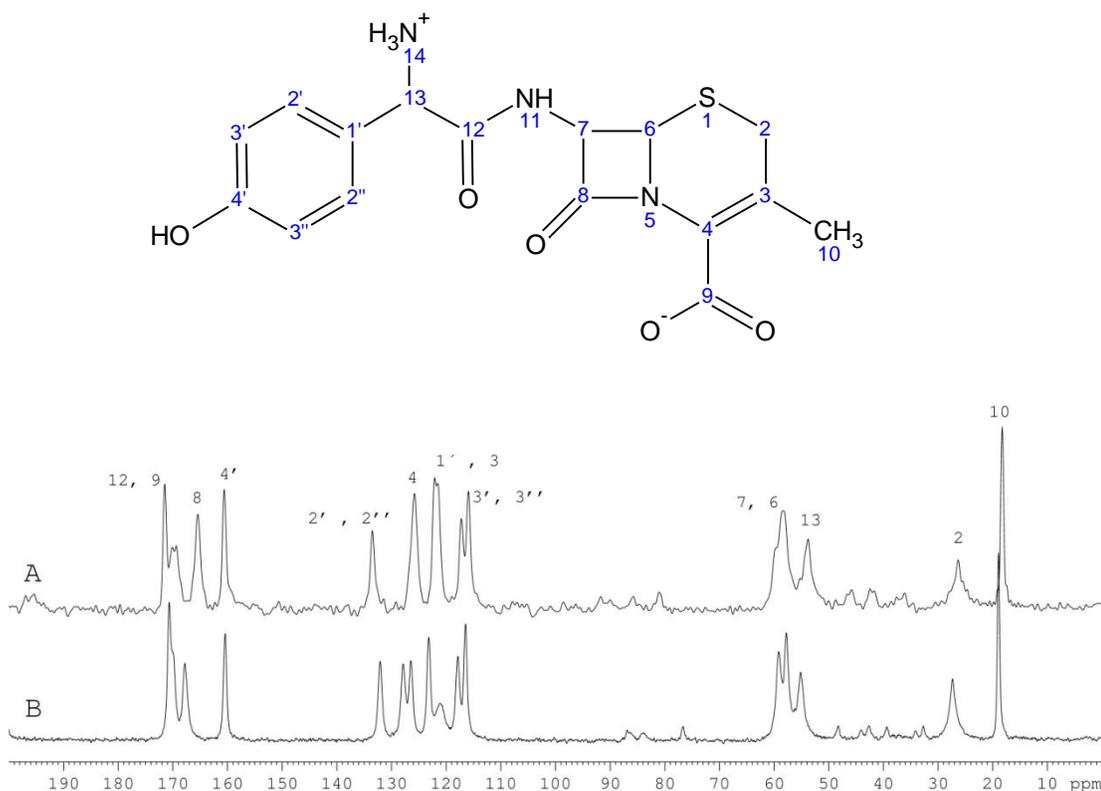


FIGURA 4.10 – Espectros de RMN de ^{13}C CPMAS da (A) cefadroxila padrão Sigma Aldrich e (B) cefadroxila anidra.

Os resultados na análise mostraram-se consoantes com os resultados descritos por AGUIAR (1998) em relação aos deslocamentos químicos isotrópicos, obtidos por comparação com o espectro em solução. O assinalamento dos carbonos está listado na TABELA 4.4.

TABELA 4.4 – Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C CPMAS e RMN de ^{13}C em solução

Carbono/Hidrogênio	$(\delta \text{ ppm})^{13}\text{C}$		
	SOLUÇÃO	RMN CPMAS monohidrato	RMN CPMAS Anidro
2	28,3	26,4	27,3
3	122	121,5	117,1
4	126,5	125,9	126,4/127,9
6	56,9	58,6	57,8
7	58,6	59,8	59,1
8	163,6	165,6	167,8
9	169,9	171,6/170,2/169,5	170,7/169,9/167,8
10	18,5	18,2	18,9
12	169,9	171,6/170,2/169,5	170,7/169,9/167,8
13	56,2	53,9	55,1
1'	123,6	122,2	121,1
2'/2''	130,2	133,6	132,1
3'/3''	116,4	116/117,3	116,4
4'	157,5	160,7	160,4

De maneira geral, o espectro de RMN de ^{13}C CPMAS da cefadroxila anidra apresenta maior resolução do que o espectro da cefadroxila padrão Sigma Aldrich. Tal fato poderia ocorrer por diferenças de cristalinidade entre as duas formas polimórficas, porém o difratograma de raios X da cefadroxila anidra não apresentou picos de difração mais finos e intensos do que os da cefadroxila padrão Sigma Aldrich. Assim, sugere-se que a maior resolução do espectro da cefadroxila anidra seja consequência do ambiente químico em torno desses núclídeos ter mudado a ponto dos deslocamentos químicos entre picos adjacentes serem distintos o suficiente para que sejam distinguidos no espectro de RMN de ^{13}C CPMAS, ou seja, de fato a remoção da água do cristal influenciou na geometria do cristal analisado.

Segundo SHIN e SHO (1992), a água de cristalização da cefadroxila estaria ligada através de ligações hidrogênio com o nitrogênio amínico e com a carbonila do sistema

beta-lactâmico. A análise comparativa dos sinais dos carbonos da beta-lactama nos espectros da forma monohidrato e anidra evidenciou grandes mudanças justamente nesses carbonos. Dessa forma os resultados obtidos por RMN de sólidos sugerem que pelo menos parte da água presente na estrutura da cefalexina mono-hidrato foi retirada durante o processo de desidratação, com conseqüente alteração nos ambientes químicos dos carbonos envolvidos em ligações hidrogênio com a água de cristalização. Vale a pena salientar que, embora o espectro de RMN de ^{13}C CPMAS da cefadroxila anidra seja diferente do da cefadroxila padrão Sigma Aldrich, provavelmente só há uma fase polimórfica na amostra de cefadroxila anidra. Isso é sugerido pois os sinais de ambos os espectros não aparecem desdobrados. Apesar de existir apenas uma fase cristalográfica na amostra, a calorimetria diferencial de varredura indicou uma transição entre polimorfos em 131°C . Estudos posteriores serão necessários para elucidar a transição observada por DSC.

Foram adquiridos espectros de RMN de ^{15}N CPMAS (FIGURA 4.11) apenas para o fármaco padrão Sigma Aldrich. O resultado da análise mostrou um único sinal de ^{15}N para cada nitrogênio presente na amostra. Esse resultado sugere que há apenas três ambientes químicos possíveis para três nitrogênios distintos, e está em concordância com os obtidos observando-se o núcleo de ^{13}C , assim como com o resultado de análise térmica, onde não foi observada transição de fase na amostra de cefadroxila monohidratada, tratando-se portanto de uma única fase cristalina.

Os deslocamentos químicos dos nitrogênios foram atribuídos segundo a proposta de PASCHAL e DORMAN (1978) para outras cefalosporinas que não a cefadroxila. A referência dos deslocamentos químicos foi corrigida segundo o trabalho de HAYASHI E HAYAMIZU (1991).

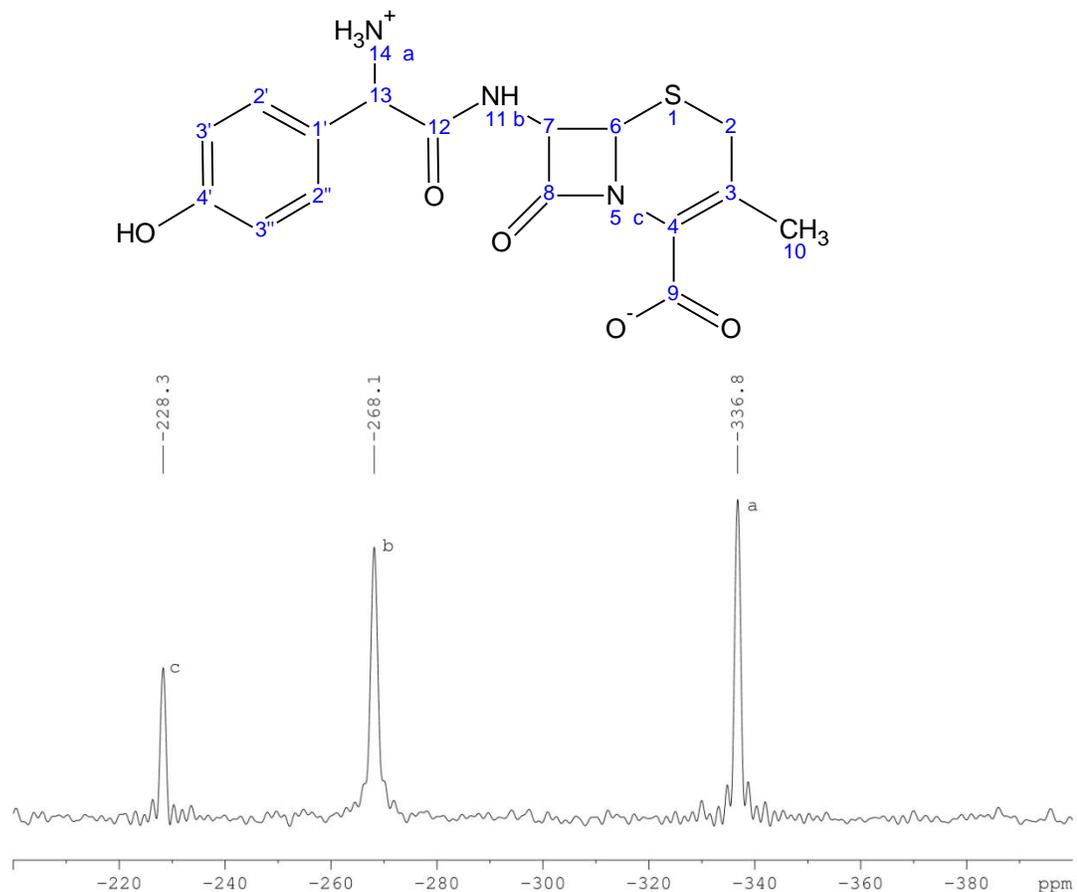


FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de ^{15}N CPMAS da cefadroxila mono-hidratada, fármaco padrão Aldrich.

Vale a pena ressaltar que o espectro de RMN de ^{15}N da amostra na forma sólida foi adquirido por uma seqüência de pulsos de polarização cruzada, na qual os núcleos de hidrogênio espacialmente próximos do núcleo de nitrogênio que gera o sinal transferem sua magnetização para esses núcleos. Como conseqüência disso tem-se sinais mais intensos, mesmo para núcleos com pequena constante giromagnética. Desta maneira, observa-se sinais pouco intensos para o nitrogênio da lactama, uma vez que este não possui fonte de hidrogênios espacialmente próxima, e sinal mais intenso para o nitrogênio amínico, ligado diretamente a hidrogênios. Os deslocamentos químicos observados estão indicados na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 – Deslocamentos químicos de RMN de ^{15}N CPMAS da cefalexina monoidratada

composto	- δ (ppm)		
	N_a	N_b	N_c
Cefadroxila	337	268	228

Vale a pena ressaltar que os espectros de RMN CPMAS de ^{15}N da cefadroxila são reportados em caráter inédito nesta dissertação.

4.1.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi feita apenas para a amostra padrão Aldrich (CEFPSA), com magnificações que variaram de 500 a 5000 vezes (FIGURA 4.12). Devido ao fato da amostra não ser condutora, foi necessário o revestimento da mesma com um fino filme de ouro. As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a cefadroxila apresentou-se como um cristal irregular, sem formato definido e com tamanho na faixa de 80-100 μm .

Não foram encontrados relatos sobre análises por microscopia eletrônica de varredura da cefadroxila monoidratada, sendo estas portanto de caráter inédito.

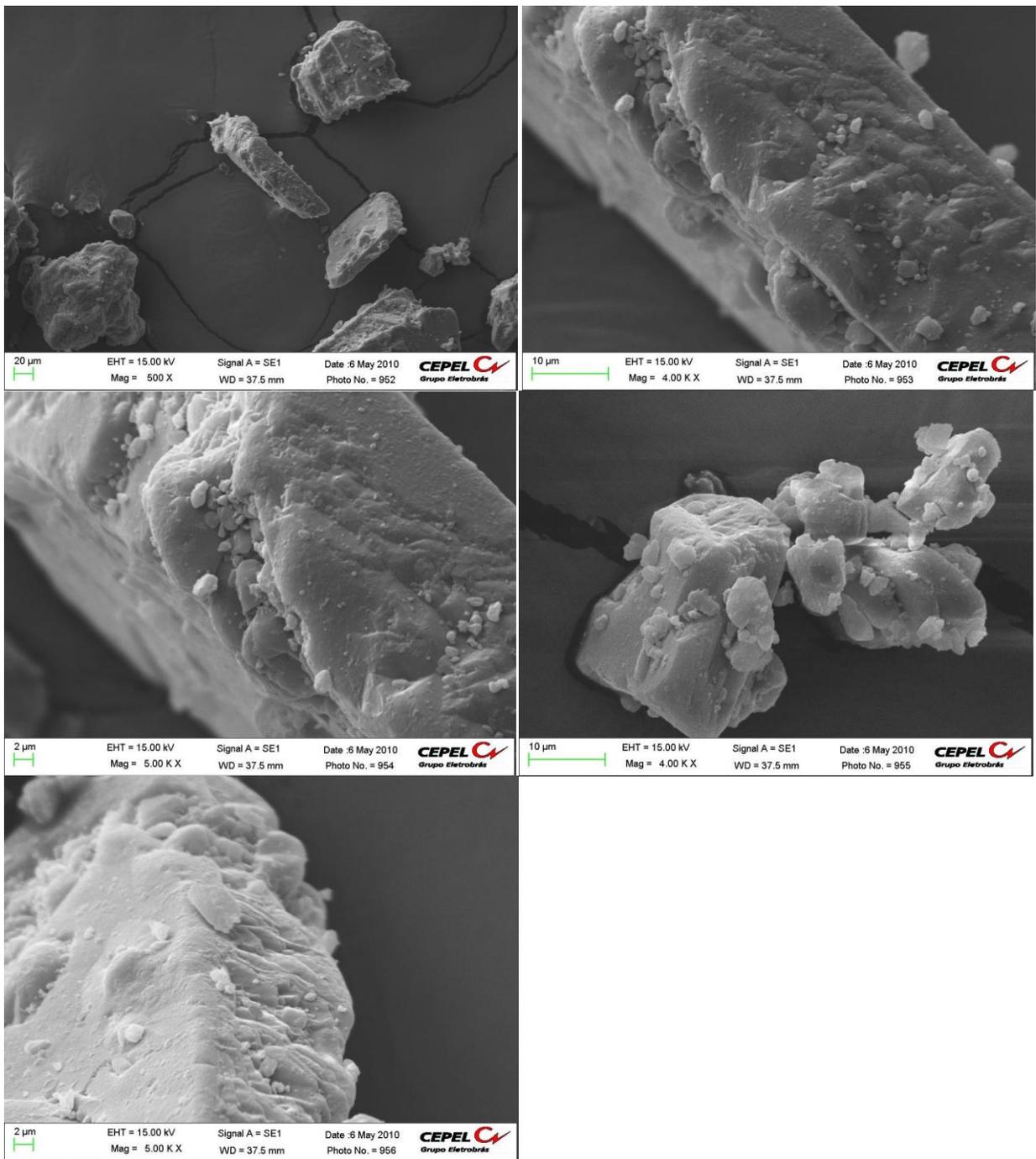


FIGURA 4.12 – Micrografias da cefadroxila Padrão Sigma Aldrich. Magnificações entre 500 e 5000X.

4.1.2 MEDICAMENTOS DE CEFADROXILA

Foram realizadas análises com cápsulas de medicamentos que apresentam a cefadroxila como princípio ativo único. A escolha da forma farmacêutica deu-se pelo fato de teoricamente haver menor quantidade de excipientes que poderiam interferir nas análises propostas. Para caracterizar comparativamente o sistema cristalino da cefadroxila foram feitas análises por DRX, FTIR e RMN de ^{13}C CPMAS, as quais foram diretamente comparadas com os resultados obtidos para a cefadroxila monoidratada (Sigma Aldrich).

O difratograma de raios X da amostra comercial foi adquirido exatamente nas mesmas condições que as do fármaco padrão Sigma Aldrich, para que as comparações fossem fidedignas. A análise comparativa por difratometria de raios X (FIGURA 4.13) sugere que o fármaco contido nas cápsulas, de fato, é cefadroxila monoidratada, já que há coincidência dos picos dos difratogramas em questão. Entretanto observam-se diferenças de intensidade consideráveis em alguns dos picos de difração, o que pode ser ocasionado pela coincidência entre picos do fármaco e picos dos excipientes contidos nas cápsulas ou a diferenças de cristalinidade entre os fármacos analisados. Não foi possível observar picos de difração isolados dos possíveis excipientes das cápsulas. Tal fato pode ser devido a pequena quantidade dos excipientes presentes na amostra, ou por haver coincidência entre os picos dos excipientes e o pico da amostra.

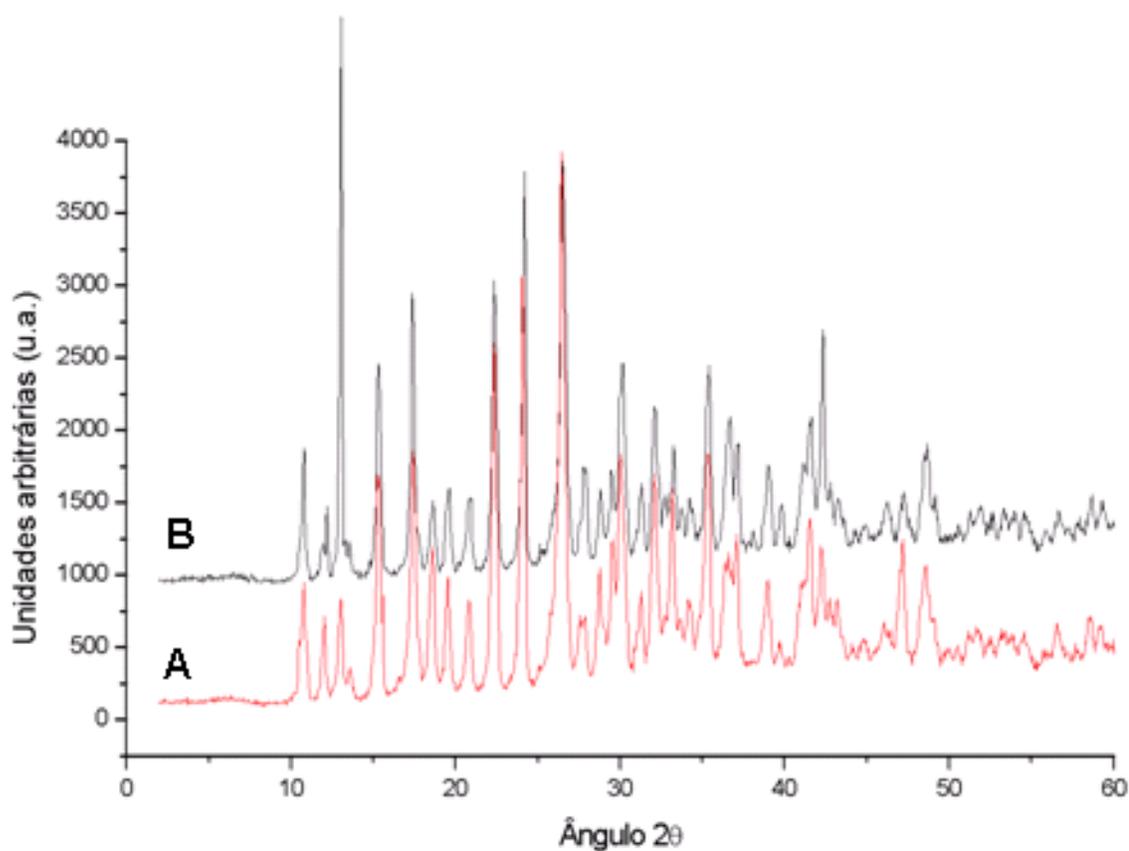


FIGURA 4.13 – Difrátogramas de raios X das amostras de (A) cefadroxila cápsula e (B) cefadroxila padrão Sigma Aldrich.

Os espectros vibracionais de infravermelho médio das amostras de cápsulas e do fármaco padrão Sigma Aldrich (FIGURA 4.14) foram adquiridos nas mesmas condições. Não houve diferença entre os espectros de infravermelho do fármaco Sigma Aldrich e do medicamento cápsulas, o que corroborou os resultados de difratometria de raios X obtidos, inclusive na não detecção de possíveis excipientes.

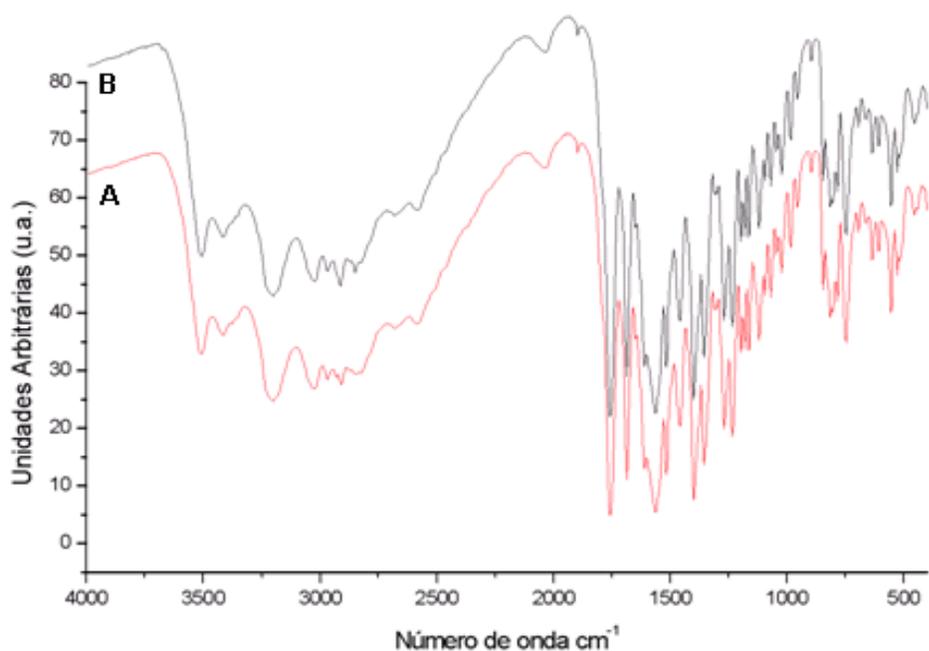


FIGURA 4.14. Espectro de Infravermelho das amostras de (A) cefadroxila padrão Sigma Aldrich e (B) cefadroxila cápsulas.

Os espectros de RMN de ¹³C CPMAS do fármaco padrão Sigma Aldrich e do medicamento cápsulas estão indicados na FIGURA 4.15. O resultado da análise mostra que ambos os espectros são extremamente semelhantes, ou seja, o conteúdo o medicamento em cápsulas e o fármaco padrão Sigma Aldrich apresentam o mesmo sistema polimórfico. Como nas outras técnicas estudadas (infravermelho e difratometria de raios X), também não foram observados sinais dos excipientes da amostra na análise por RMN de ¹³C CPMAS.

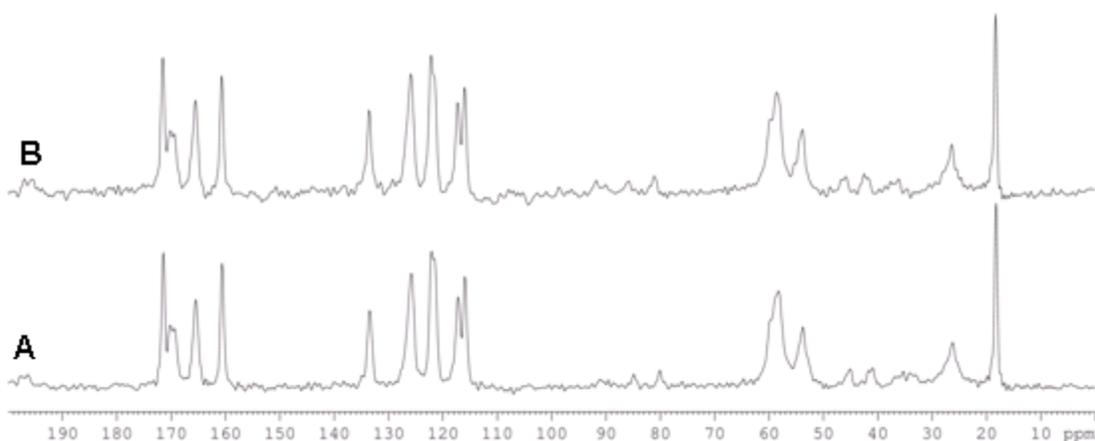


FIGURA 4.15 – Espectro de RMN de ¹³C CPMAS da (A) cefadroxila cápsulas e da (B) cefadroxila padrão Sigma Aldrich.

Os resultados de DRX, FTIR e RMN de ¹³C CPMAS foram congruentes na caracterização do sistema cristalino, já que nenhuma das análises foi capaz de apontar a presença de excipientes no medicamento e todas as análises indicaram que o polimorfo presente no medicamento cápsulas é o mesmo presente no fármaco padrão Sigma Aldrich, ou seja, a forma monoidratada, o que torna válido para o medicamento todas as análises feitas para o fármaco padrão Sigma Aldrich.

4.2 CEFALEXINA

Cefalexina é o nome dado pela Denominação Comum Brasileira (ANVISA, 2009) ao ácido (6R,7R)-7-[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetamido]-3-metil-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]-oct-2-eno-2-carboxílico, cuja estrutura está mostrada na FIGURA 4.16. Neste trabalho foram estudadas amostras da cefalexina padrão Sigma Aldrich (CEXPSA) e de medicamentos comerciais disponíveis no mercado brasileiro, além de cinco novos polimorfos que foram preparados nesta dissertação.

Para a amostra de cefalexina padrão Sigma Aldrich, o ponto de fusão encontrado foi de 200°C. Entretanto durante a análise foi observada decomposição do material, o que é uma característica de compostos zwitteriônicos. FULIAS (2010) observou o mesmo comportamento em uma amostra de cefalexina. A partir dos resultados obtidos por termogravimetria acoplada a um espectrômetro de infravermelho médio o autor concluiu que isso ocorria devido a perda de anidrido carbônico e água (194°C) e posteriormente benzeno (200°C), quando a amostra foi submetida a aquecimento em atmosfera de ar.

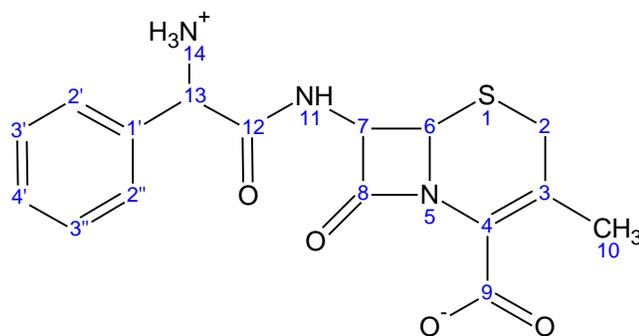


FIGURA 4.16 – Estrutura química da cefalexina

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA CEFALEXINA PADRÃO SIGMA ALDRICH

4.2.1.1. Difractometria de raios X

O difratograma da amostra de cefalexina padrão Sigma Aldrich (FIGURA 4.17) apresentou vários picos de difração no intervalo estudado ($2^\circ < 2\theta < 60^\circ$), o que permitiu

inferir que a amostra possui caráter cristalino, ou seja, a amostra em questão não é amorfa. Os picos de difração mais intensos encontram-se em 2θ 17° , $22,5^\circ$ e 28° .

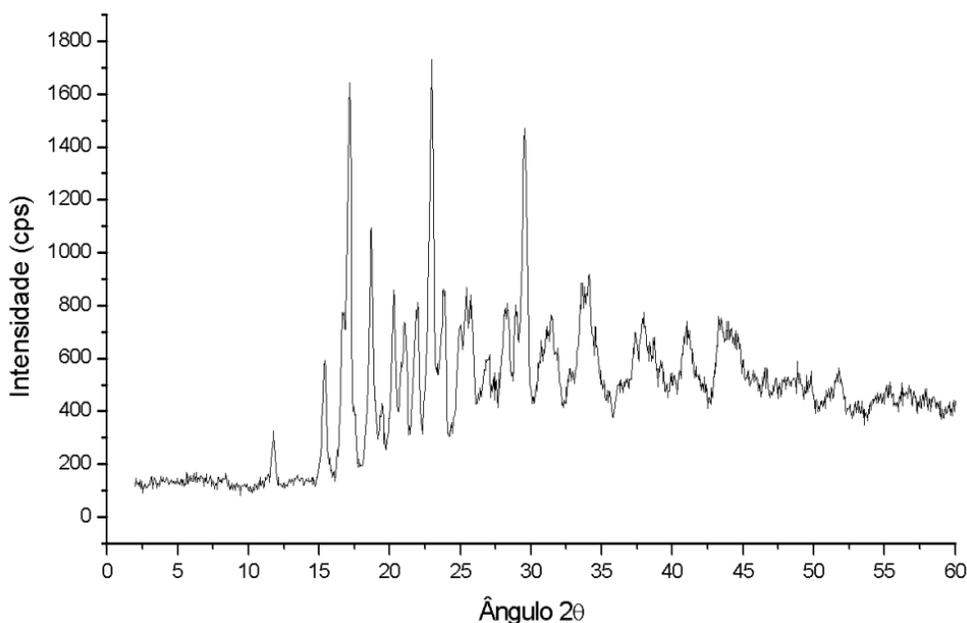


FIGURA 4.17 – Difratograma de raios X da cefalexina monoidratada padrão Sigma Aldrich

STEPHENSON e colaboradores (1998) estudaram o fenômeno dos dessolvatos isomórficos por difração de Raios X em um intervalo de $3^\circ < 2\theta < 45^\circ$, em amostras de cefalexina monoidratada obtida da fábrica detentora da patente original do fármaco, a Eli Lilly. O resultado da análise mostrou um padrão de Raios X distinto do obtido neste trabalho, em relação à posição dos picos de difração mais intensos, observados em 2θ $7,5^\circ$ e $8,9^\circ$, o que sugere que a forma monoidratada relatada na literatura resulta de outro polimorfo.

OTSUKA e colaboradores (2006) estudaram a influência da cristalinidade da cefalexina nos perfis dos difratogramas de raios X em um intervalo de $3^\circ < 2\theta < 40^\circ$ (FIGURA 4.18), assim como nos espectros na região do infravermelho próximo. Nesse estudo o autor

utilizou cefalexina obtida de uma indústria farmacêutica japonesa, e não explicitou o grau de hidratação da amostra. Os picos de difração mais intensos foram observados em 2θ 7,5° e 17°.

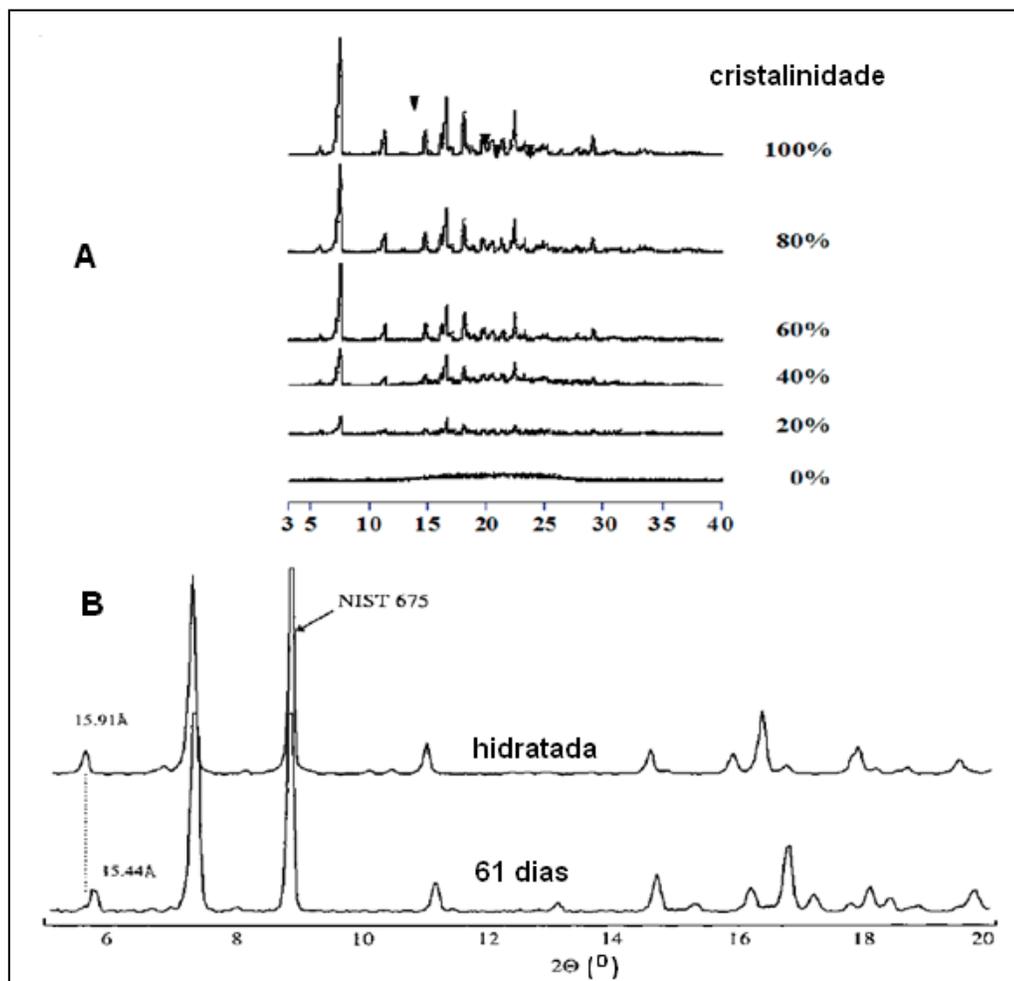


Figura 4.18. Difratogramas de raios X de amostras de cefalexina com diferentes graus de cristalinidade: (A) publicados por Otsuka et al (2006); (B) das formas monohidratadas e anidra publicadas por Stephenson et al(1998).

4.2.1.2. Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

As curvas TG/DTG obtidas para a cefalexina Sigma Aldrich em atmosfera de N_2 estão mostradas na FIGURA 4.19. A primeira perda de massa de 5,4% (64°C) corresponde a

desidratação do composto e a massa perdida é a de de 1,1 mol de água, o que caracteriza a cefalexina padrão Sigma Aldrich como sendo um monoidrato.

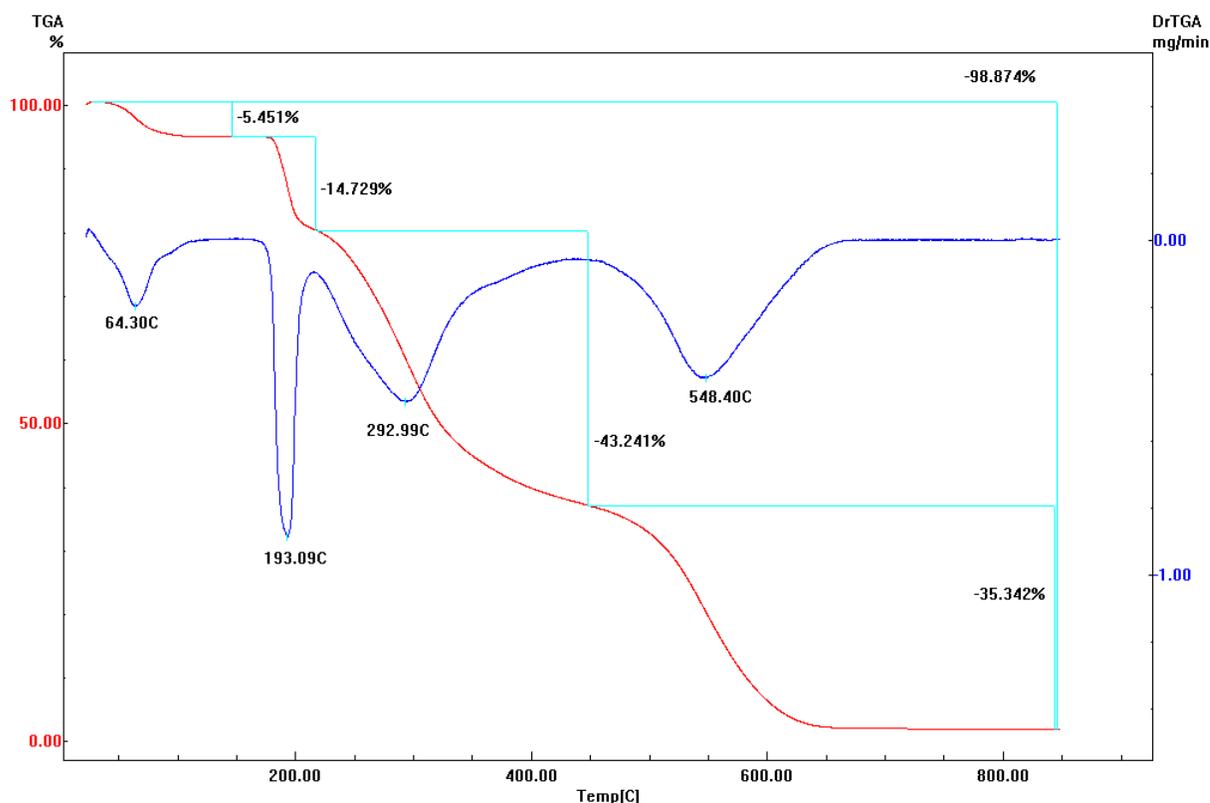


FIGURA 4.19 – Análise termogravimétrica da cefalexina padrão Sigma Aldrich.

Acima de 150°C inicia-se a degradação da estrutura, a qual ocorre basicamente em três etapas: a primeira é uma etapa bastante definida pela curva DTG e rápida e onde 14,7% (193°C) da massa é perdida; subsequente ocorre uma segunda perda, também definida pela curva DTG, entretanto mais lenta, em que 43,2% (293°C) da massa são perdidos, e na terceira e última etapa da degradação da cefalexina ocorre a perda de 35,35% (548°C). Ao final da análise restou um total de 1,13% da massa total analisada, o que sugere a presença de compostos inorgânicos na amostra. No caso da degradação sob fluxo de nitrogênio, não foi possível propor os fragmentos que foram

perdidos, e isso pode significar que os fragmentos perdidos são na verdade uma mistura de fragmentos. FULIAS et al (2010) fizeram a análise dos gases desprendidos (EGA) pela degradação com queima da cefalexina em atmosfera de ar. Para isso utilizou um analisador termogravimétrico acoplado a um espectrômetro de infravermelho. Os resultados da EGA mostraram-se conflitantes com os obtidos nesta dissertação, ou seja, a degradação com queima sofre influência importante da atmosfera em que a análise se processa.

4.2.1.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise por calorimetria de diferencial de varredura da cefalexina monoidratada (FIGURA 4.20) foi empregada com o intuito de tentar detectar alguma transição endo ou exotérmica que pudesse ocorrer antes do início da decomposição do fármaco analisado, e por esse motivo a análise foi feita até 170°C com dois ciclos de aquecimento, intercalados pelo resfriamento das amostra mantida no interior da cápsula de análise. Dessa forma foi possível determinar se o sistema polimórfico presente seria enantiotrópico (transições reversíveis) ou monotrópico (transições irreversíveis).

Na faixa de temperatura estudada, foi observado um pico endotérmico no primeiro ciclo de aquecimento, nenhum pico no resfriamento subsequente e uma pequena mudança exotérmica na linha base do segundo ciclo de aquecimento. Como o pico endotérmico não se repetiu nesse segundo aquecimento, sugere-se que seja resultado da transição entre os polimorfos de cefalexina presentes na amostra. A mudança na linha base durante o segundo aquecimento indica que duas transições distintas podem ter ocorrido simultaneamente, uma em um sistema enantiotrópico e outra em um sistema monotrópico.

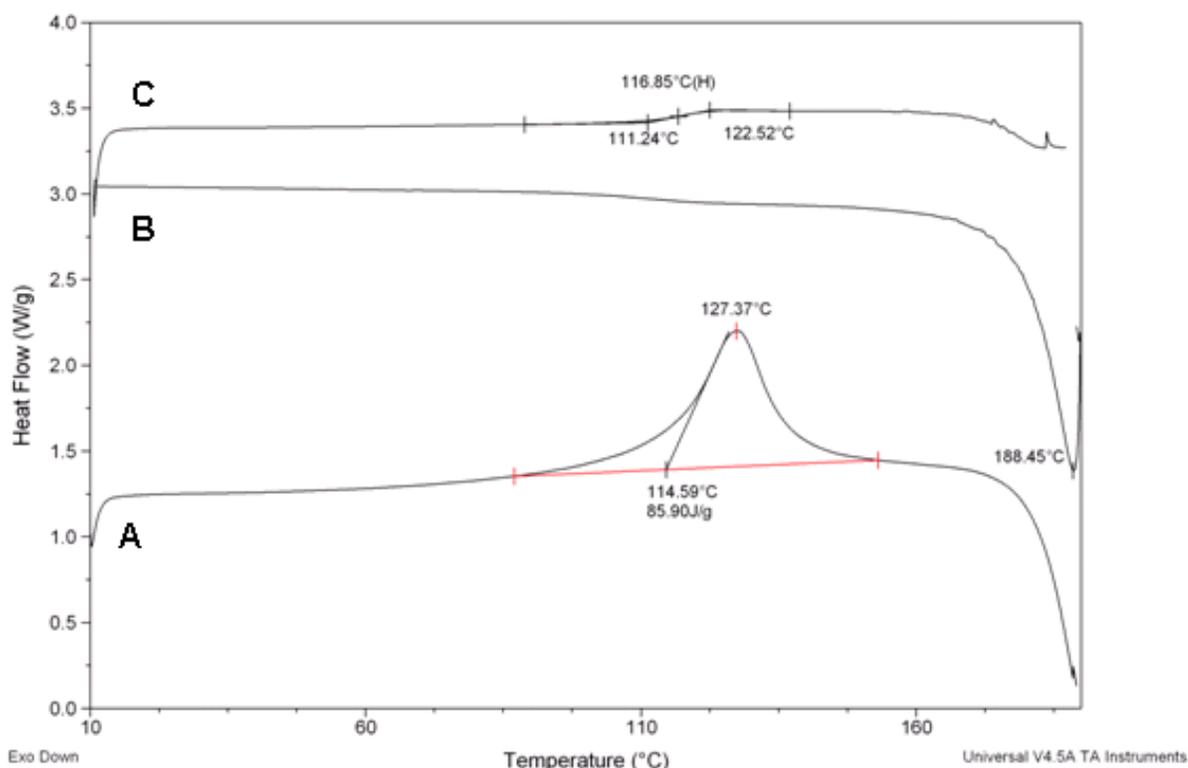


FIGURA 4.20 - Calorimetria diferencial de varredura da cefalexina padrão Sigma Aldrich. (A) primeiro ciclo de aquecimento; (B) resfriamento; (C) segundo ciclo de aquecimento.

Não foram encontradas na literatura análises por calorimetria diferencial de varredura para cefalexina padrão Sigma Aldrich (monoidrato de cefalexina), sendo as desta dissertação de caráter inédito.

4.2.1.4 Espectroscopia de infravermelho médio

A caracterização de uma amida por infravermelho médio é feita basicamente pela deformação axial da carbonila e pela deformação angular da ligação N-H, conhecidos respectivamente como banda de amida I e banda de amida II. A banda de amida I, usualmente aparece entre volta de $1640\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ quando em fase sólida, mas a frequência de vibração depende também do grau de ligações hidrogênio presentes na

amostra. A deformação angular da ligação N-H (Amida II) é uma banda com cerca de metade ou um terço da intensidade da banda de amida I, e esta vibração aparece usualmente entre 1590-1620 cm^{-1} . No caso de lactamas de 4 membros as absorções de deformação axial da carbonila devem estar por volta de 1730-1760 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2005).

O espectro de absorção no infravermelho da cefalexina monoidratada Sigma Aldrich está mostrada na FIGURA 4.21. As principais absorções observadas estão listadas na TABELA 4.5.

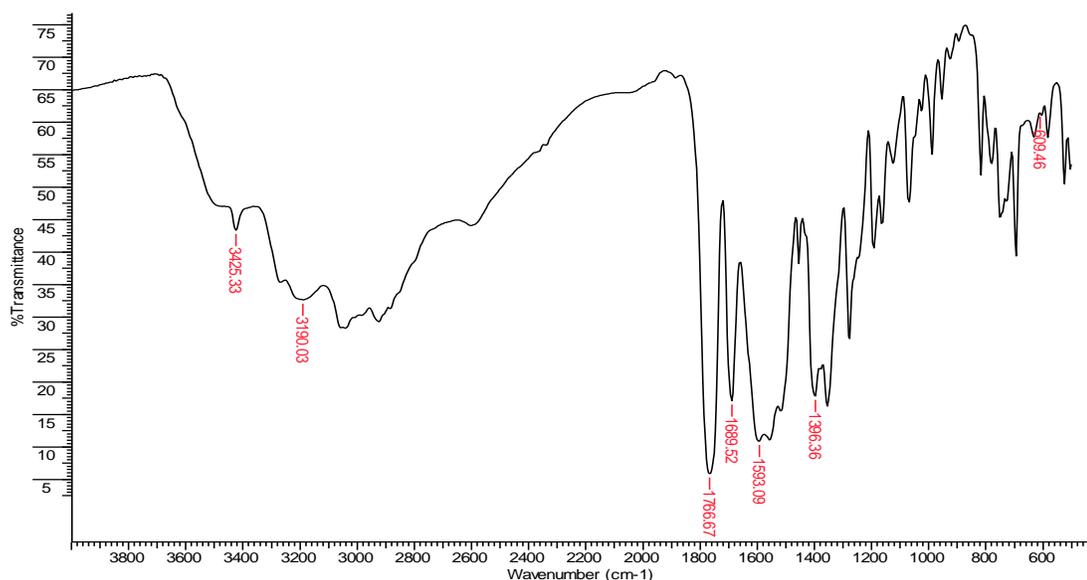


FIGURA 4.21 - Espectro de infravermelho médio da cefalexina padrão Sigma Aldrich.

Na literatura foram encontrados alguns poucos trabalhos acerca da caracterização da cefalexina por espectroscopia de absorção no infravermelho. Entretanto, os autores não detalharam o grau de hidratação das amostras analisadas, o que dificulta a comparação dos resultados. SHINDE et al (2010) estudaram a farmacotécnica de produção de comprimidos de cefalexina que contém polímeros hidrofílicos, e para isso utilizaram

diversas técnicas, dentre elas a espectroscopia de absorção no infravermelho médio. Entretanto, os resultados do autor não são comparáveis com os encontrados neste trabalho, o que sugere que existe diferença entre os sistemas estudados.

LOZANO E BOMIS (1987) estudou a coordenação de íons metálicos com cefalexina por infravermelho, porém não apresentou os valores exatos das bandas encontradas. DI STEFANO et al (2004) estudaram complexos metálicos da cefalexina diidratada (Fluka). Tanto o fármaco de partida quanto os complexos metálicos resultantes foram caracterizados por FTIR. As frequências de absorção reportadas por Di Stefano e colaboradores são similares com as encontradas neste trabalho, como mostrado na TABELA 4.6.

TABELA 4.6 - Frequências de absorção na região do infravermelho da cefalexina padrão Sigma Aldrich.

Cefalexina diidratada*	Absorção (cm ⁻¹) Cefalexina monoidratada†	Modo de Absorção
3350-3340	3425	v _{O-H}
3277, 3220, 3170	3190	v _{N-H} (amida)
2608	2610	v _{NH₃⁺}
1758	1766	v _{C=O} (β-Lactama)
1690	1689	v _{C=O} (amida I) + v _{C-N}
1594	1593	v _{COO} (assim)
-	1519	δ _{N-H} (amida II)
1409	1396	v _{COO} (sim)

*Di Stefano, 2004

†Este trabalho

4.2.1.5 Ressonância magnética nuclear em solução: RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 4.22) foram feitos para verificar a integridade das estruturas da cefalexina padrão Sigma Aldrich e seu grau de pureza, quando avaliado por esta técnica. O assinalamento dos hidrogênios baseou-se na proposta feita por BASSO et al (2006), enquanto o assinalamento dos carbonos foi feito de acordo com o trabalho de doutoramento de AGUIAR (1998).

Os deslocamentos químicos, e as multiplicidades do espectro de RMN ^1H encontrados para a cefalexina são consonantes com os da literatura. Não foram observadas sinais de outros compostos senão os sinais característicos da amostra. Desta forma, o fármaco Sigma Aldrich foi considerado um fármaco puro, dentro dos limites de detecção da RMN.

Os deslocamentos químicos (^1H e ^{13}C) encontrados para a cefalexina monoidratada são sumarizadas na TABELA 4.7. Os resultados de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ encontrados nesta dissertação são plenamente concordantes com os resultados obtidos por TORI (1981) e PASCHAL e DORMAN (1978). Entretanto, os resultados de RMN ^1H são conflitantes com os dados publicados por BASSO et al (2006), já que no trabalho deste autor os deslocamentos químicos e multiplicidades apresentaram diferenças quando comparados com os dados obtidos nesta dissertação: por exemplo, as multiplicidades dos sinais em 4,79 ppm e 5,38 ppm publicadas (espectro não mostrado) correspondem a um duplo duplete, o que é uma incoerência do ponto de vista da estrutura conhecida da cefalexina.

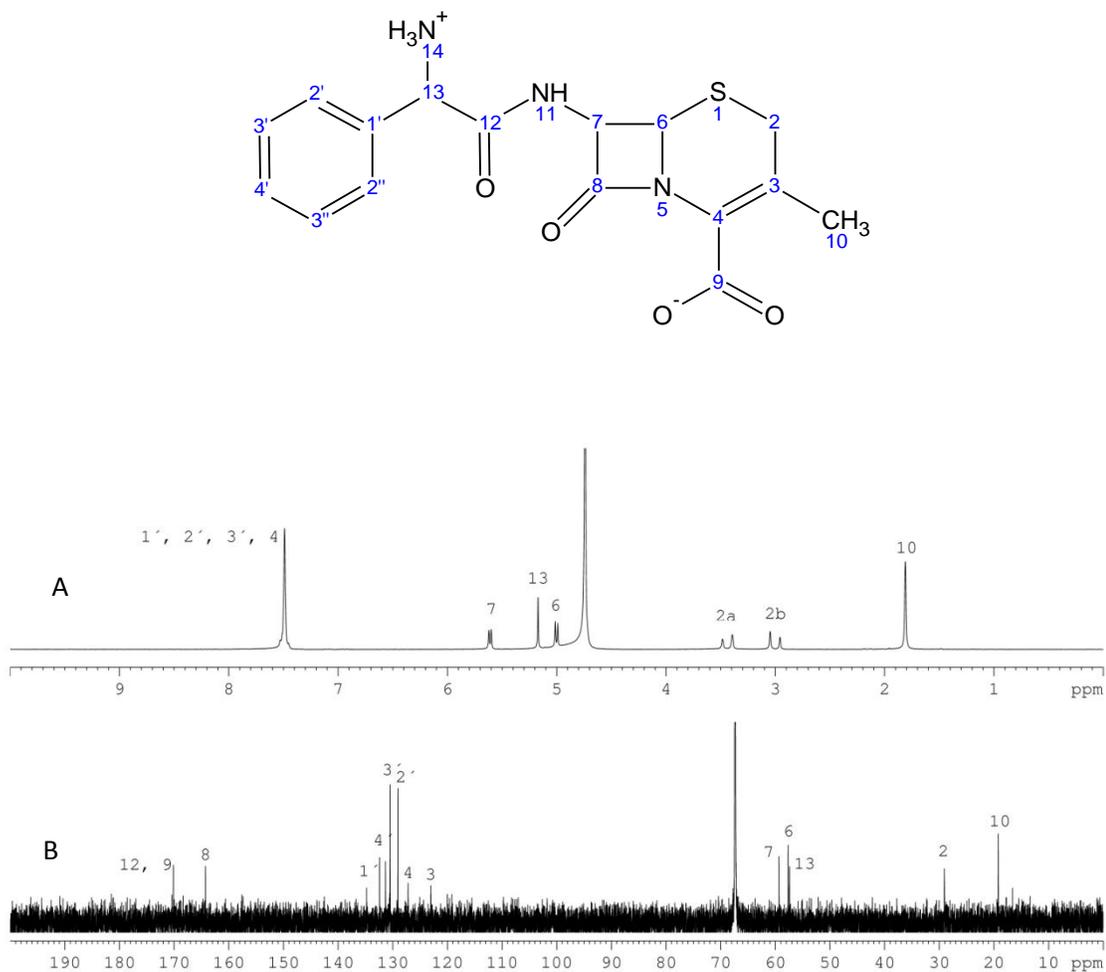


FIGURA 4.22 - Espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da cefalexina monoidratada, fármaco padrão Aldrich. (solução D_2O + 1 gota dioxana)

TABELA 4.7 – Assinalamentos dos espectros de ^1H e ^{13}C em D_2O das amostras de cefalexina padrão Sigma Aldrich.

Carbono/ Hidrogênio	Deslocamento Químico (δ ppm)				
	Hidrogênio (^1H)		Carbono (^{13}C)		
	Este trabalho	BASSO et al. (2006)	Este trabalho	TORI et al. (1981)	PASCHAL e DORMAN (1978)
2a	3,0(d)	3,14(d)	29	29	29,2
2b	3,4(d)	3,24(d)	-	-	-
3	-	-	123	122,7	122,7
4	-	-	127,2	127,1	127,4
6	5,0(d)	4,79(dd)	57,6	57,7	57,8
7	5,6(d)	5,38(dd)	59,4	59,3	59,1
8	-	-	164,2	164,3	164,8
9	-	-	170,1	170,2	170,6
10	1,8 (s)	2,94(s)	19,2	19,2	19,3
12	-	-	170,1	170,2	176,9
13	5,17(s)	4,94(s)	57,4	57,4	n.d.
1'	-	-	132,4	132,4	n.d.
2'/2''	7.49(s)	7,24(m)	129	129,1	n.d.
3'/3''	7.49(s)	7,24(m)	130,5	130,5	n.d.
4'	7.49(s)	7,24(m)	131,4	131,4	n.d.

n.d. – não divulgado

4.2.1.6 Ressonância magnética nuclear de sólidos

RMN de ^{13}C CPMAS

Foram obtidos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C de sólidos para o fármaco padrão Sigma Aldrich (FIGURA 4.23). Para melhorar a intensidade dos sinais e remover os efeitos de anisotropia de deslocamento químico, foi utilizada a seqüência de polarização cruzada, combinada com a rotação no ângulo mágico (CPMAS). Os resultados na análise mostraram-se consoantes com os resultados já publicados na literatura (AGUIAR, 1998) em relação aos deslocamentos químicos isotrópicos, os quais foram elucidados conjuntamente com o espectro em solução, como sumarizado na TABELA 4.8.

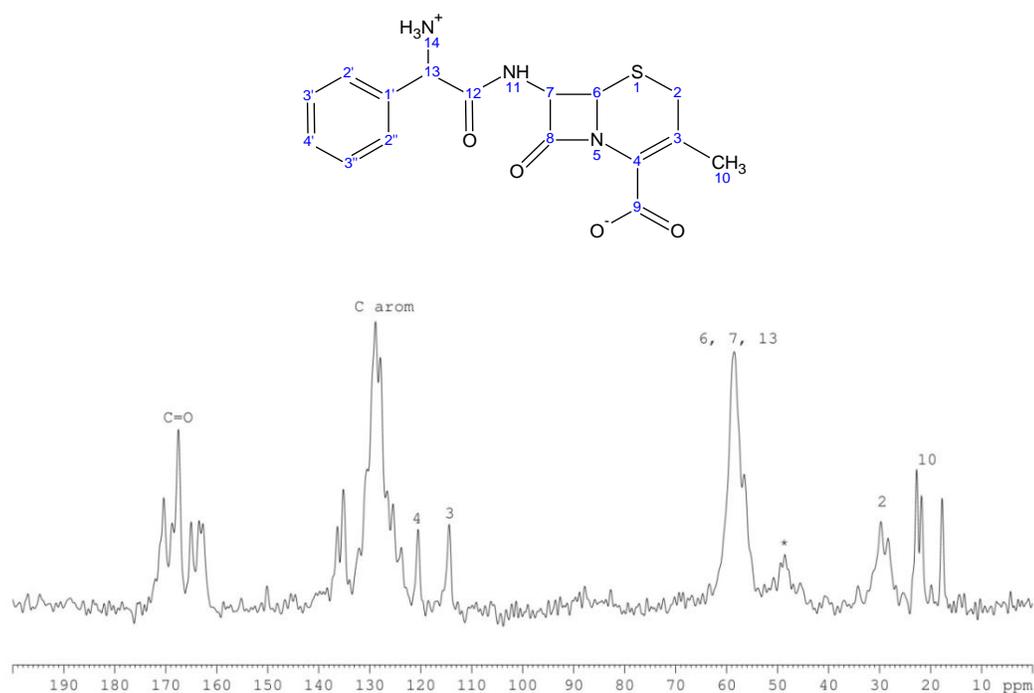


FIGURA 4.23 - Espectros de RMN CPMAS de ^{13}C do Fármaco Padrão Sigma Aldrich. (*) denota bandas rotacionais

TABELA 4.8 – Deslocamentos químicos da cefalexina monoidratada RMN de ^{13}C em solução e RMN de ^{13}C CPMAS

Carbono	Deslocamento Químico (δ ppm) - ^{13}C	
	RMN de ^{13}C SOLUÇÃO	RMN de ^{13}C CPMAS
2	29,0	28,4 / 29,8
3	123,0	114,4
4	127,2	120,5
6	57,6	56,6 / 58,5
7	59,4	56,6 / 58,5
8	164,2	162,75/163,5/165,0
9	170,1	167,5 / 168,8 / 170,4 / 172,0
10	19,2	17,8 / 19,9 / 21,8 / 22,8
12	170,1	167,5 / 168,8 / 170,4 / 172,0
13	57,4	56,6 / 58,5
1'	132,4	123,9 - 136,37
2'/2''	129,0	123,9 - 136,37
3'/3''	130,5	123,9 - 136,37
4'	131,4	123,9 - 136,37

A simples comparação da estrutura da cefalexina com o espectro de RMN de ^{13}C CPMAS evidenciou a presença de um número maior de sinais do que de átomos de carbono na estrutura do fármaco, ou seja, há mais de um sinal para um mesmo carbono. Na prática, isso implica em que as orientações espaciais dos núcleos analisados são diferentes, ou seja, no caso da cefalexina, o fármaco está empacotado em sistemas cristalinos diferentes, o que caracteriza um sistema polimórfico.

O fato da cefalexina padrão Sigma Aldrich constituir-se de um sistema polimórfico, ficou evidenciado pela ressonância magnética nuclear de sólidos, com vários sinais duplicados e triplicados e corroborada pelo resultado da calorimetria diferencial de varredura que indica que este fármaco apresenta uma transformação exotérmica em 127°C , antes de sofrer a degradação.

RMN CPMAS de ^{15}N

Foi adquirido o espectro de RMN de ^{15}N CPMAS da cefalexina monoidratada Sigma Aldrich. O espectro obtido (FIGURA 4.24) apresentou três sinais para cada nitrogênio presente na amostra, ou seja, para os núcleos de nitrogênio da amostra foram encontrados três ambientes químicos diferentes para cada um dos nitrogênios. Esses resultados são concordantes com os resultados de RMN de ^{13}C CPMAS, que também apresentou alguns de seus sinais triplicados, e com os resultados da calorimetria diferencial de varredura.

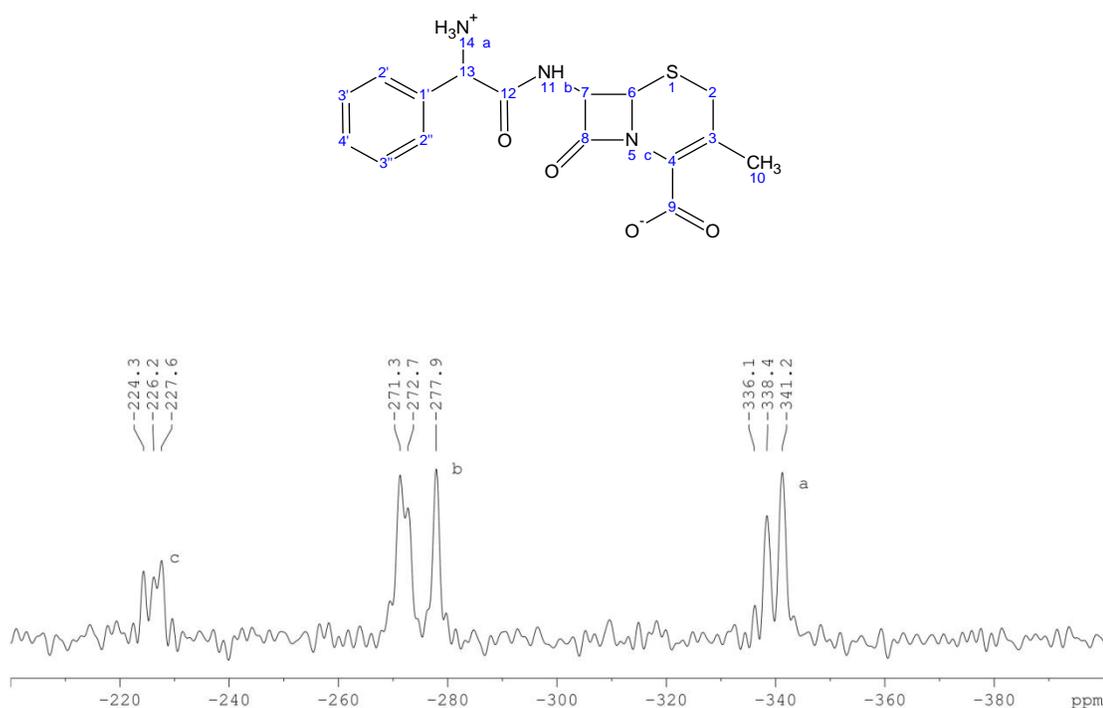


FIGURA 4.24 – Espectro de RMN de ^{15}N CPMAS da cefalexina padrão Sigma Aldrich

O espectro de RMN de ^{15}N da cefalexina em solução não foi encontrado na literatura. Desta maneira, a atribuição dos sinais observados no espectro de RMN de ^{15}N CPMAS foi feita partindo-se da proposta de assinalamento de RMN em solução de PASCHAL E DORMAN (1978), feita para outras cefalosporinas. Os autores utilizaram o sinal do nitrogênio do NH_4Cl como referência interna.

Nesta dissertação, a referência interna usada para a obtenção dos espectros foi o nitrogênio da glicina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$). Para que as comparações dos deslocamentos químicos fosse feita, foi corrigido o deslocamento químico do nitrogênio da glicina em relação ao deslocamento químico do nitrogênio do NH_4Cl , utilizando-se os valores publicados por HAYASHI e HAYAMIZU (1991).

A TABELA 4.9 sumariza os deslocamentos químicos observados para a cefalexina. Vale ressaltar que os espectros de RMN de ^{15}N CPMAS da cefalexina padrão Sigma Aldrich (monoidrato de cefalexina) estão reportados em caráter inédito nesta dissertação.

TABELA 4.9 – Deslocamentos químicos da cefalexina padrão Sigma Aldrich RMN de ^{15}N em solução e RMN de ^{15}N CPMAS

composto	- δ (ppm)		
	N_a	N_b	N_c
Cefalexina	336;338;341	271;273;278	224;226;228
	n.d.*	-83,7 [#] (257) [§]	-29,9 [#] (211) [§]

*não indicado (ref. 5) [#]espectro obtido em solução, em D_2O (Paschal e Dorman, 1978). [§]corrigido para δ_{glicina} , em -347,54 (Hayashi e Hayamizu, 1991).

4.2.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi feita com magnificações que variaram de 178 a 7340 vezes (FIGURA 4.25). As análises por microscopia eletrônica de varredura mostraram que a cefalexina apresenta-se como um cristal prismático, com tamanho da ordem de 16-20 μm . Não foram encontrados relatos na literatura acerca de análises por microscopia eletrônica de varredura da cefalexina padrão Sigma Aldrich (monoidrato de cefalexina), sendo estas, portanto, de caráter inédito.

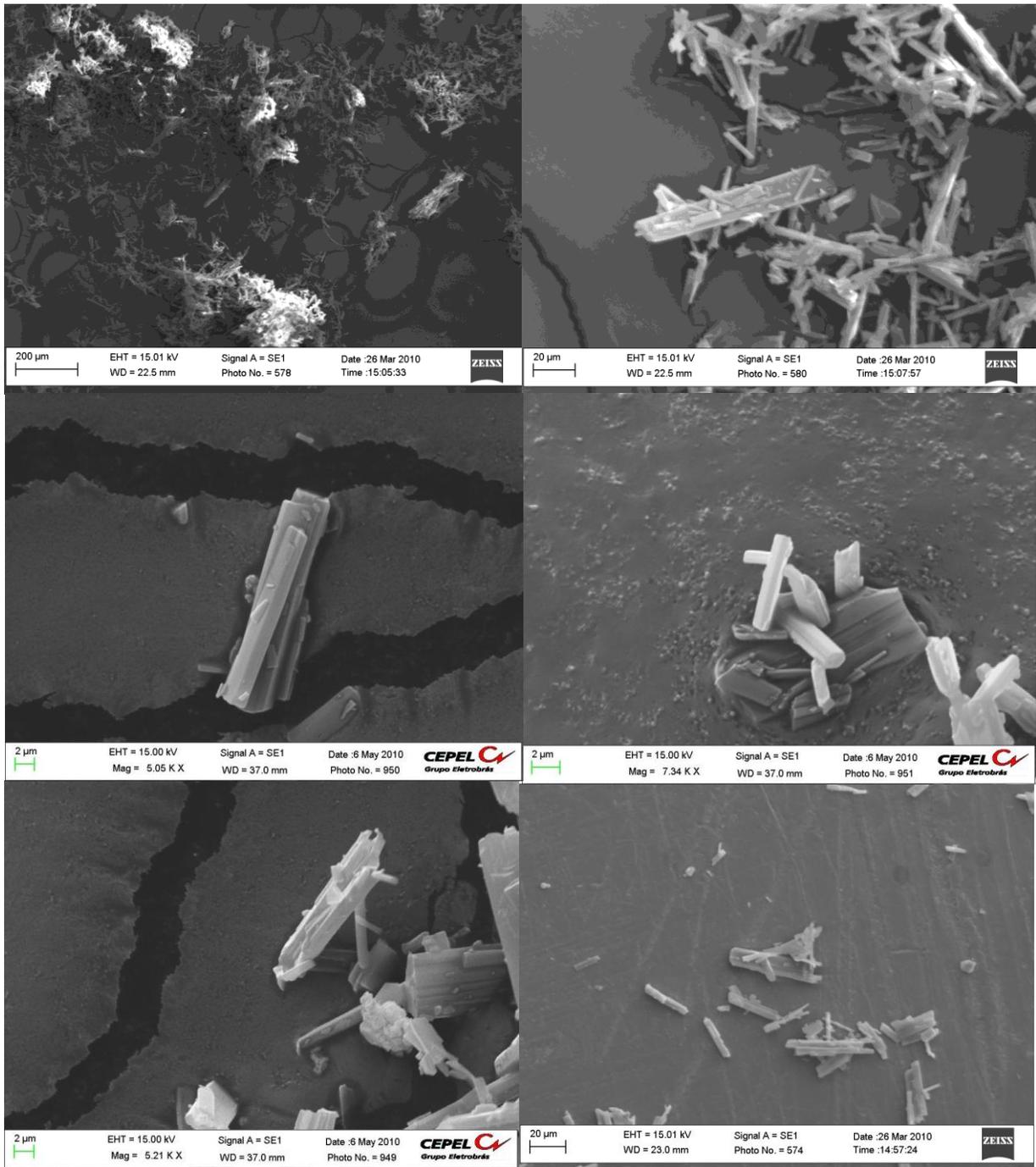


FIGURA 4.25 – Micrografias da Cefalexina Monoidratada. Magnificações entre 178 e 7340X.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFOS DE CEFALEXINA OBTIDOS EM LABORATÓRIO

Foram preparados cinco novos polimorfos da cefalexina, obtidos a partir da cefalexina padrão da Sigma Aldrich: Cefalexina recristalizada em metanol, cefalexina liofilizada, cefalexina anidra, cefalexina per-hidratada e cefalexina contaminante. Devido a pequena quantidade do polimorfo cefalexina contaminante, apenas o espectro de RMN de sólido foi utilizado na sua caracterização. Os resultados encontrados da análise dos novos polimorfos foram confrontados diretamente com resultados da cefalexina padrão da Sigma Aldrich.

4.2.2.1 Difractometria de raios X

Os difratogramas de raios X, obtidos para quatro polimorfos, estão mostrados na FIGURA 4.26. Todos os difratogramas foram obtidos nas mesmas condições para que comparações pudessem ser feitas de maneira mais adequada.

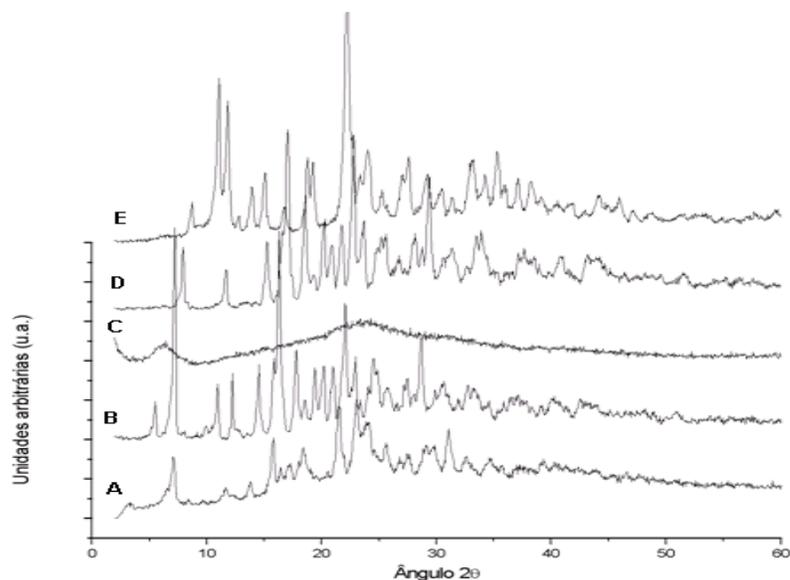


FIGURA 4.26 – Difratomogramas de raios X. (A) Cefalexina per-hidratada (B) cefalexina anidra (C) cefalexina liofilizada (D) cefalexina Padrão Sigma Aldrich (E) cefalexina recristalizada em metanol.

Com exceção da amostra submetida ao processo de liofilização (cefalexina liofilizada), todas as outras apresentaram cristalinidade, já que os difratogramas mostraram picos de difração no intervalo analisado ($2^\circ < 2\theta < 60^\circ$). A comparação do difratograma dos novos polimorfos com o da cefalexina padrão sigma Aldrich, sugere que de fato, houve alteração da estrutura cristalina inicial (cefalexina padrão Sigma Aldrich).

Na análise comparativa dos difratogramas de raios X observa-se que algumas regiões apresentaram alteração nas posições dos picos de difração, de acordo com o polimorfo, em relação ao difratograma da cefalexina padrão Sigma Aldrich. Foi observado que a região no intervalo de $5^\circ < 2\theta < 20^\circ$ foi a que apresentou as diferenças mais significativas entre os polimorfos, conforme mostra a FIGURA 4.27.

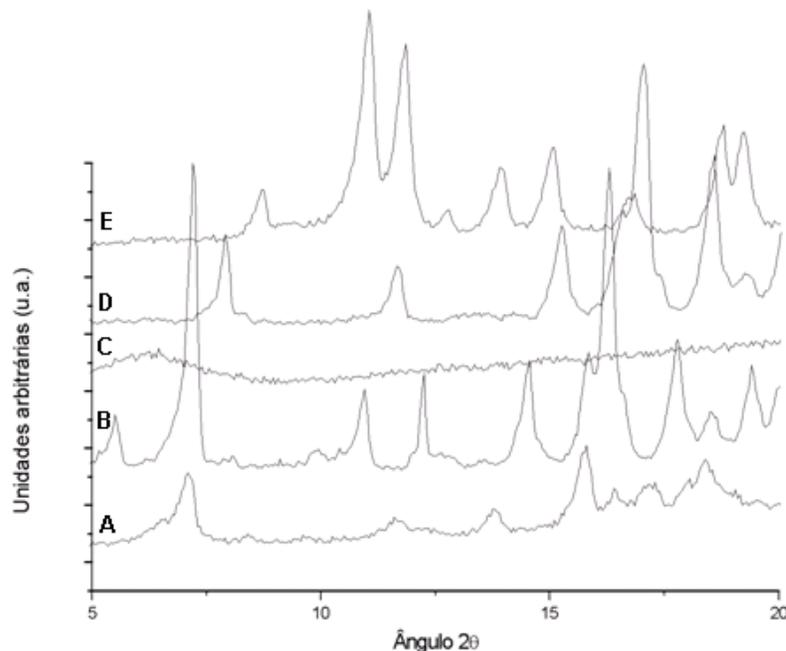


FIGURA 4.27 – Expansão dos Difratogramas de raios X dos polimorfos de cefalexina preparados em laboratório: (A) Cefalexina per-hidratada; (B) cefalexina anidra; (C) cefalexina liofilizada; (D) cefalexina Padrão Sigma Aldrich; (E) cefalexina recristalizada em metanol.

Não foram encontrados na literatura difratogramas semelhantes aos obtidos nesta dissertação para os polimorfos de cefalexina. STEPHENSON et al(1998) publicaram os difratogramas de raios X da cefalexina monoidratada e da cefalexina tratada com P_2O_5 . Os resultados apresentaram pequena diferença entre si. Comparativamente o difratograma que se assemelha, em parte, com o publicado por STEPHENSON e colaboradores (1998) é o da cefalexina anidra, sendo semelhante principalmente no intervalo $2\theta < 16^\circ$. OTSUKA et al (2006) publicaram difratogramas de raios X em que foram observadas diferenças nas intensidades dos picos de difração provocadas pelo processo de pulverização em moinho de bolas. Comparativamente os difratogramas assemelham-se aos obtidos por STEPHENSON et al (1998).

4.2.2.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica obtida para o polimorfo de cefalexina per-hidratada está mostrada na FIGURA 4.28. O processo de perda de massa inicia-se com a perda de 46,5% ($70^\circ C$), que é compatível com 16,8 moles de água. A curva TG mostra para a cefalexina per-hidratada mais duas perdas de massa consecutivas claramente delimitadas pela curva DTG de 8,6% ($190^\circ C$) e de 24,7% ($300^\circ C$), cujos fragmentos correspondentes não puderam ser elucidados. Há ainda uma quarta perda de 11,2%, não claramente definida na curva DTG.

Recristalizações lentas (condições termodinâmicas) em geral conduzem a polimorfos mais estáveis. No caso específico da cefalexina, a recristalização lenta em água produziu a cefalexina per-hidratada, que ao ser submetida a uma isoterma em $40^\circ C$ (FIGURA 4.29) mostrou um decaimento de 45% da sua massa inicial.

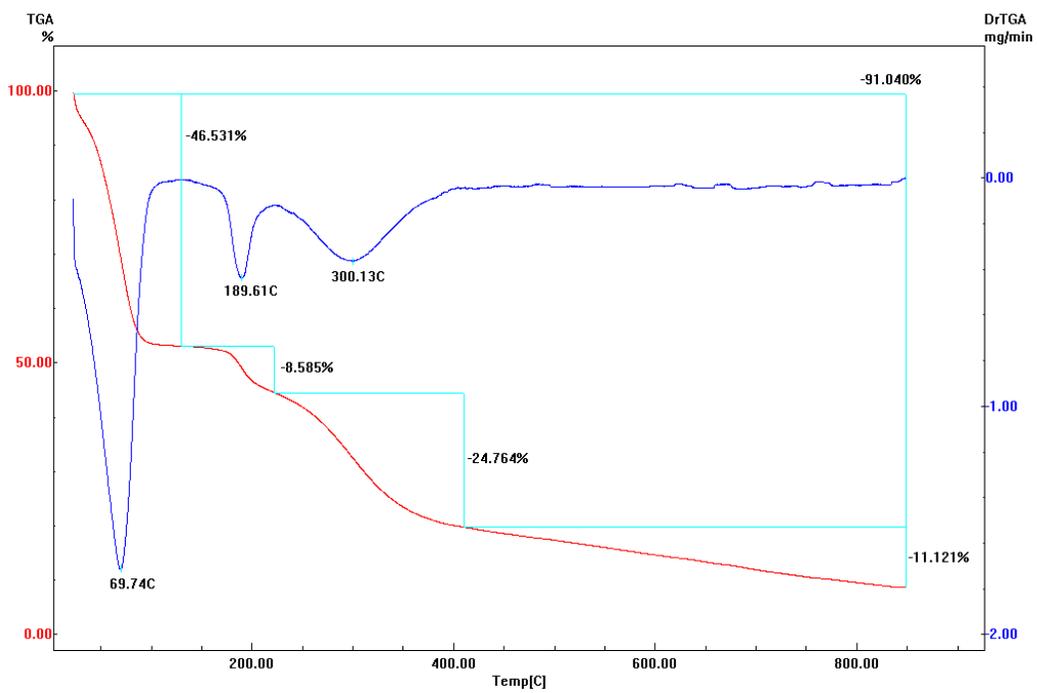


FIGURA 4.28 – Curva de termogravimetria para a cefalexina per-hidratada.

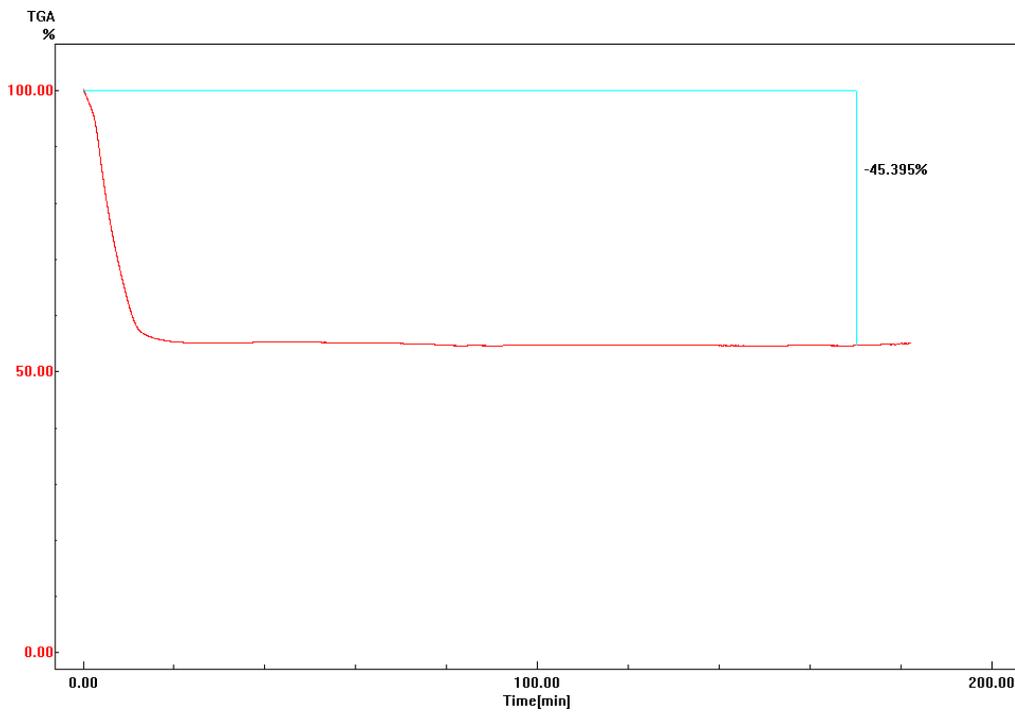


FIGURA 4.29 – Isotherma em 40°C da cefalexina per-hidratada.

Essa perda de massa corresponde a 16,0 moles de água no composto, ou seja, boa parte da água que a cefalexina per-hidratada perde na análise por termogravimetria parece estar fracamente ligada ao cristal estudado, porém essa ligação mesmo que fraca, conduz a um novo polimorfo de cefalexina, o que corrobora com os resultados de difratometria de raios X, nos quais os difratogramas da cefalexina padrão Sigma Aldrich e o difratograma da cefalexina per-hidratada revelaram-se bastante diferentes.

A análise termogravimétrica da cefalexina recristalizada em metanol está mostrada na FIGURA 4.30. Pode-se observar que a curva de DTG delimitou uma perda de 1,2% em 53°C e uma segunda perda de 1,7% em 74°C. Nessa mesma região a cefalexina padrão Sigma Aldrich apresentou uma única perda, correspondente a saída de água. Desta forma, as perdas observadas na faixa de temperatura até 100 °C podem ser devidas a perda de água e/ou metanol.

O novo polimorfo de cefalexina recristalizado em metanol poderia ser considerado como sendo a cefalexina monoidratada contendo metanol adsorvido na superfície do cristal. Entretanto essa afirmação é refutada rapidamente ao se analisar as perdas correspondentes às duas formas, listadas na TABELA 4.9. No caso do polimorfo de metanol a primeira e segunda perdas de massa devem ser comparadas com a primeira perda de massa da cefalexina padrão Sigma Aldrich. Isso se deve ao fato de que para a cefalexina recristalizada em metanol a etapa de eliminação do solvente deve ocorrer em duas subetapas, já que há dois solventes no sistema cristalino.

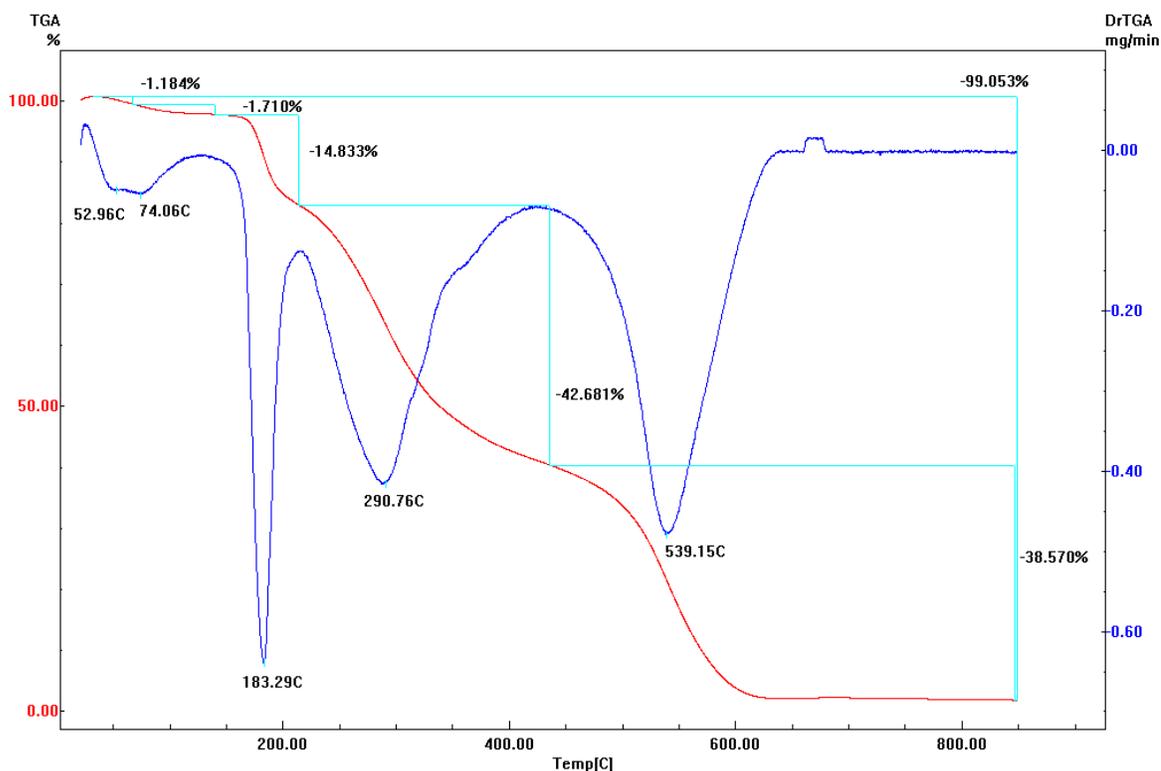


FIGURA 4.30 – Curva de termogravimetria para a cefalexina recristalizada em metanol.

Quando as etapas relativas a degradação dos dois fármacos são comparadas, nota-se para todos os eventos que a temperatura da cefalexina recristalizada em metanol foi menor quando comparado com a curva de termogravimetria da cefalexina padrão Sigma Aldrich, o que demonstra constituições cristalinas diferentes, tal como foi evidenciado na difratometria de raios X.

A análise termogravimétrica obtida para a cefalexina liofilizada está mostrada na FIGURA 4.31. O processo de liofilização, muito embora seja eficiente para a remoção de água de compostos em geral, mostrou-se ineficiente para retirada de água de cristalização da cefalexina padrão Aldrich. A curva de termogravimetria do polimorfo amorfo indica uma primeira perda de massa de 4,9% (57°C). Esta perda corresponde a eliminação de exatamente 1 mol de água da amostra, ou seja, a cefalexina liofilizada,

trata-se também de uma amostra monoidratada. As estabilidades térmicas das amostras de cefalexina liofilizada são diferentes das da cefalexina padrão Sigma Aldrich, muito embora as perdas de massa de ambas sejam semelhantes. Conclui-se, portanto, que o processo de liofilização alterou a cristalinidade da amostra.

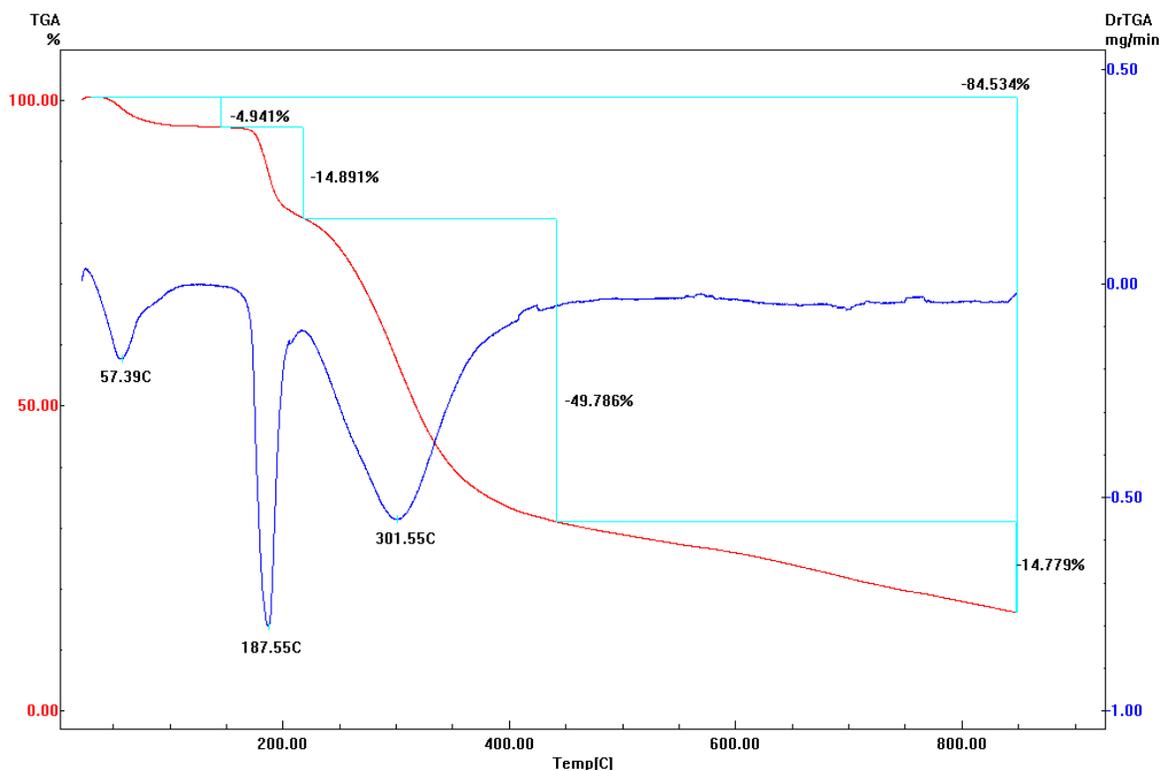


FIGURA 4.31 - Curva de termogravimetria da cefalexina liofilizada

A curva de termogravimetria da cefalexina anidra está mostrada na FIGURA 4.32. Há uma perda de massa de 2,9% (49°C), que é compatível com 0,6 mols de água, ou seja, o processo de secagem exaustiva na pistola de Abderhaldeen foi suficiente para remoção de 0,5 mols de água da cefalexina monoidratada. As perdas subseqüentes da cefalexina anidra são de 15,5% (192°C) e 69,3%(305°C).

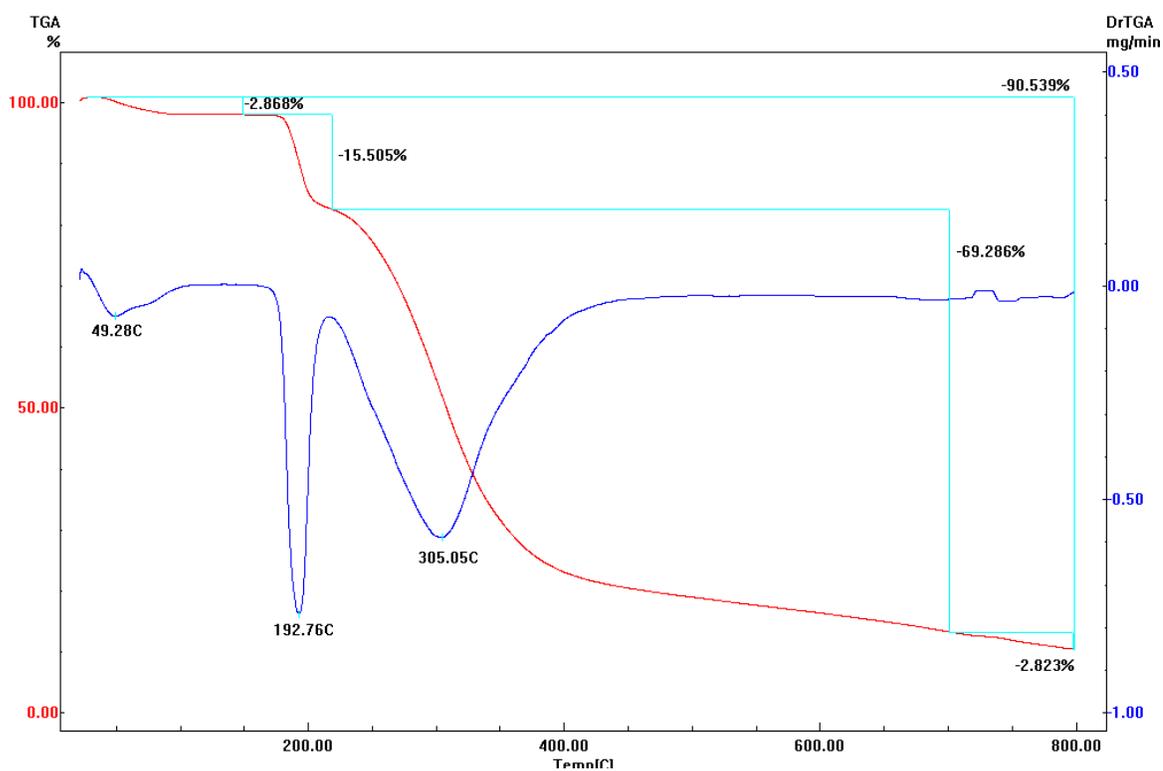


FIGURA 4.32 – Curva de termogravimetria da cefalexina anidra

Na TABELA 4.10 encontram-se sumarizados os resultados obtidos. A análise da Tabela evidencia que todas as amostras apresentaram estabilidades térmicas semelhantes.

TABELA 4.10 – Comparação entre as perdas de massa dos polimorfos de cefalexina

Polimorfo	1ª Perda de massa			2ª Perda de massa		3ª Perda de massa		4ª Perda de massa	
	T (°C)	Perda (%)	Mols de H ₂ O	T (°C)	Perda (%)	T (°C)	Perda (%)	T (°C)	Perda (%)
Cefalexina per-hidratada	69,7	46,5	16,8	189,6	8,6	300,1	24,8	n.d.	11,1
Cefalexina recristalizada em metanol	53,0	1,2	*	183,0	14,8	290,8	42,7	539,2	38,6
	74,1	1,7	*						
Cefalexina Anidra	49,3	2,9	0,6	192,8	15,5	305,1	69,3	n.d.	2,8
Cefalexina Liofilizada	57,4	4,9	1,0	187,6	14,9	301,6	49,8	n.d.	11,8
Cefalexina padrão Sigma Aldrich	64,3	5,5	1,1	193,1	14,7	293,0	43,2	548,4	35,3

(*) água e/ou metanol.

4.2.2.3 Calorimetria diferencial de varredura

A curva de calorimetria diferencial de varredura para a amostra de cefalexina per-hidratada está mostrada na FIGURA 4.33. Nesta análise observa-se um pico endotérmico em 78°C, ou seja, nesta temperatura o polimorfo de cefalexina per-hidratado sofre transformação em outro polimorfo. Comparando-se as curvas de TG e as curvas de DSC para o polimorfo de cefalexina per-hidratada, conclui-se que este logo após a saída dos 16,8 mols de água (em 69°C) apresenta nova conformação, sem que haja qualquer perda de grupos estruturais da estrutura da cefalexina em si.

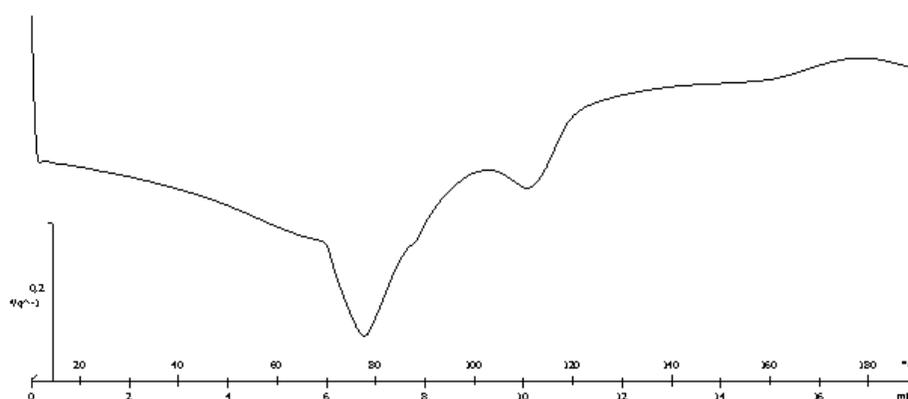


FIGURA 4.33 – Curva de calorimetria diferencial de varredura da cefalexina per-hidratada.

A análise por calorimetria diferencial de varredura da cefalexina recristalizada em metanol, mostrada na FIGURA 4.34, ocorreu com dois ciclos de aquecimento intercalados por um ciclo de resfriamento. Nessa análise foi detectado um pico endotérmico, em 131°C, que indica a transição entre polimorfos nessa temperatura. O fato do pico não ser reproduzível em um segundo ciclo de aquecimento, subsequente ao resfriamento da amostra, evidencia que a transição polimórfica presente é do tipo monotrópica, ou seja, irreversível. Na FIGURA 4.34, aparece em 183°C um pico que poderia ser confundido com um pico exotérmico para o DSC da amostra. Entretanto, essa idéia é facilmente refutada ao se comparar a curva TG (FIGURA 4.30), com a

curva de DSC (FIGURA 4.34), uma vez que o sinal em 183°C trata-se na verdade, do início da degradação com queima do composto.

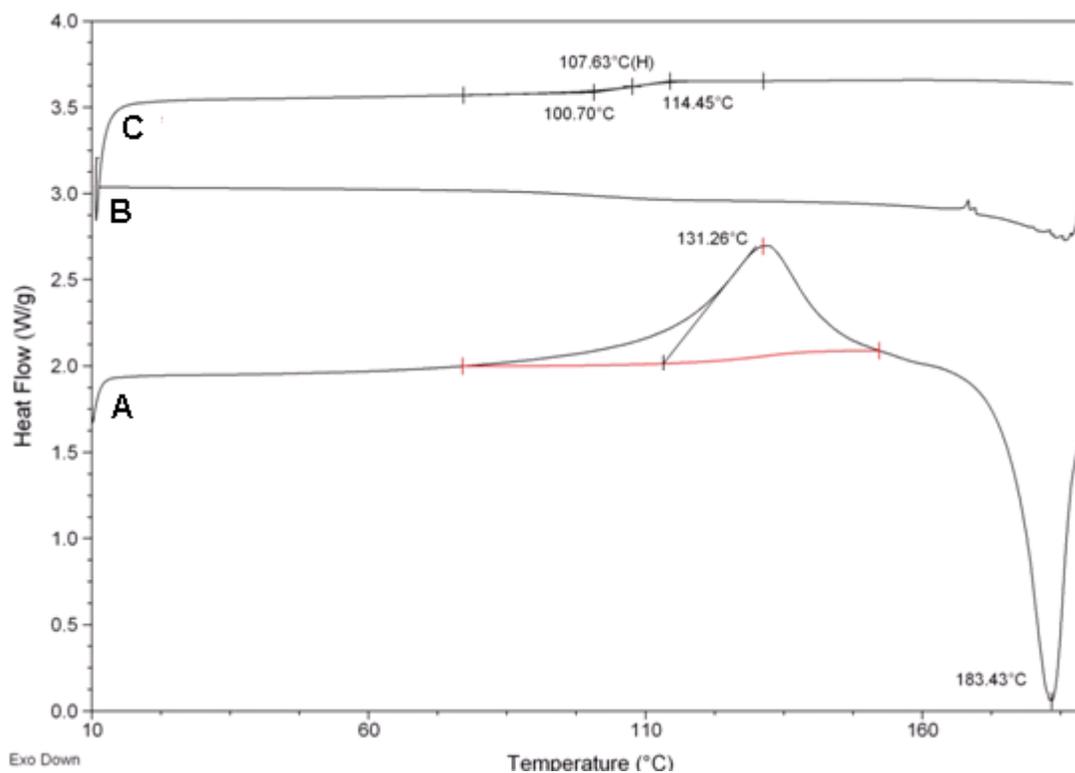


FIGURA 4.34 – Curva de calorimetria diferencial de varredura da cefalexina recristalizada em metanol (A)Primeiro ciclo de aquecimento; (B) resfriamento; (C) segundo ciclo de aquecimento.

4.2.2.4 Caracterização por ressonância magnética nuclear de sólidos

Todos os polimorfos produzidos nesta dissertação tiveram seus espectros de RMN de ^{13}C CPMAS adquiridos, os quais foram feitos sob as mesmas condições, para facilitar a comparação. Os resultados das análises estão mostrados na FIGURA 4.35.

Os resultados da RMN de ^{13}C CPMAS sugerem que todas as amostras mantiveram-se cristalinas com exceção da cefalexina liofilizada. O espectro dessa amostra apresenta

sinais demasiadamente alargados, o que é uma característica dos espectros de compostos amorfos. O alargamento dos sinais de RMN de ^{13}C CPMAS podem ser justificados pela ausência de sinais na difratometria de raios X, o que confirma com precisão a condição amorfa da cefalexina liofilizada.

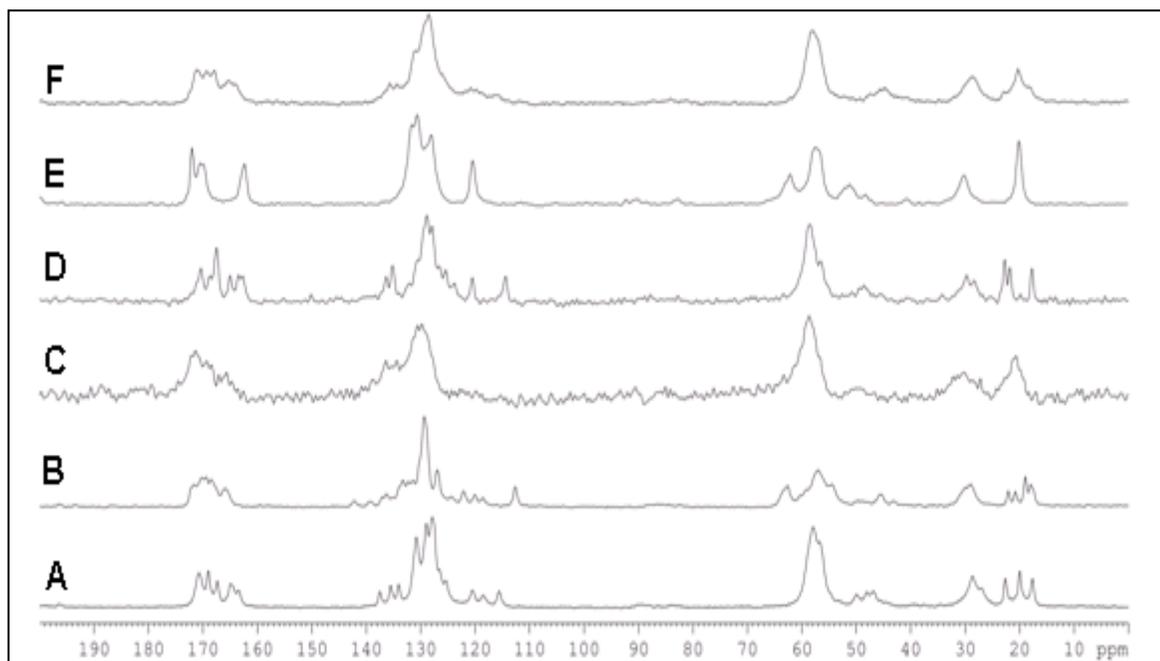


FIGURA 4.35 – Espectros de RMN CPMAS ^{13}C de raios X. (A) Cefalexina per-hidratada; (B) cefalexina anidra; (C) cefalexina liofilizada; (D) cefalexina Padrão Aldrich; (E) cefalexina recristalizada em metanol; (F) cefalexina contaminante.

Os espectros de RMN CPMAS de ^{13}C sugerem que os diferentes tratamentos da amostra de cefalexina Sigma Aldrich, de fato, conduziram a diferentes formas polimórficas, uma vez que os sinais relativos à cefalexina padrão Sigma Aldrich teve seu padrão alterado, sobretudo na região das metilas e das carbonilas. No caso do composto per-hidratado é fortemente sugerido que haja mais de um polimorfo na amostra analisada, e isso se deve principalmente ao fato dos sinais saírem desdobrados, como é o caso da metila em 18ppm, e das carbonilas próximas a 170ppm.

O desdobramento de sinais também ocorre na amostra de cefalexina anidra, a qual apresenta os sinais da metila quadruplicados. Para o metanolato de cefalexina foi observado apenas um sinal da metila (18 ppm) e também das carbonilas, que embora não estejam bem resolvidos não apresentam-se desdobrados. No caso da cefalexina rescrystalizada em metanol, muito embora haja apenas um polimorfo no sistema estudado, ele não é o termodinamicamente mais estável, uma vez que a calorimetria diferencial de varredura desta amostra apresenta um pico endotérmico em aproximadamente 127°C.

O quinto polimorfo encontrado e caracterizado por RMN de ^{13}C CPMAS, na verdade é um produto cuja presença foi também detectada na cefalexina padrão Sigma Aldrich, e que agora foi isolado. Este polimorfo é inédito na literatura.

4.2.3. MEDICAMENTOS DE CEFALEXINA

Foram realizadas análises de quatro formas farmacêuticas diferentes que contém a cefalexina como princípio ativo único: um pó para suspensão, uma suspensão já preparada, pó para manipulação e cápsulas. Para caracterizar comparativamente o sistema cristalino da cefalexina foram feitas análises de espectroscopia de infravermelho médio, ressonância magnética nuclear de ^{13}C de sólidos e difratometria de raios X. Os resultados foram comparados com os obtidos na cefalexina padrão Sigma Aldrich.

Inicialmente foram feitas análises de difratometria de raios X. Todos os difratogramas analisados (FIGURA 4.36) foram adquiridos exatamente nas mesmas condições que o difratograma do fármaco padrão Sigma Aldrich. Os resultados dos experimentos sugerem que o processo de extração, e posterior liofilização da suspensão pronta conduziram a um fármaco amorfo, já que o difratograma dessa amostra não produziu picos de difração no intervalo observado. A comparação dos medicamentos comerciais com o fármaco padrão Sigma Aldrich evidencia algumas diferenças nos difratogramas, principalmente na amostra pó para suspensão, a qual mostra claros sinais dos excipientes do medicamento ($33^\circ < 2\theta < 60^\circ$), além dos sinais do fármaco.

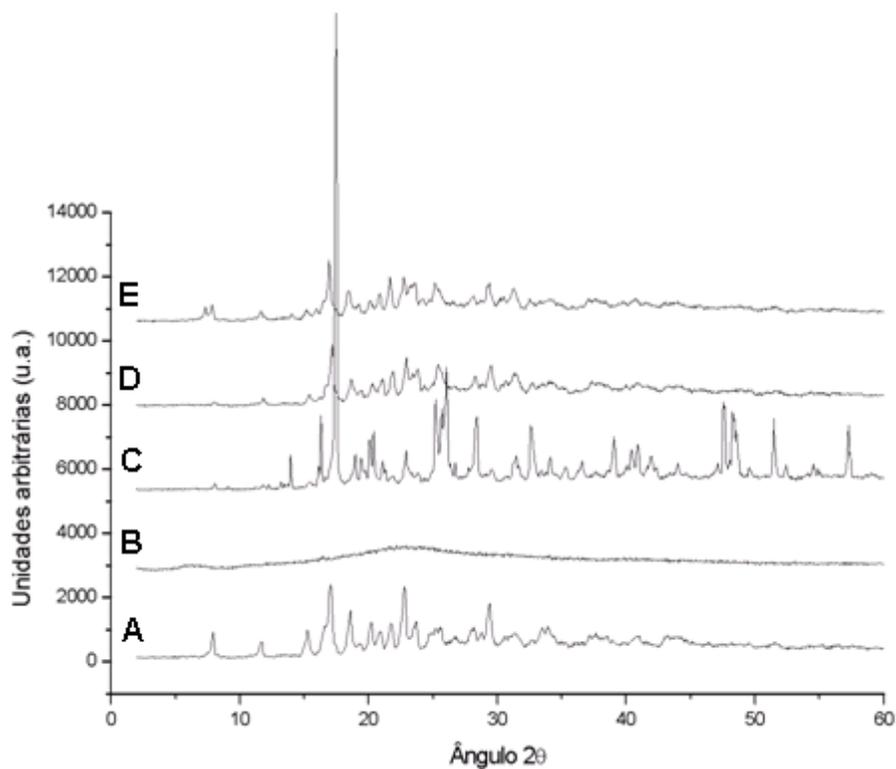


FIGURA 4.36 - Difratomogramas de raios X. (A) Cefalexina padrão Sigma Aldrich; (B) Suspensão pronta ;(C) Pó para suspensão; (D) Pó para Manipulação; (E) Cápsulas comerciais

Nos difratogramas do pó para manipulação e das cápsulas, não se observam sinais dos excipientes dos medicamentos. Entretanto estes difratogramas são ligeiramente diferentes do difratograma do fármaco padrão Sigma Aldrich, principalmente no intervalo $5^\circ < 2\theta < 20^\circ$. Desta forma, em uma observação mais criteriosa fica evidente que as diferenças observadas são provavelmente devido a diferentes graus de cristalinidade, já que os sinais $15^\circ < 2\theta$ na amostra padrão mostram-se com baixa intensidade, mas não ausentes, nas outras amostras. A FIGURA 4.37 evidencia uma expansão no intervalo $5^\circ < 2\theta < 20^\circ$. Desse modo, as análises de difração de raios X sugerem que os sistemas polimórficos do fármaco Aldrich são os mesmos das amostras comerciais de medicamentos, embora tenham apresentado diferenças de cristalinidade.

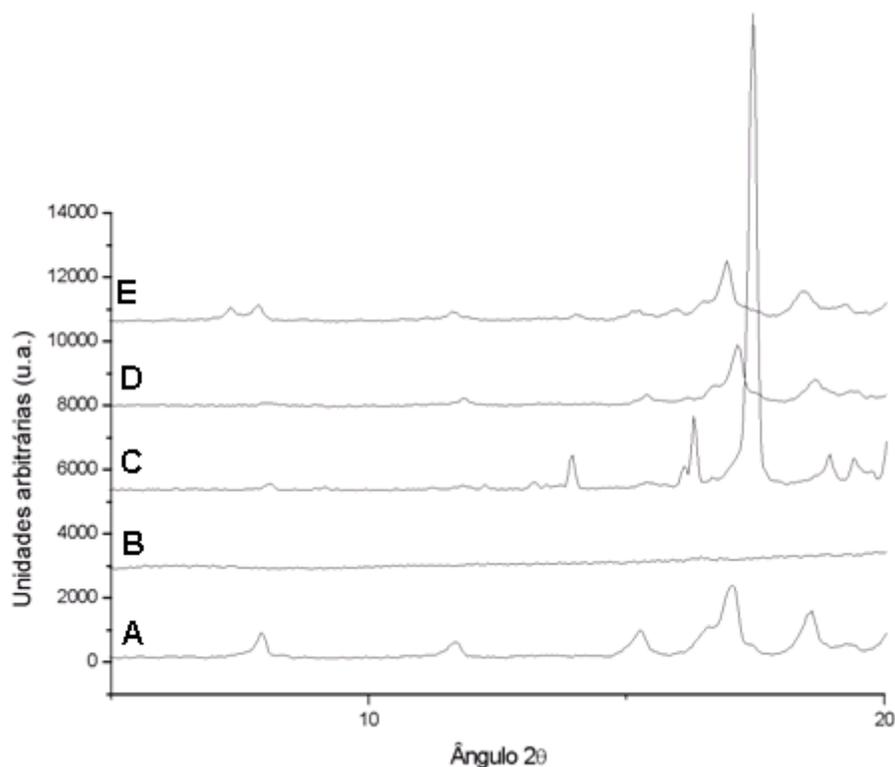


FIGURA 4.37 – Expansões dos Difrátogramas de raios X. (A) Cefalexina padrão Sigma Aldrich; (B). Suspensão pronta; (C) Pó para suspensão; (D) Pó para Manipulação; (E) Cápsulas comerciais

A análise de polimorfos por técnicas cristalográficas sabidamente é uma opção que envolve uma análise mais global do sistema que está sendo estudado. Dessa maneira, para sistemas polimórficos mais pontuais, ou seja, sistemas em que as diferenças entre os empacotamentos cristalinos sejam mais sutis, é necessário lançar mão de técnicas mais sensíveis a esse fenômeno, tal com técnicas espectroscópicas. Foram escolhidas a espectroscopia vibracional na região do infravermelho e a ressonância magnética nuclear de ^{13}C de amostras sólidas.

Os espectros vibracionais de infravermelho dos medicamentos comerciais e cefalexina padrão Sigma Aldrich estão mostradas na FIGURA 4.38. Não houve diferença entre os espectros de infravermelho do fármaco Sigma Aldrich e os dos medicamentos comerciais analisados, com exceção o espectro do pó para suspensão, o qual

apresentou-se diferente pela presença dos excipientes, muito embora vários sinais da amostra fossem preservados.

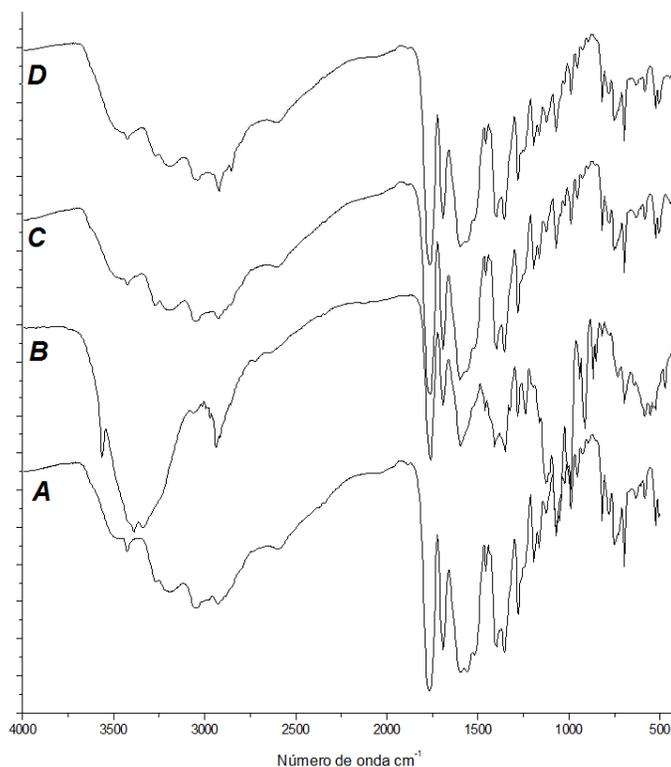


FIGURA 4.38 – Espectros de infravermelho. (A) Fármaco Aldrich; (B) Suspensão pronta; (C) Pó para manipulação; (D) Cápsulas.

Foram também obtidos os espectros de RMN CPMAS de ^{13}C , que estão mostrados na FIGURA 4.39. Para as amostras de medicamento pó para manipulação e cápsulas o espectro obtido foi bastante semelhante ao espectro do fármaco padrão Aldrich, ou seja, para estes medicamentos não foi observado nenhum sinal alheio aos sinais da cefalexina. Para o espectro da suspensão pronta os sinais correspondentes aos sinais dos excipientes foram bastante alargados quando comparados com o fármaco padrão Sigma Aldrich. Tal fato é congruente com as análises de difratometria de raios X, já que esta sugeriu que tratava-se de uma amostra amorfa. Vale a pena ressaltar que para esta amostra em especial, a ressonância magnética nuclear de sólidos é uma técnica

superior à difração de raios X na caracterização do estado cristalino, já que no caso da difração nenhum sinal foi observado, ou seja, mesmo para amostras amorfas a RMN de sólidos é capaz de fornecer informações a respeito da estrutura da amostra.

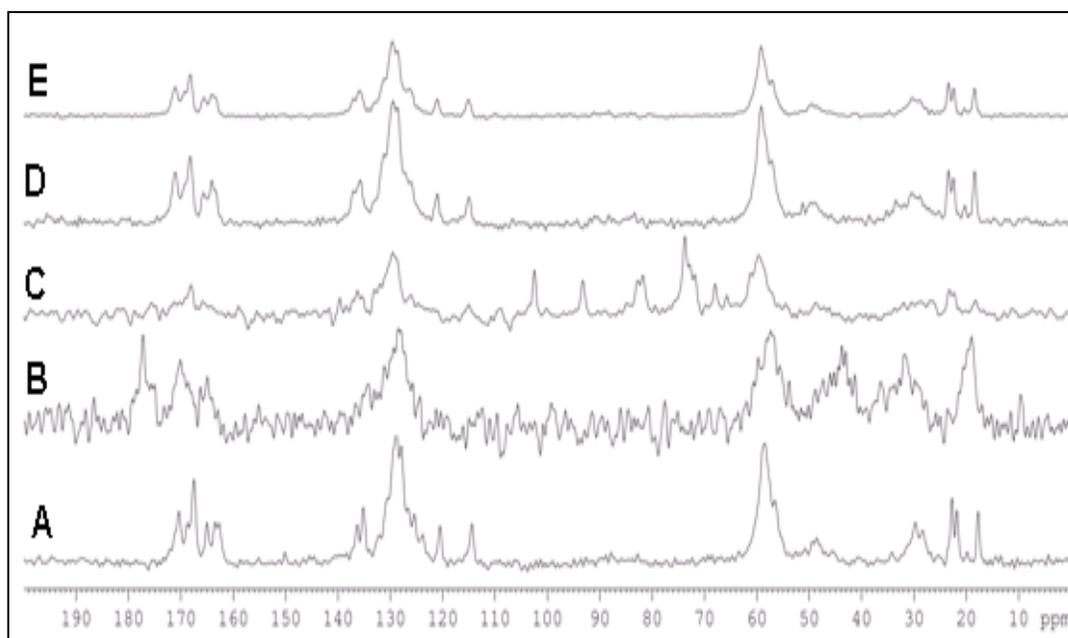


FIGURA 4.39 – RMN CPMAS de ^{13}C . (A) Fármaco Aldrich; (B) Suspensão pronta; (C)Pó para suspensão; (D) Cápsulas; (E) Pó para manipulação

O resultado do pó para suspensão apresentou sinais dos excipientes contidos no medicamento e sinais bastante claros da amostra, ou seja, por ressonância magnética nuclear de amostras sólidas é possível distinguir com clareza os sinais do fármaco e dos excipientes do medicamento analisado. Em relação ao estado cristalino dos fármacos dos medicamentos analisados, é possível concluir comparativamente que se tratam do mesmo sistema polimórfico tratado no fármaco padrão Sigma Aldrich, isso é particularmente evidente ao analisar os sinais triplicados das metilas e o perfil do sinal das carbonilas dos espectros, com deslocamentos químicos também idênticos, isso

sugere fortemente os núcleos que geram estes sinais possuem mesmo ambiente eletrônico. Deste modo a ressonância magnética nuclear de amostras sólidas corrobora com as análises selecionadas para caracterizar os estados cristalinos dos medicamentos comerciais analisados, além de se mostrar uma técnica superior já que evidencia claramente os sinais da amostra, frente aos sinais dos excipientes aliado ao fato de ser uma técnica capaz de tratar mesmo amostras amorfas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Foi preparada uma forma polimórfica inédita de cefadroxila (cefadroxila anidra), que foi caracterizada por diversas técnicas analíticas do estado sólido. Dentre as técnicas utilizadas a RMN de sólidos foi a principal ferramenta analítica do trabalho, já que norteou diferenças entre o novo polimorfo preparado e a forma monoidratada, descrita previamente na literatura. Factualmente o novo polimorfo de cefadroxila apresenta-se como uma nova estrutura de cristal, não relatada anteriormente, já que suas características diferem bastante das do fármaco monoidratado, sobretudo na difração de raios X e na RMN de sólidos. A RMN de ^{15}N CPMAS mostrou-se uma técnica equivalente ao espectro de RMN de ^{13}C CPMAS na caracterização da cefadroxila monoidratada.

As análises efetuadas de um medicamento contendo cefadroxila como princípio ativo evidenciaram que, em termos do sistema polimórfico presente, o polimorfo comercializado como fármaco é a cefadroxila monoidrato, similar ao padrão estudado nessa dissertação.

Foram preparadas quatro novas formas polimórficas inéditas de cefalexina (cefalexina anidra, cefalexina per-hidratada, cefalexina recristalizada em metanol e cefalexina contaminante) e a amostra liofilizada (amorfa), que foram caracterizadas por diversas técnicas de caracterização do estado sólido. Dentre as técnicas utilizadas a RMN de sólidos conseguiu distinguir diferenças entre os polimorfos produzidos. Os novos polimorfos produzidos, com exceção da cefalexina liofilizada, que é amorfa, apresentam estruturas cristalinas distintas entre si, e diferentes da estrutura do fármaco monoidratado. Este fato foi comprovado por RMN de sólidos e por difração de raios X.

Os resultados obtidos na caracterização de amostras de medicamentos evidenciou que a cefalexina monidratada comercial, presente nesses produtos não apresenta o mesmo sistema cristalino da cefalexina monoidratada comercializada pela empresa detentora da patente original.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, J.; ALLESO, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K.D.; RANTANEN (2009), J. Solid form screening--a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 23-37.
- AGUIAR, M.R.P.M. (1998) Estudo de derivados betalactâmicos por ressonancia magnética nuclear no estado sólido. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- AGUIAR, M.R.M.P.; GEMAL, A.L.; SAN GIL, R.A.S. (1999) Caracterização de polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado sólido. **Química Nova**, v. 22, p. 553-564.
- ANVISA (2005) Resolução RDC nº233 de 17 de agosto de 2005. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 07/01/2010
- ANVISA (2007) Registro de Medicamentos Similares. Resolução RDC – nº 17 de 02 de março de 2007. Disponível em < www.anvisa.gov.br >. Acesso em 07/01/2010
- ANVISA (2009) Lista de medicamentos de referência. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 07/01/2010.
- BASSO, A.; SPIZZO, P.; TONIUTTI, M.; EBERT, C.; LINDA, P.; GARDOSSE, L. (2006) Kinetically controlled synthesis of ampicillin and cephalexin in highly condensed systems in the absence of a liquid aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 105–111.
- BERNSTEIN, J. (2002) **Polymorphism in molecular crystal**. Clarendon press. Oxford
- BRITAIN, H. (2007) Fluorescence studies of the dehydration of cefadroxil monohydrate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, 2007.
- BRITAIN, H.G. (2005) Solid-State Fluorescence of the Trihydrate Phases of Ampicillin and Amoxicillin. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 6, n. 3, art. 55,
- BROWN, M.E. (2001) **Introduction to thermal analysis techniques and applications**. Kluwer Academic Publishers. 1-11
- CRISP, J.L.; DANN, S.E.; EDGAR, M.; BLATCHFORD, C.G. (2010) The effect of particle size on the dehydration/rehydration behaviour of lactose. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 391, p. 38-47, 2010.
- CULLITY, B.D (1959). Elements of x-ray diffraction. Addison-wesley publishing co.Inglaterra, CAP. 14, pg. 379-387. (Diffraction I: The directions of diffracted beams)

- DEPESTEL, D. D.; BENNINGER, M.S.; DANZIGER, L.; LAPLANTE, K.L.; MAY, C.; LUSKIN, A.; PICHICHERO, M.; HADLEY, J. A. (2008) Cephalosporin use in treatment of patients with penicillin allergies. **Journal of American Pharmacists Association**, v. 48, n. 4, jul/aug.
- DERDOUR, L; PACK, S.K.; SKLIAR; KIANG, L.S. (2011) Crystallization from solutions containing multiple conformers: A new modeling approach for solubility and supersaturation. **Chemical Engineering Science**, v.48, p 88-102.
- DI STEFANO, R; SCOPELLITI, M.; PELLERITO, C.; CASELLA, G.; FIORE, T.; STOCCO, G.C.; VITTURI, R.; COLOMBA, M.; RONCONI, L.; SCIACCA, I.D.; PELLERITO, L. (2004) Organometallic complexes with biological molecules. XVIII. Alkyltin(IV) cephalaxinate complexes: synthesis, solid state and solution phase investigations. **Journal of Inorganic Chemistry**, v.98, p.534-546.
- FULIAS, A.; VLASE, T.; VLASE, G.; DOCA, N. (2010) Thermal behaviour of cephalaxin in different mixtures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, p. 987–992.
- GHASSEMPOUR, A., RAFATI, H.; ADLNASAB, L.; BASHOUR, Y.; BRAHIMZADEH, H.; ERFAN, M. (2007) Investigation of the solid state properties of amoxicillin trihydrate and the effect of powder Ph. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, n. 4, art. 93.
- HAYASHI, S.; HAYAMIZU, K (1991) Chemical Shifts Standards in High resolution solid state NMR(2) ¹⁵N Nuclei . **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 64, p. 688-690.
- HILFIKER, R. (2006) **Polymorphism: in The Pharmaceutical Industry**, Wiley-vch Verlag GmbH & Co: Weinheim. 433p.
- HOLLAS, M.J. (2004) **Modern spectroscopy**. 4^oEd. New Jersey: John Wiley & Sons In. 483p.
- KALINKOVA, G.N.; DIMITROVA, L. (1994) Infrared spectroscopic studies of the antibiotic cefamandole nafate. **Vibrational Spectroscopy**, v. 10, p. 41-47.
- KAWAKAMI, K.; IDA, Y.; YAMAGUCHI, T. (2005) Effect of Salt Type on Hygroscopicity of a New Cephalosporin S-3578. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 8.
- KENNEDY, A.R.; Okoth, M.O.; Sheen, D.B.; Sherwood, J.N.; Teat, S.J.; Vrcelj, R.M. (2003) Cephalaxin: A channel hydrate. **Acta Crystallographica**, v. 59, p. 650-652.
- KITTEL, C. (2005) **Introduction to solid state physics**. 8^o Ed. John Wiley & Sons. Cap 1. Pag.9-11 (Crystal Structure)

- KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S.; YAMAMOTO, K. (2000) Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dehydrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 137–146.
- KOLEVA, B.B.; KOLEV, T.M.; SPITELLER, M. (2008) Determination of cephalosporins in solid binary mixtures by polarized IR- and Raman spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.48, p. 201-204.
- KUMAR, I.; PRATT, R.F. (2005) Transpeptidation Reactions of a Specific Substrate Catalyzed by the Streptomyces R61 DD-Peptidase: Characterization of a Chromogenic Substrate and Acyl Acceptor Design. **Biochemistry**, v.44, p. 9971-9979.
- LEHTO, V.P; LAINE, E. (1998) Assessment of physical stability of different forms of cefadroxil at high humidities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 49–62.
- LOZANO, M.J.; BOMIS, J. (1987) Antibiotic as Ligand. Coordinating behavior of the Cephalexin Towards Zn(II) and Cd(II) Ions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 31, p. 187-195.
- LYSZCZEK, R.M. (2004) Thermal investigations of cefadroxil complexes with transition metals Coupled TG-DSC and TG-FTIR techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 78, p. 473–486.
- MAHER, A.; CROKER, D.; RASMUSON, A.C.; HODNETT, B.K. (2010) Solubility of Form III Piracetam in a Range of Solvents. **J. Chem. Eng.** V.55, p. 5314-5318.
- NANGIA, A (2008). Conformational polymorphism in organic crystals. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, p. 595-604.
- NAPOLITANO, H.B.; CAMARGO, A.J.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C.; ELLENA, J.; CUNHA, S. (2005). Caracterização de fármacos polimórficos. **Estudos**, v. 32, p. 2021-2046.
- NÉMET, Z.; SAJÓ, I.; DEMETER, A. (2010) Rietveld refinement in the routine quantitative analysis of famotidine polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.51, p. 572–576.
- NGUYEN, T.N.P.; KIM, K.J. (2010) Transformation of Monohydrate into Anhydrous Form of Risedronate Monosodium in Methanol-Water Mixture. **Ind. Eng. Chem.** v. 49. p. 4842–4849.
- OTSUKA, M.; FUKUI, Y.; KIM, K.O.H.-J.; OZAKI, Y. (2006) Determination of cefalexin crystallinity and investigation of formation of its amorphous solid of chemoinformetrical near infrared spectroscopy. **Journal Near Infrared Spectroscopy**, v.14, p. 9-16.

- OTSUKA, M.; KANENIWA, N. (1982) Solubility of cephalexin crystals. **Pharmaceutical Society of Japan**, v.102, p. 967-971.
- PARK, H.J.; KIM, M.S.; KIM, J.S.; CHO, W.; PARK, J.; CHA, K.H.; KANG, Y.S.; HWANG, S.J. (2010) Solid-State Carbon NMR Characterization and Investigation of Intrinsic Dissolution Behavior of Fluconazole Polymorphs, Anhydrate Forms I and II. **Chem. Pharm. Bull.** v. 58, n. 9, p. 1243-1247.
- PASCHAL, J. W.; DORMAN, D. E. (1978) Nuclear magnetic resonance. Carbon-13 and Nitrogen-15. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 2013-2016.
- PATRICK, G. L. (1995); **An Introduction to medicinal chemistry**. 1^a Ed., Oxford University Press: Oxford, 181-188
- PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. (2007) Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p.491-502.
- ROETS, E.E.; HOOGMARTENS, J.H.; VANDERHAEGHE, H.J. (1981) Identification of cephalosporins I. Spectroscopic methods. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 64, n. 1, p. 166-172.
- SAIFEE, M. ;INAMDAR, N.; DHAMECHA, D.L.; RATHI,A.A. (2009) Drug polymorphism: a review. **International Journal of Health Research**, v. 2, p. 291-306.
- SEETHARAMAN, J.; RAJAM, S.S.; SRINIVASAN, R. (1993) Crystal structure of cefadroxil. **Journal of Crystallographic and Spectroscopic Researchn**, v. 23, n. 3, p. 235-238.
- SHETE, G.; PURI, V.; KUMAR, L.; BANSAL, A.K. (2010) Solid State Characterization of Commercial Crystalline and Amorphous Atorvastatin Calcium Samples. **AAPS PharmSciTech**. v. 11. n. 2.
- SHIN, W. e CHO, S.W (1992). Structure of cefadroxil monohydrate. **Acta Crystallographica- serie C**, v. 48, p. 1454-1456.
- SHINDE, A.J.; WAGHULE, A.N; PAITHANE, M.B.; MORE, H.N. (2010) Formulation and in vitro evaluation of sustained release floating tablet of cephalexin using hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, 58-65.
- SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. (2005) **Spectrometric Identification of organic compounds**. 7^oEd. New Jersey: Jonh Wiley & Sons Inc., 550p.
- SOUZA, K.C.D. (2005) *Preparação e caracterização de estruturas polimórficas da tolbutamida e nifedipina*. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade

Federal Fluminense- Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

- STEPHENSON, G.A.; GROLEAU, E.G.; KLEEMANN, R.L.; XU, W.; RIGSBEE, D.R. (1998) Formation of isomorphic desolvates: creating a molecular vacuum. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 5, p. 536-542,.
- TORI, K; NISHIKAWA, J.; TAKEUCHI, Y. (1981)¹³C NMR spectra of cephalosporins1. Signal Assignments of free acids and esters. **Tetrahedron letters**, v 22, n. 29, p. 2793-2796.
- TRIPATHI, R.; BIRADAR, S.V.; MISHRA, B.; PARADKAR, A.R. (2010) Study of Polymorphs of Progesterone by Novel Melt Sonocrystallization Technique: A Technical Note. **AAPS PharmSciTech**. v. 11. n. 3. p. 1493-1498.
- VIPPAGUNTA, S.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. (2000) Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 3-26.
- YU, L; REUTZEL, S.; STEPHENSON, G. (1998) Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.1, p.118-127.
- YU, L. (2001) Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 27-42.
- YU, L.X.; FURNESS, M.S.; RAW, A.; OUTLAW, K.P.W.; NASHED, N.E.; RAMOS,E.; MILLER, S.P.F.; ADAMS, R.C.; FANG,F.; PATEL, R.M.; HOLCOMBE, F.O.; CHIU, Y-Y.; HUSSAIN, A.S. (2003) Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 4, 531-536.
- ZABINSKI, J.; MACIEJWSKA, D.; WOLSKA, I. (2010) Solid state structural analysis of new pentamidine analogs designed as chemotherapeutics that target DNA by X-ray diffraction and ¹³C, ¹⁵N CP/MAS NMR methods. **Journal of Molecular Structure**. v. 984, p. 68-74.

CAPÍTULO 7. ANEXOS

----- Mensagem encaminhada -----

De: editor@ijppsjournal.com
Para: rsangil@iq.ufrj.br
Enviadas: Segunda-feira, 4 de Abril de 2011 3:22:04
Assunto: Provisional Acceptance IPPS 23-69/2011

Dear Sir,

We are happy to inform our authors that IPPS is now indexed in Scopus, Elsevier, EBSCO, Google Scholar and Directory of Open Access Journal (DOAJ), Index Copernicus, ICAAP, Scientific commons, PSOAR, Open-J-Gate in very short span. Journal has made its presence amongst International community with great impact ICV- 4.34

Our team sincerely conveys kind regards to authors and editorial members.

Your manuscript IPPS 23-69/2011 has been recommended for publication after review.

For publication, all the authors are required to register, Registration Charges (US\$ 30.00 per author). You are requested to inform regarding your acceptance for registration within 3-4 days.

For revision of your article see the following points

- Few errors in spellings are there, check and correct.
- Few references are out of format. See Instructions to Authors.
- Cite at least two articles from IPPS related to your research articles.

Editor Comments-

Recommended for publication but require minor revision. For formatting detail visit (www.ijppsjournal.com).

In future, please make all the correspondence to editor@ijppsjournal.com

Please find Copy Right Form at our website www.ijppsjournal.com in Home section at end of the page. Submit it through email along with your corrected manuscript.

You can transfer the required amount (US\$ 270.00 (including US\$ 20.0 for bank charges)) online to

Note: Take care of charges of your local bank

Name- AVIJEET JAIN
Bank- HDFC, SAGAR, MP, INDIA
A/c No- 04491000049294
SWIFT code- HDFCINBB
IFSC code-HDFC0000449
MICR code-470240002
Branch code-000449
(Please inform us if you make online transfer through email/phone)

Alternatively

Payment can also be made through Western Union Money Transfer in favour of Avijeet Jain

With Best Regards

Dr. Avijeet Jain (M No- 09165136558)

Associate Editor

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

mail2web.com - Microsoft® Exchange solutions from a leading provider -
<http://link.mail2web.com/BusinessExchange>

--

Profa. Rosane Aguiar da Silva San Gil
Laboratorio Multissuario de RMN de Sólidos Profa. Adeline Costa Neto
Instituto de Química da UFRJ
Ed. CT, bloco A, s.605 Ilha do Fundão
CEP21941-972 Rio de Janeiro Brasil

**EVALUATION OF POLYMORPHS IN CEPHALEXIN MEDICINES BY ^{13}C SOLID
STATE NMR**

**DANIEL L.M. DE AGUIAR¹, ROSANE A.S. SAN GIL^{1*}, LEANDRO B. BORRE¹,
MONICA R.C. MARQUES², ANDRE L. GEMAL¹**

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Laboratório de RMN de Sólidos,
Av. Athos da Silveira Ramos 149, bl.A, s.605, Ilha do Fundão, CEP 21941-909 RJ, Brazil

² Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, Brazil

email: rsangil@iq.ufrj.br

ABSTRACT

In this study the presence of cephalexin polymorphs in four commercial medicines was evaluated. The samples were analyzed using X-ray powder diffraction (XRPD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and solid state ^{13}C NMR spectroscopy (CPMAS NMR). The crystalline pattern obtained by XRPD analyses for two medicines are very similar to the cephalexin monohydrate reference sample. FTIR was not capable to distinguish between the medicine samples, although one was showed to be amorphous by XRPD. In contrast, ^{13}C solid state NMR evidenced the differences between the samples studied and confirmed that in those medicines the cephalexin monohydrate is the polymorph present in higher amount.

Keywords: cephalexin, ^{13}C CPMAS NMR, XRD, FTIR, polymorphs

INTRODUCTION

The oral absorption of a drug depends on physicochemical and physiological factors such as drug solubility, lipophilicity, dissolution rate, formulation, food composition and gastric emptying time.^{1, 2, 3} Delivery of drugs by using oral ingestion is a common route of drug delivery due to the ease of administration, patient compliance and flexibility in formulation.⁴ The major impact of solid state physicochemical properties of drugs on their medicines properties is that they may not have the same bioavailability.⁵ One of the possible causes of the difference in the bioavailability of medicines is the polymorphism of pharmaceuticals or excipients.⁶ Polymorphism is the ability of a named substance to form two or more crystalline states, in this way polymorphs are different crystalline forms that possessing the same chemical structure.⁷ Polymorphism includes all the solid forms of the same molecule that have the same vapor, liquid or solution phase, i.e., amorphous pharmaceuticals and solvates were also included in this definition.⁸

The key of polymorphic research are recrystallization techniques, and different crystallization methods can lead to different polymorphic systems with distinct solubilities.^{9, 10} In this field of research a number of techniques has been used to characterize the polymorphism in pharmaceuticals: X-ray powder diffraction (XRPD)^{11,12}, thermal analysis¹³, and spectroscopic techniques as Raman and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR)^{14,15} are some examples. Solid state NMR has also experienced a welcome breakthrough in polymorphism study since the early 1990s with the pioneer work of Christopher et al.¹⁶ It constitutes a complementary technique to X-ray diffraction for solid structure studies and holds especially for the pharmaceutical compounds which are amorphous, and therefore not amenable to X-ray diffraction.

Beta-lactam antibiotics form a bulky family of zwitterionic drugs that are potent inhibitors of bacterial wall biosynthesis, which account for approximately 60% of commercial antibiotics formulations.¹⁷ The inhibition of that reaction leads the bacteria to death.¹⁸ The optimal efficiency

of beta-lactam antibiotics are related with serum concentrations above the minimum inhibitor concentration (MIC) of at least 50 or 60% of the dosing interval. In this manner, spread variations of serum concentration are by far unwelcome,¹⁹ and the study of the factors that could affect the efficiency of beta-lactam based antibiotics are of importance to public health.

Cephalexin, 7-(D-2-amino-2-phenylacetamido)-3-methyl-3-cephem-4-carboxylic acid (structure given in Figure 1) is one of the most used first generation cephalosporin based antibiotics to treat infections due to its broad antibacterial activity. Its crystalline structure was published by Kennedy et al.²⁰ Distinct formulations can be found commercially and are available to public. However no information is available related to the polymorph present in those medicines. This work aims to investigate the nature of the cephalexin polymorph present in four distinct medicines by using XRPD, infrared spectroscopy and ¹³C solid state NMR, and was compared with that on the reference cephalexin monohydrate sample. To our knowledge solid state NMR data for cephalexin monohydrate and some of its medicines have not been previously published.

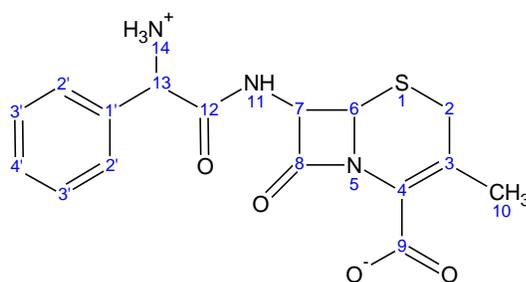


Fig 1. Chemical structure of cephalexin

MATERIALS AND METHODS

Samples:

Cephalexin monohydrate (PSA) was purchased from Sigma Aldrich Inc; the suspension sample (CSM) was purchased from local markets; the capsule (CCC) and the powder for oral suspension (CSH) samples were kindly donated by the Brazilian Public Health System (SUS); the raw powder (PMD) sample, was provided by Pharmantiga (Linhares, Brazil), purchased from DEG (India). The samples were used as received, except the suspension sample CSM, that was centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes. Then the supernatant was removed and 125 mL of H₂O were added. The washing and centrifugation processes were repeated for three times, followed by liofilization.

Characterization Methods:

X-ray powder diffraction (XRPD)

X-ray powder diffraction patterns were obtained using a Rigaku MiniFlex powder diffraction system. The X-ray source was nickel-filtered K- α emission of copper (1.54056 Å), operating at 30 kV and 15 mA, and employing a scanning step of 0.05°/s in 2 θ range from 2° to 60°.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Fourier Transform Infrared spectra (FTIR) were recorded in the range 4000-400 cm⁻¹ on a ABB Inc. FTIR system model FTLA 2000-100 (Quebec, Canada), with resolution of 4 cm⁻¹, scanning from 4,000 to 400 cm⁻¹ at room temperature. The samples were crushed by mixing with potassium bromide (1%) and pressed to disks under conditions to avoid the waffle hydration.

¹H and ¹³C{¹H} solution state nuclear magnetic resonance

¹H and ¹³C{¹H} were obtained to evaluate the presence of impurities in the samples studied. The spectra were acquired on a Bruker Avance DPX-200 NMR spectrometer (4.7T), operating at 200MHz (¹H) and 50MHz (¹³C) resp. The samples (5 mg) were dissolved in deuterium oxide (0.6 mL); dioxane was added for referencing the ¹³C spectra. The $\pi/6$ pulse length was 12 μ s (¹H) and 11 μ s (¹³C), the recycle delay was 2s and 4s for ¹H and ¹³C respectively and the spectra were transformed after accumulation of 256 (¹H) and 512 (¹³C)

scans. Residual H₂O signal (4.74 ppm) and dioxane (67.4 ppm) were used as internal chemical shift references for ¹H and ¹³C spectra, resp.

¹³C Solid state nuclear magnetic resonance (¹³C CPMAS NMR)

¹³C solid state NMR spectra were recorded using a Bruker Avance DRX-300 NMR spectrometer (7.05T), operating at 75.46 MHz. A CPMAS 4mm probehead was used to spun ZrO₂ rotors at 6 KHz. Cross polarization magic angle spinning combined with high power proton decoupling was used as pulse sequence (CPMAS). The contact time was optimized to 2000 μs. The recycle delay was 4s, and π/2 pulse length was 5 μs. The spectra was transformed after accumulation of 512 scans. The line broadening used to process the data was 20Hz. Hexamethylbenzene (CH₃ at 17.3ppm) was used as external chemical shift reference.

RESULTS AND DISCUSSION

X-ray powder diffraction (XRPD) analyses

Figure 2 shows XRPD patterns obtained for cephalixin medicines CCC (capsules), PMD (powder for suspension), CSM (lyophilized sample) and CSH (raw powder) and for the cephalixin reference sample (PSA). All the samples, except the lyophilized (CSM) showed well defined diffraction peaks, comparable with those observed in the XRPD of the cephalixin monohydrate, with intense diffraction peaks at 2θ 17° and 22.5°. The results suggest that the polymorph in medicine samples presents the same crystalline structure, but distinct to those indicated by Stephenson²¹ and Otsuka.²² In the other side, the XRPD obtained for a lyophilized sample (CSM) showed no diffraction peaks, evidencing the amorphous structure of this material. The XRPD obtained for the oral suspension sample (CSH) showed a great number of diffraction peaks in the range 35° < 2θ < 60°, absent in the reference sample, that can be assigned as corresponding to excipients.

No extra peaks between 2° < 2θ < 35° (with exception of CSH) were observed for CCC and PMD, evidencing the purity of the solid form present in these medicines. However in the case of CSH medicine the XRPD was not able to clearly distinguish between the peaks of the active

phase and the excipients in the range $2^\circ < 2\theta < 35^\circ$. Also in the case of the amorphous drug, XRPD was not able to provide any information about the structure present.

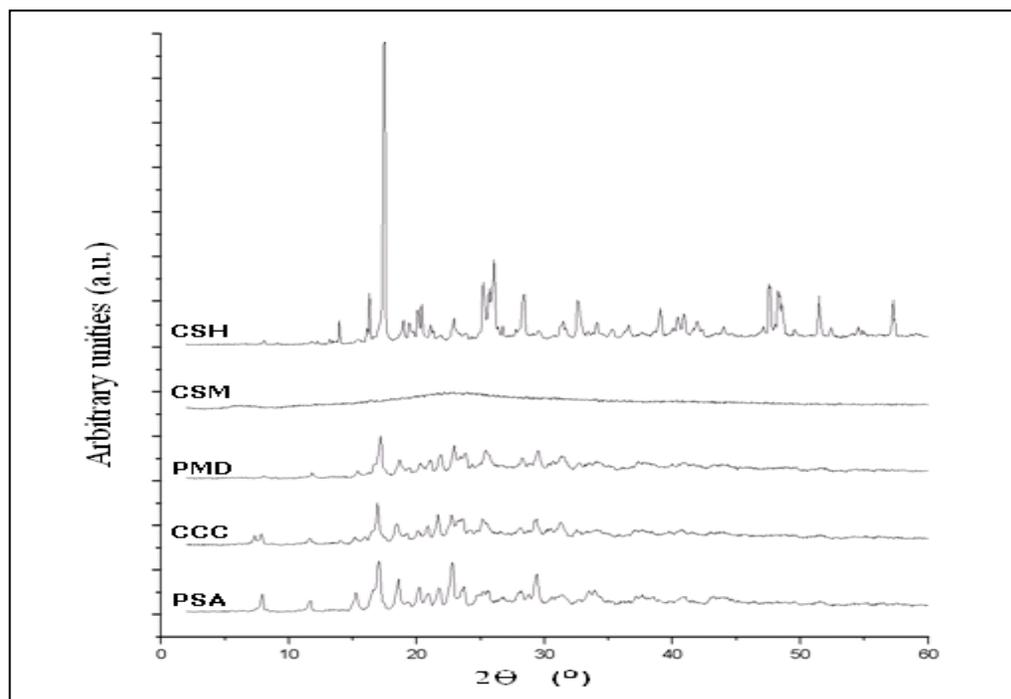


Fig 2. Comparative X-ray powder diffraction data obtained for cephalixin based medicines: PSA (reference), CCC (capsules), PMD (powder for suspension), CSM (lyophilized sample) and CSH (raw powder)

Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR)

The FTIR spectra are shown in Figure 3. The spectrum obtained for cephalixin monohydrate reference sample (PSA) shows major bands at 3425 cm^{-1} , 3190 cm^{-1} , 2610 cm^{-1} , 1767 cm^{-1} , 1689 cm^{-1} and 1593 cm^{-1} (Table 1), similar to that reported by Di Stefano et al.²³ When compared with the standard cephalixin monohydrate (PSA), CCC, PMD and CSM had the same FTIR profile although CSM was amorphous following XRPD.

The broad band at $\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ due to stretching mode of NH_3^+ is present in all medicines, confirming the presence of Zwitterionic form. The principal differences in the spectra were observed in the region $3500\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$. CSH showed an intense band at 2980 cm^{-1} , and a well

defined band at 3550 cm^{-1} , corresponding to the C-H stretching and isolated O-H stretching modes resp., due to excipients (for example carboxymethyl cellulose and sucrose). No differences could be found when comparing the FTIR spectra in the region below 1800 cm^{-1} . FTIR data is in accordance with the XRPD, i.e. both techniques indicate the same polymorphic system in those medicines.

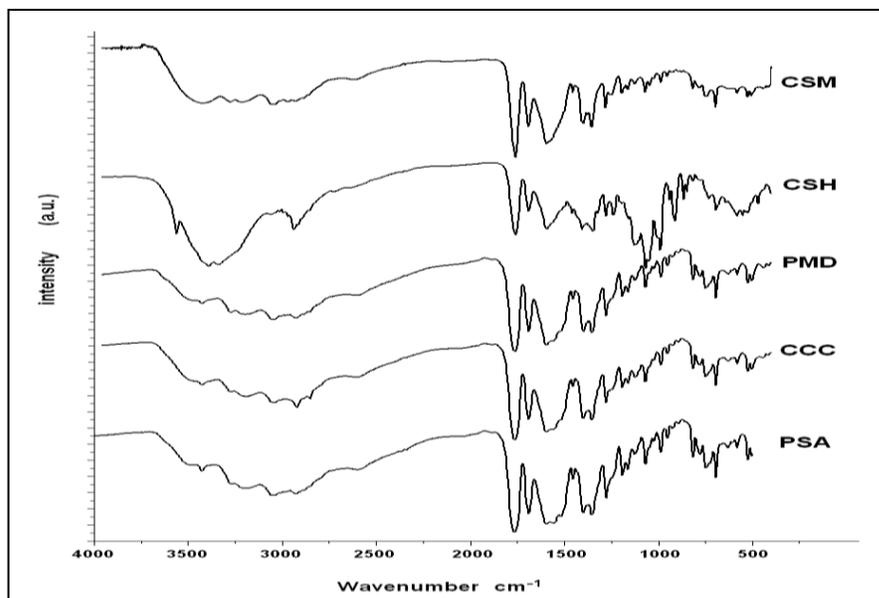


Fig 3. Fourier transform infrared spectra of PSA, CCC, PMD, CSH and CSM cephalixin samples

Table 1. Absorption frequencies observed for cephalixin monohydrate and cephalixin medicines

Absorption freq. cm^{-1}	Absorption mode	Absorption freq. cm^{-1}	Absorption mode
3425	$\nu_{\text{O-H}}$	1689	$\nu_{\text{C=O}}$ (amide I) + $\nu_{\text{C-N}}$
3190	$\nu_{\text{N-H}}$ (amide)	1593	ν_{COO} (asym)
2610	$\nu_{\text{NH}_3^+}$	1519	$\delta_{\text{N-H}}$ (amide II)
1766	$\nu_{\text{C=O}}$ (β -Lactam)	1396	ν_{COO} (sim)

^1H and ^{13}C solution state nuclear magnetic resonance

Solution state ^1H NMR spectra (Figure 4) were carried out to monitoring the components present in the studied medicines. No extra peaks were observed in CCC and PMD spectra, compared with reference sample (PSA). However for CSM and CSH several peaks assigned as excipient signals were observed. In the case of CSH, the 2a proton signal (3.0 ppm) is overlapped by excipient peaks, but this did not affect the identification of cephalaxin, since the hydrogens are diatereoisotopic. No chemical shift displacement was observed for the cephalaxin protons comparing the medicines's spectra, thus indicating the absence of intermolecular interaction with the excipients. By integrating the signals at 5.4 ppm (O-CH-O from carbohydrate moiety) and at 5.7 ppm (CH from cephalaxin molecule) it was possible to calculate the concentration of cephalaxin, as been 17.4 mol% in CSH medicine. The solution state NMR of CSM also shows low intensity signals at around 2.2 ppm and 1.0 ppm that could be assigned as from excipients. A summary of ^1H NMR data is showed in Table 2.

The solution state ^{13}C NMR spectrum was obtained only for reference sample PSA (Figure 5), and was carried out in order to obtain reliable assignment of ^{13}C NMR resonances, compared with literature data.²⁴

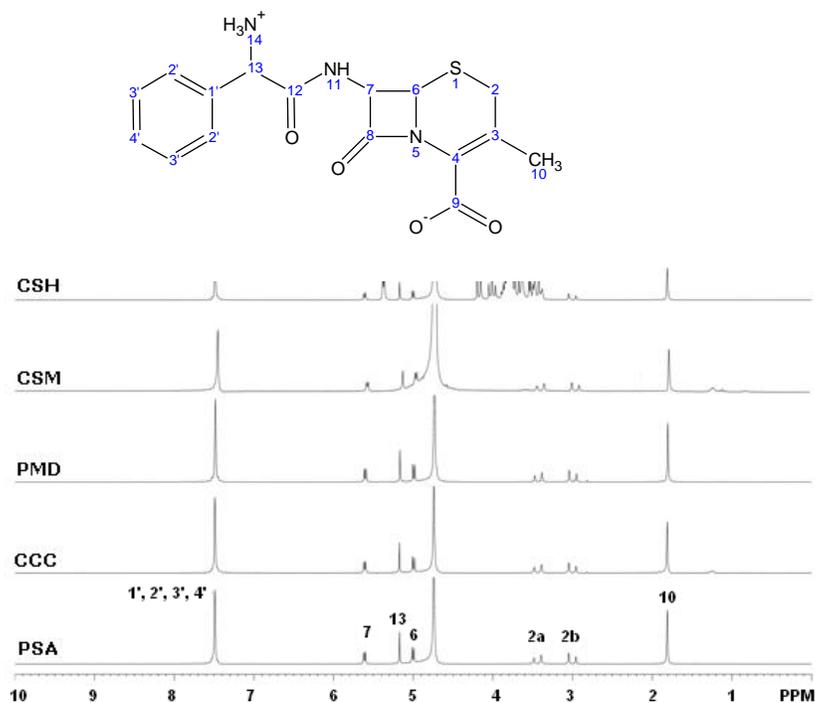
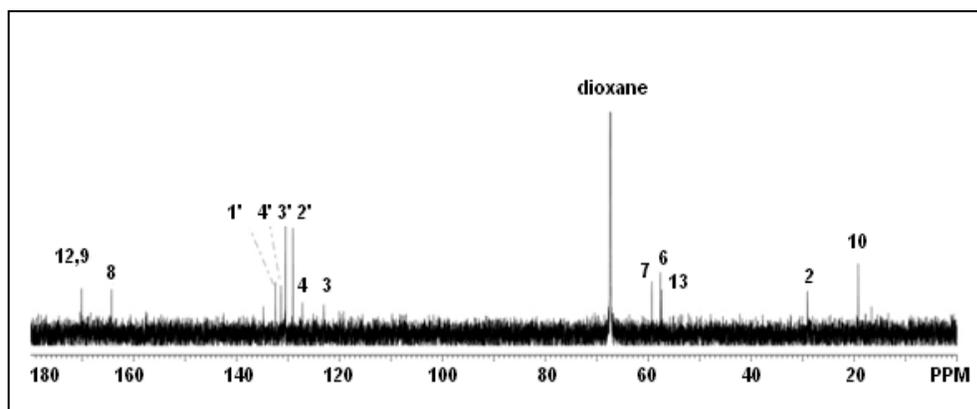


Fig 4. ^1H NMR spectra (D_2O) obtained for PSA, CCC, PMD, CSM and CSH.

Table 2. ¹H chemical shifts observed for cephalixin monohydrate and medicines

Hydrogen	δ (ppm)			
	PSA	CCC	CSM	CSH
2a	3.0(d)	3.0(d)	3.0(d)	3.0(d)
2b	3.4(d)	3.4(d)	3.4(d)	3.4(d)
6	5.0(d)	5.0(d)	5.0(d)	5.0(d)
7	5.6(d)	5.6(d)	5.6(d)	5.6(d)
10	1.8 (s)	1.8 (s)	1.8 (s)	1.8 (s)
13	5.17(s)	5.17(s)	5.17(s)	5.17(s)
1'	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)
2'	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)
3'	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)
4'	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)	7.49(s)
O-CH-O*	-	-	-	5.37
CH ₃ /CH ₂ *	-	1.25	0.8; 1.25	-
CH ₂ O/CHO*	-	-	-	3.4 - 4.2

*From excipients

**Fig 5. Solution state (D₂O+dioxane) ¹³C NMR spectrum of cephalixin monohydrate.**

Solid State ¹³C NMR Spectroscopy

The ¹³C CPMAS spectrum obtained for reference sample (Figure 6, entry PSA) was assigned on the basis of liquid state one, following the same sequence of chemical shifts. Surprisingly some resonances were not consistent with the solution data, and show ¹³C signals splitted, due the occupation of non-crystallographically equivalent positions.²⁵ That finding confirmed the

existence of distinct cephalexin molecules in the unitary cell of cephalexin monohydrate, as suggested by Kennedy et al.²⁰ Some signals can be readily assigned, but there are some ambiguities, for example in the aromatic and carbonyl region, which are too complex for any assignments to be made with confidence. It was possible to see three split methyl carbons (δ 17.8, 21.8 and 22.8 ppm), indicating that in this sample at least three distinct cephalexin molecules are present in higher amounts, besides a fourth methyl carbon in low intensity at δ 19.9 ppm, detected both in reference sample and in CCC and PMD medicines, but absent in CSH sample (Figure 6).

CCC and PMD spectra are very similar to the reference sample, and the resonances at 136 and 137 ppm showed to be slightly more resolved in PSA than in CCC and PMD spectra. In contrast with the crystalline medicines, whose linewidths were typically 40 to 70 Hz, in the amorphous medicine CSM spectrum it was possible to detect a number of resonances, but the linewidths are of the order of hundreds Hz. This difference is attributed to the existence of a great number of molecular conformations and or intermolecular interactions in the amorphous material, which give rise to a spread of chemical shifts for each signal, as stated in the literature.^{26,27,28} In contrast with the XRPD, ¹³C MAS spectrum provides molecular structure information for amorphous medicine sample. The resonances corresponding to cephalexin in the CSH spectrum showed low intensity compared with those of the excipients, thus the commercial medicine used to prepare the suspensions possess greater amount of excipient, compared with the other medicines studied. In the other side, the signals in the range 16 to 23 ppm can be clearly seen, confirming the presence of cephalexin monohydrate. The chemical shifts and assignments proposed to cephalexin monohydrate in solution and in the solid state, and for the medicines CSH and CSM are given in Table 3. From the results it is concluded that in the studied medicines the cephalexin monohydrate is the polymorph present in higher amount.

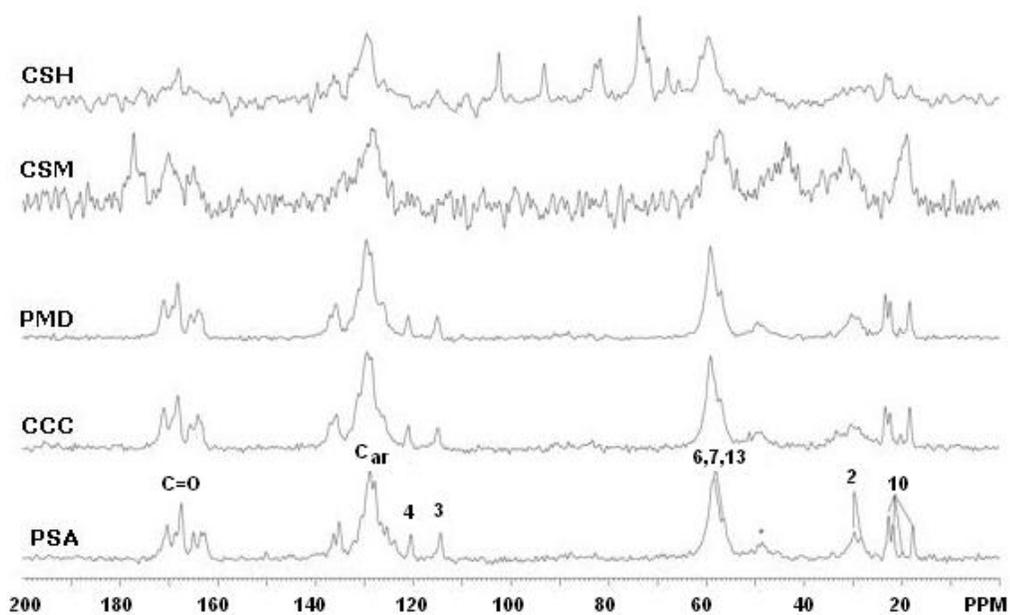
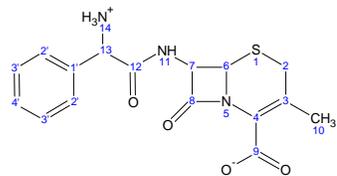


Fig 6. Solid state ^{13}C CPMAS NMR spectra of cephalexin samples.

Table 3. Solution and solid state ¹³C NMR assignments of cephalixin monohydrate

Carbon	δ (ppm)			
	PSA		CSH	CSM
	Solution ^a	Solid		
2	29	28.4 / 29.8	28.3/29.7	31.9
3	123	114.4	115	absent
4	127.2	120.5	absent	absent
6	57.6	56.6 / 58.5	59.6/61.3	57.5
7	59.4	56.6 / 58.5	59.6/61.3	57.5
8	164.2	162.75/163.5/165.0	168.1	165.1
9	170.1	167.5 / 168.8 / 170.4 / 172.0	168.1	170.4
10	19.2	17.8 / 19.9 / 21.8 / 22.8	18.1/22.4/23.3	19.4
12	170.1	167.5 / 168.8 / 170.4 / 172.0	168.1	170.4
13	57.4	56.6 / 58.5	59.6/61.3	57.5
1'	132.4	123.9 - 136.37	129/136	128.6
2'	129	123.9 - 136.37	129/136	128.6
3'	130.5	123.9 - 136.37	129/136	128.6
4'	131.4	123.9 - 136.37	129/136	128.6
O-CH-O ^b	-	-	93.2/102.7	-
CH ₃ /CH ₂ ^b	-	-	-	43.4
CH ₂ - O/CHO ^b	-	-	65.5/68.3/72.5/73.3/73.9/81.7/82.8	-
C=O	-	-	-	177.8

^aD₂O + Dioxane^bExcipients chemical shift

CONCLUSION

In conclusion by a combination of powder XRPD measurements, FTIR and solid state NMR we have identified the presence of cephalixin monohydrate and excipients in some of the medicines studied. Solid state NMR showed to be a powerful tool in investigation of medicines, mostly in the cases where its amorphous nature precludes the evaluation by XRPD techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank S. Caldarelli (Université Paul Cézanne, France) for helpful discussions. D.L.M. Aguiar thanks CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas, Brazil) for scholarship.

References

1. Chu KA, Yalkowsky SH. An interesting relationship between drug absorption and melting point. *Int J Pharm* 2009; 373(1-2):24-40
2. Wagh MP, Patel J. Biopharmaceutical classification system: Scientific basis for biowaiver extensions. *Int J Pharmacy Pharm Sci* 2010; 2(3): 12-19
3. Patel J, Aneja K, Tiwari R. A review on bioavailability and bioequivalence trials and its necessity. *Int J Pharmacy Pharm Sci* 2010; 2(3):1-8
4. Shinde AJ, Waghule AN, Paithane MJ, More HN. Formulation and in vitro evaluation of sustained release floating tablet of cephalexin using hydrophilic polymers. *Int J Pharmacy Pharm Sci* 2010; 2(2):58-65
5. Paluch KJ, Tajber L, McCabe T, O'Brien JE, Corrigan OI, Healy AM. Preparation and solid state characterization of chlorothiazide sodium intermolecular self-assembly suprastructure. *Eur J Pharm Sci* 2010; 41(5):603-611
6. Kobayashi Y, Ito S, Itai S, Yamamoto K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dehydrate. *Int J Pharm* 2000; 193(2):137-146
7. Seife M, Inamdar N, Dhamecha DL, Rathi AA. Drug Polymorphism: A Review. *International Journal of Health Research* 2009; 2(4):291-306
8. Yu L, Reutzel SM, Stephenson GA. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1998; 1(3):118-127
9. Vippagunta SR, Brittain HG, Grant DJW. Crystalline Solids. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 48(1):3-26
10. Bauer J, Spanton S, Henry R, Quick J, Dziki W, Porter W, Morris J. Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism. *Pharm Res* 2001; 18(6):859-866

11. Shete G, Puri V, Kumar L, Bansal AK. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous artovastatin calcium samples. *AAPS Pharm Sci Tech* 2011; 11(2):598-609
12. Némét Z, Sajó I, Demeter A. Rietveld Refinement in routine quantitative analysis of famotidine polymorphs. *Pharm Biom Anal* 2010; 51(3):572-576
13. Nguyen TNP, KIM KJ. Transformation of monohydrate into anhydrous form of risedronate monosodium in methanol-water mixture. *Ind Eng Chem* 2010; 49(10):4842-4849
14. Tripathi R, Biradar SV, Mishra B, Paradkar AR. Study of polymorphs of progesterone by novel melt sonocrystallization technique: A technical note. *AAPS Pharm Sci Tech* 2010; 11(3):1493-1498
15. Brittain HG. Solid state fluorescence of Trihydrate phases of ampicillin and amoxicillin. *AAPS Pharm Sci Tech* 2005; 6(3):444-448
16. Christopher EA, Harris RK, Fletton RA. Assignment of solid-state ^{13}C resonances for polymorphs of cortisone acetate using shielding tensor components. *Solid State NMR* 1992; 1(2):93-101
17. Lima APCS, Gallini NR, Toledo MI, Lopes LC. Utilização de um sistema de gerenciamento de benefícios farmacêuticos (PBM) para a caracterização do perfil de prescrição e aquisição de antibióticos. *Braz J Pharm Sci* 2008; 44(2):215-223
18. Kumar I, Pratt RF. Transpeptidation Reactions of a Specific Substrate Catalyzed by the *Streptomyces* R61 DD-Peptidase: Characterization of a Chromogenic Substrate and Acyl Acceptor Design. *Biochemistry* 2005; 44(30):9971-9979
19. Cars O. Efficacy of Beta-lactam Antibiotics Integration of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 27(1-2):29-33
20. Kennedy AR, Okoth MO, Sheen DB, Sherwood JN, Teat SJ, Vrcelj RM. Cephalexin: a chanel hydrate. *Acta Cryst* 2003; C59(11):o650-o652
21. Stephenson GA, Grolean EG, Kleemann RR, Xu W, Rigsbu DR. Formation of isomorphic desolvates. Creating a molecular vacuum. *J Pharm Sci* 1998; 87(5):536-542

22. Otsuka M, Fukui Y, Otsuka K, Kim HJ, Ozaki Y. Determination of cephalexin crystallinity and investigation of formation of its amorphous solid by chemoinformetrical near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc* 2006; 14(9):9-16
23. Di Stefano R, Scopelliti M, Pellerito C, Casella G, Fiore T, Stocco GC, Vitturi R, Colomba M, Ronconi L, Sciacca ID, Pellerito L. Organometallic complexes with biological molecules. XVIII. Alkyltin (IV) cephalaxinate complexes: synthesis, solid state and solution phase investigations. *J Inorg Biochem* 2004; 98(3):534-46
24. Tori K, Nishikawa J, Takeuchi Y. ^{13}C spectra of cephalosporins. Signal assignments of free acids and esters. *Tetrahedron Lett* 1981; 22(29):2793-2796
25. San Gil RAS, Albuquerque MG, Alencastro RB, Pinto AC, Gomes FES, Dantas TNC, Maciel MAM. Solid state NMR and molecular modeling studies on Croton cajucara bent. *J Mol Struct* 2008; 885(1-3):82-88
26. VanderHart DL, Earl WL, Garroway AN. Resolution in ^{13}C NMR of organic solids using high-power proton decoupling and magic-angle sample spinning. *J Magn Reson* 1981; 44(2):361-401
27. Harris RK. NMR studies of organic polymorphs & solvates. *Analyst* 2006; 131(3): 351-373
28. Mousavi M, Yu SSF, Tzou DLM. A ^{13}C solid-state NMR analysis of vitamin D compounds. *Solid State NMR* 2009; 36(1):24-31