

## Relación de Estabilidad Termodinámica Relativa entre Polimorfos de Glibenclamida

Maria Silvia RODRÍGUEZ <sup>1,2</sup>, Julio LUNA <sup>1</sup>, Adriana CARLUCCI <sup>2</sup> & Carlos BREGNI <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> CERIDE-SECEGRIN, Güemes 3450, Santa Fé

<sup>2</sup> Departamento de Tecnología Farmacéutica Facultad de Farmacia y Bioquímica,  
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

**RESUMEN.** Se estudió el polimorfismo de la glibenclamida, caracterizándose cuatro formas cristalinas anhidras identificadas como: monoclinica centrada en la base (polimorfo IV), monoclinica simple (polimorfo III), ortorrómbica (polimorfo II) y triclínica simple (polimorfo I). Las formas IV y II se obtuvieron por recristalización en solventes orgánicos mientras que las formas I y III se encontraron en lotes comerciales. La caracterización se realizó por espectroscopía de difracción por rayos X, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía de absorción infrarroja, estudios de disolución, microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica. Se estudiaron las relaciones termodinámicas entre polimorfos y se aplicaron a los resultados experimentales del sistema de la Glibenclamida. El calor, la entropía y la temperatura de transición fueron calculados a partir de los datos de fusión determinados por DSC. Este informe representa la primera parte de una serie de estudios destinados a resolver dos problemas esenciales del polimorfismo (a) confirmar su existencia y (b) determinar la relación de estabilidad termodinámica relativa entre polimorfos (monotropía o enantiotropía).

**SUMMARY.** "Relative Thermodynamic Stability Relationship between Glybenclamide Polymorphs". Four anhydrous crystalline forms for glybenclamide were found when its polymorphism was studied: based center monoclinic (polymorph IV), simple monoclinic (polymorph III), orthorhombic (polymorph II) and simple triclinic (polymorph I). Forms number IV and II were obtained by recrystallization in organic solvents whilst I and III forms were found in commercial batches. Characterization was carried out by X-ray powder diffraction spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), IR absorption spectroscopy, dissolution assessments, scanning electron microscopy (SEM) and optical microscopy. Thermodynamics relationships between polymorphs were studied and they were later applied to experimental results of glybenclamide system. Heat, entropy and transition temperature were calculated from melting data obtained by DSC. This work represents the first part of a number of studies addressed to clarify two problems involved with polymorphism a) to confirm the existence and b) to determine the relationship of the relative thermodynamic stability between polymorphs (monotropy or enantiotropy).

### INTRODUCCION

Numerosas investigaciones demostraron que la mayoría de las sustancias sólidas de interés farmacéutico exhiben polimorfismo, que es la capacidad que tienen los compuestos de cristalizar en distintos reordenamientos internos de las moléculas dentro del cristal. Debido a las diferentes formas de empaquetamiento molecular, los polimorfos de un mismo compuesto puro tienen distintas propiedades físicas (solubilidad, punto de fusión, etc.), lo cual cambia el com-

portamiento de la droga. Las diferencias también involucran propiedades espectroscópicas, cinéticas, termodinámicas, mecánicas y algunas propiedades superficiales. Por lo tanto, para prevenir consecuencias inesperadas como la administración de dosis muy altas, dosis terapéuticamente ineficaces o cambios en la velocidad de disolución y/o de absorción, cuando se trabaja con drogas polimórficas se debe conocer su polimorfismo. Los sólidos farmacéuticos también pueden exhibir formas amorfas, las que de-

**PALABRAS CLAVE:** Glibenclamida, Polimorfismo, Termodinámica.

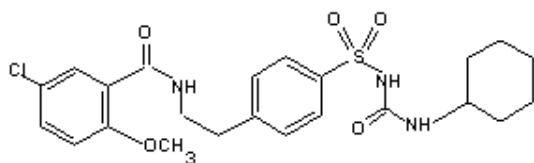
**KEY WORDS:** Glybenclamide, Polymorphism, Thermodynamics.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: cbregni@ciudad.com.ar

bido a sus propiedades físicas significativamente diferentes a veces son registrados como polimorfos, si bien estas partículas carecen del orden interno tridimensional característico de los cristales puros y por lo tanto no son polimorfos.

En la actualidad existen varios antecedentes del polimorfismo de las sulfonilureas y sus derivados tales como glibenclamida <sup>1</sup>, tolbutamida <sup>2</sup>, acetohexamida <sup>3</sup> y clorpropamida <sup>4</sup>, entre otras.

La glibenclamida, 1-4-[2-(5-cloro-2-metoxibenzamida)etil]bencenosulfonil-3-cicloexilurea (Figura 1), es una droga sólida de origen sintético de la familia de las sulfonilureas y uno de los antidiabéticos orales más potentes que se conoce, es bastante insoluble en agua y, en consecuencia presenta problemas de biodisponibilidad. Pero, como sucede en estos casos, la biodisponibilidad está limitada por la velocidad de disolución que es afectada por la presencia de polimorfismo.



**Figura 1.** Fórmula desarrollada de la Glibenclamida.

La teoría termodinámica establece que, debido a la transformación lenta del estado sólido, es posible determinar las propiedades de fusión de formas estables y metaestables y definir sus propiedades termodinámicas. Los datos de fusión -sobre todo calores y temperaturas de fusión- habitualmente se obtienen mediante técnicas calorimétricas, especialmente por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). A temperaturas cercanas al rango de fusión, la estabilidad termodinámica relativa entre dos polimorfos está claramente definida por el orden de la temperatura de fusión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Materias primas*

#### *Obtención de polimorfos*

Se usaron los lotes comerciales A (forma III) y B (forma I) de glibenclamida, que cumplen con exigencias USP 23, origen Alemania, protocolos de origen N° G00795 y 900710, respectivamente. Los polimorfos II y IV se obtuvieron por recristalización según el procedimiento descrito a continuación.

*Forma II:* 1,00 g del polimorfo I fue disuelto en 30 ml de metanol absoluto en ebullición, calentando en condiciones de reflujo y agitación constante. La solución resultante fue filtrada y enfriada a -5,00 °C, dejando descansar a esta temperatura durante 24 h. Luego se separaron los cristales formados por filtración al vacío con filtro Millipore 0,45 µm y lavando cuidadosamente (en frío) con metanol.

*Forma IV:* 1,50 g del polimorfo I se disolvieron en 50 ml de etanol absoluto a temperatura de ebullición calentando en condiciones de reflujo y agitación constante. La solución resultante fue filtrada y enfriada a -13,80 °C, dejando descansar a esta temperatura durante 24 h. Se separaron los cristales formados filtrando al vacío con filtro Millipore 0,45 µm y lavando cuidadosamente con etanol (en frío). En ambos casos los cristales se secaron durante 24 h a temperatura ambiente y condiciones de vacío. A continuación se los guardó en frascos perfectamente limpios, secos y herméticamente cerrados y se los conservó en freezer a -15 °C hasta el momento de los análisis.

La droga de referencia utilizada fue glibenclamida 99,90 % de pureza, valorada con estándar USP. Todos los reactivos utilizados responden a grado analítico. Para la preparación del medio de disolución y de las soluciones se usó agua bidestilada (apirógena) de pH 6,0 - 6,5.

### *Instrumental*

Espectrómetro de Difracción de Rayos X Shimadzu mod. XD-D1; Calorímetro Diferencial de Barrido Mettler 3000 System para mediciones DSC con procesador TC10A, Célula de Medición DSC20 para ensayo en rango normal de temperatura, Célula de medición DSC30 para ensayo en rango bajo de temperatura, Nitrógeno líquido para rango de 50 °C a 220 °C; Espectrofotómetro Infrarrojo Perkin Elmer mod. 580 B; Cromatógrafo Gaseoso KONICK, mod. 3000 - HRGC; Microscopio Electrónico de Barrido JEOL, mod. JSM-35c; Equipo de disolución SOTAX mod. AT7 con 7 unidades, volumen del baño 18 L, rango de velocidades entre 30 y 250 rpm ± 1 dígito, rango de temperaturas de 30 a 40 ± 0,2 °C; Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu mod. 1200 con sistema fotométrico de simple haz.

### *Condiciones experimentales de las medidas por DSC*

Se pesaron exactamente de 5 a 10 mg (±0,002 mg) de muestra en crisoles de aluminio y luego se sellaron herméticamente. Todas las

muestras fueron analizadas utilizando las mismas condiciones de trabajo: crisoles de aluminio cerrados herméticamente, temperatura inicial 140 °C., temperatura final 200°C, velocidad de barrido 2 °C/min., exactitud : 2%, Reproducibilidad: 0,5%. El equipo fue calibrado a tres temperaturas: 5,5°C - 156,4 °C - 419 °C, con estándares de Benceno, Indio y Zinc, respectivamente, se calibró el flujo de calor con una cantidad de Indio exactamente pesada y la velocidad de flujo de nitrógeno gaseoso: 30 ml/min.

Los polimorfos aquí estudiados se nombraron con números romanos siguiendo el orden decreciente de los puntos de fusión asignando el número I a la forma termodinámicamente estable a temperatura ambiente. Una vez hecho esto, se estudiaron con cierto detalle las relaciones termodinámicas entre polimorfos para lo cual se desarrollaron cuatro hipótesis en las que se predicen dos relaciones monotrópicas (polimorfos: IV y III; II y I) y dos enantiotrópicas (polimorfos: III y II; II y I)

De esta manera se aplicó un modelo termodinámico <sup>4</sup> basado en suponer la existencia de dos polimorfos: A y B en condiciones de presión constante (por ejemplo 1 atm) y que es posible medir las temperaturas de fusión (Tf.A. y Tf.B.), calores latentes ( $\Delta H_f.A.$  y  $\Delta H_f.B.$ ), además de los cambios de capacidades calóricas en el punto de fusión [(Cp.L. - Cp.A) y (Cp.L. - Cp.B)].

Suponiendo que el polimorfo A es el de menor temperatura de fusión (Tf.A. < Tf.B.), la estabilidad relativa del sistema está definida por la diferencia de energías libres de A y B a la temperatura T, según la expresión:  $\Delta G = G_B - G_A$ . De este modo, si  $\Delta G > 0$  A es más estable, si  $\Delta G < 0$  B es más estable y si  $\Delta G = 0$  A y B son igualmente estables.

Por otra parte, si existe una relación aproximadamente lineal entre la variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y la temperatura, se puede obtener la diferencia de energía libre a la temperatura de fusión de A valor (denominada  $\Delta G_0$ ), su pendiente de temperatura ( $\partial \Delta G / \partial T$ )<sub>0</sub>, a partir de las cuales se obtiene la estabilidad relativa extrapolando a otras temperaturas. De la misma forma se obtiene  $\Delta G = 0$  por extrapolación en un gráfico:  $\Delta G$  en función de T (temperatura) o lo que es lo mismo:  $\Delta G/T$  vs  $1/T$ . Podemos decir, entonces, que se puede estimar la temperatura de transición (o temperatura de transición virtual) cuyo valor nos permite deducir la presencia de monotropía o enantiotropía entre polimorfos. Si dos polimorfos son monotrópicos, uno es más estable que el otro a cual-

quier temperatura. En cambio, si son enantiotrópicos existe una temperatura de transición, menor que los dos puntos de fusión, donde por encima y por debajo de esta temperatura el orden de estabilidad es reversible.

De acuerdo con el modelo termodinámico usado también puede darse una tercera relación, que es cuando la transformación polimórfica ocurre tan lentamente que las curvas de energías libres de los dos polimorfos se cortan a una temperatura negativa, debajo de las temperaturas de fusión (como en la enantiotropía). En la práctica este comportamiento se correlaciona con el monotrópico, si bien en realidad carece de resolución termodinámica posible.

## RESULTADOS

### Variación de la Energía libre ( $\Delta G$ ) en función de la temperatura (T)

En las Figuras 2 y 3 se representan las relaciones entre la variación de energía libre de A y B y la temperatura (T), el líquido sobreenfriado (L) en la monotropía y en la enantiotropía.

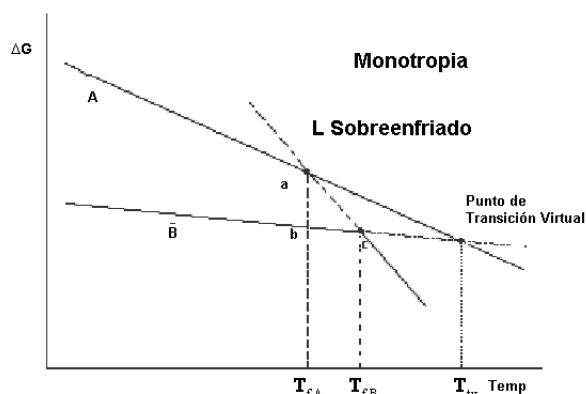


Figura 2. Variación de energía libre ( $\Delta G$ ) en función de la temperatura (T) para la monotropía entre polimorfos.

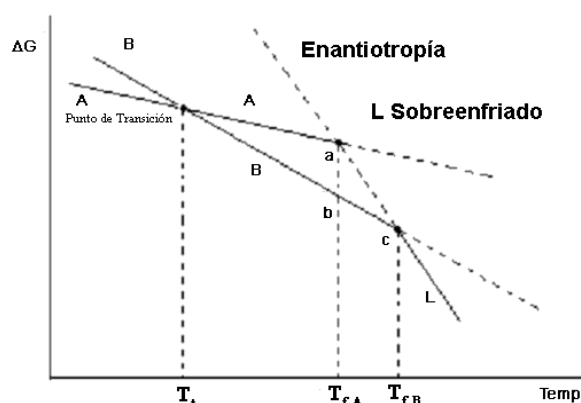


Figura 3. Variación de energía libre ( $\Delta G$ ) en función de la temperatura (T) para la enantiotropía entre polimorfos.

En las figuras anteriores se describe el Proceso (1) que representa la trayectoria a→b de la transformación sólido-sólido, y también se describe el Proceso (1)(a) donde la transformación sigue el camino a→b→c. De acuerdo con esto, en la etapa 2 se forma el líquido sobreenfriado

$$\Delta H_0 = \Delta H_{f.A.} - \Delta H_{f.B.} + (C_{p.L.} - C_{p.B.}) \times (T_{f.A.} - T_{f.B.}) \quad [1]$$

$$\Delta S_0 = \frac{\Delta H_{f.A.}}{T_{f.A.}} - \frac{\Delta H_{f.B.}}{T_{f.B.}} + (C_{p.L.} - C_{p.B.}) \times \ln \left( \frac{T_{f.B.}}{T_{f.A.}} \right) \quad [2]$$

donde ΔH<sub>0</sub>: calor de transición de A \* B a Tf.A., ΔS<sub>0</sub>: cambio de entropía del sistema a Tf.A., Cp.B.: calor específico de la forma B, Cp.L.: calor específico del líquido sobreenfriado.

Estas dos ecuaciones son válidas si el rango

$$\Delta G_0 = \Delta H_{f.B.} \left( \frac{T_{f.A.}}{T_{f.B.}} - 1 \right) + (C_{p.L.} - C_{p.B.}) \times \left[ T_{f.B.} - T_{f.A.} - T_{f.A.} \times \ln \left( \frac{T_{f.B.}}{T_{f.A.}} \right) \right] \quad [3]$$

Si la variación de energía libre (ΔG) es lineal con la temperatura su valor debajo de la temperatura de fusión de A esta dado por:

$$\Delta G_T = \Delta G_0 - \Delta S_0 (T - T_{f.A.}) \quad [4]$$

A la temperatura de transición GB=GA .es decir ΔG =0, de la ecuación 4 se obtiene:

$$Tt = \Delta H_0 / \Delta S_0 \quad [5]$$

Cuando la energía libre es altamente dependiente de la temperatura es necesario corregir

L (el líquido estable existe por encima de Tf.B).

Como ambos procesos tienen el mismo estado inicial y final, los cambios de entalpía y entropía de (1) se calculan suponiendo los cambios de cada una de las etapas de (1)(a). Así:

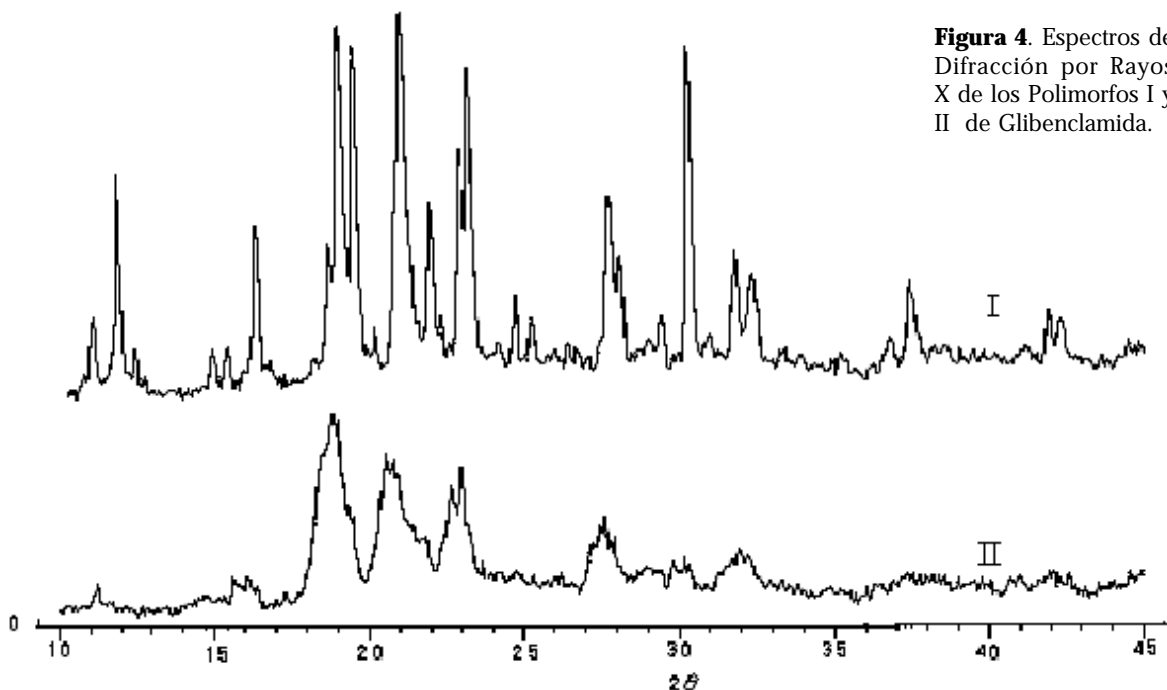
de integración entre las temperaturas Tf.A y Tf.B. es ≤ 20 °K. De este modo, la diferencia entre (Cp.L. - Cp.B.) es aproximadamente constante.

Combinando la expresión ΔG =ΔH -TΔS con las dos ecuaciones anteriores se obtiene:

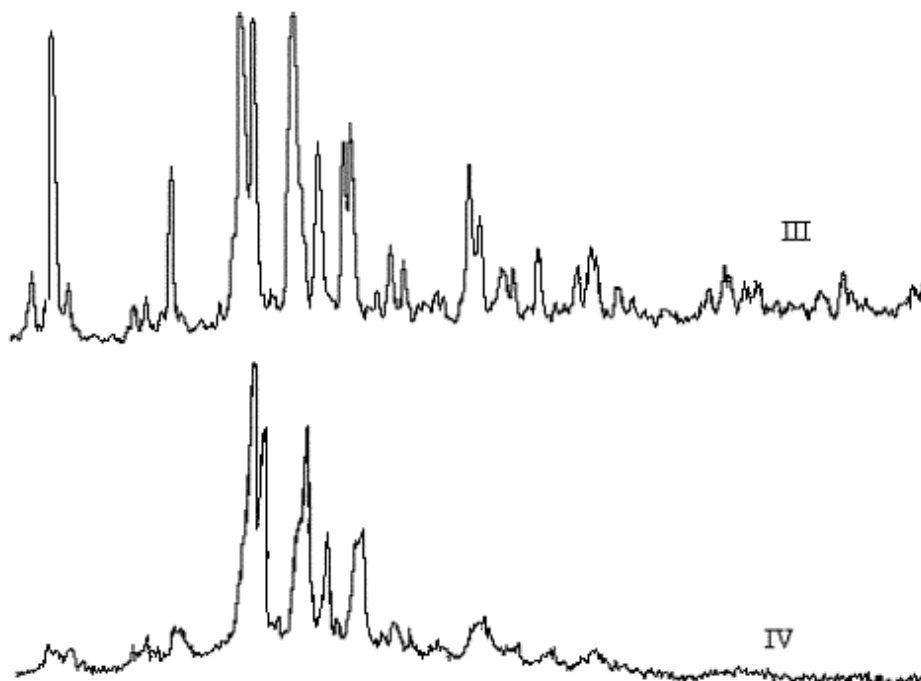
las ecuaciones 4 y 5 para poder realizar la extrapolación; pero en nuestro caso no fue necesario. La relación no-lineal de ΔG vs. T está dada por la diferencia de calores específicos de los polimorfos.

**Espectroscopía de Difracción por Rayos X**  
*Condiciones Experimentales de las medidas de Difracción por Rayos X*

Cada una de las muestras se molió adecuadamente y se colocó en un portamuestras de vi-



**Figura 4.** Espectros de Difracción por Rayos X de los Polimorfos I y II de Glibenclamide.



**Figura 5.** Espectros de Difracción por Rayos X de los Polimorfos III y IV de Glibenclamida.

Polimorfo	Forma cristalina	Dimensiones de celda		Volumen de celda
IV	Monoclínica Centrada en la Base	a = 13,944 Å b = 6,016 Å c = 7,661 Å	α = 90,00 grados β = 99,43 grados γ = 90,00 grados	633,98 Å <sup>3</sup>
III	Monoclínica Simple	a = 9,444 Å b = 17,706 Å c = 14,451 Å	α = 90,00 grados β = 93,11 grados γ = 90,00 grados	2412,99 Å <sup>3</sup>
II	Ortorrómbica Simple	a = 16,117 Å b = 12,696 Å c = 9,435 Å	α = 90,00 grados β = 90,00 grados γ = 90,00 grados	1930,58 Å <sup>3</sup>
I	Triclínica simple	a = 9,429160 Å b = 9,627872 Å c = 9,050986 Å	α = 116,90 grados β = 96,30 grados γ = 74,05 grados	704,44 Å <sup>3</sup>

**Tabla 1.** Patrones Cristalinos de los Polimorfos de Glibenclamida.

drio correspondiente al difractómetro empleado. Todas las muestras fueron analizadas en las mismas condiciones de trabajo, cuyas condiciones de barrido se describen a continuación:

Eje de las abscisas: 2 θ. Rango de ángulos medidos: 10,000 a 45,000°. Modo de barrido: continuo. Velocidad de barrido: 2 grados/min. Tiempo de integración (preset): 1,0 s. Escala total de intensidad de Rayos X (eje de las ordenadas del espectro): 1,0Kcps (kilo cuentas por segundo).

Cada señal en forma de pico registrada en el difractograma se identifica por el espacio interplanar, d, correspondiente al plano difractado.

Este valor d es calculado a partir del dato del ángulo 2θ de difracción que se observa en abscisas en el difractograma, y de la longitud de onda del haz de rayos X incidente (λ) a través de la ecuación de Bragg.

Previo a cada corrida se verificó el estado de calibración del difractómetro de Rayos X con un estándar de silicio. Las estructuras cristalinas incógnitas de los polimorfos de glibenclamida se calcularon aplicando métodos computacionales <sup>5</sup> a los datos de los espectros obtenidos.

Debido a que el criterio que define el polimorfismo entre dos formas cristalinas de un mis-

mo compuesto es la falta de equivalencia de patrones cristalinos <sup>6</sup>, el polimorfismo entre cristales de glibenclamida se demostró mediante la realización de espectros de difracción por Rayos X por el método del polvo. Se encontraron dife-

rencias de estructuras significativas entre los patrones cristalinos a juzgar por los datos espectrales observados en los respectivos registros (Tabla 1, Figs. 4 y 5).

Polimorfo	Temperatura de Fusión		Calor de Fusión ( $\Delta H$ ) J/g
	°C	°K	
IV	168,50	441,50	89,61
III	169,30	442,30	95,05
II	171,70	444,70	86,05
I	172,70	445,70	97,99

**Tabla 2.** Temperaturas y calores de fusión obtenidas por DSC para los polimorfos VI - III - II y I de Glibenclamida.

### Calorimetría Diferencial de Barrido

La relación de estabilidad entre pares de polimorfos de Glibenclamida se dedujo a partir de los datos de temperaturas y calores de fusión medidos por Calorimetría Diferencial de Barrido que se muestran en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se resumen las propiedades observadas en los cuatro polimorfos de la glibenclamida.

En la Tabla 4 se muestran las propiedades termodinámicas definidas a partir de los datos de fusión para cuatro combinaciones de pares cristalinos de Glibenclamida.

Tal como se mencionó anteriormente, los

Polimorfo	Origen	Estructura cristalina	Morfología externa	Temperatura de fusión
IV	Cristalización en etanol	Monoclínica centrada en la base	Columnas tabulares de caras planas paralelas, lisas y regulares	168,50 °C
III	Lote A	Monoclínica Simple	Bipirámides prismáticas de caras lisas y regulares	169,30 °C
II	Cristalización en metanol	Ortorrómbica	Láminas rectangulares exfoliadas	171,70 °C
I	Lote B	Triclínica Simple	Bastones tabulares con caras paralelas rugosas	172,70 °C

**Tabla 3.** Propiedades termodinámicas calculadas para cuatro pares de polimorfos de Glibenclamida.

Propiedad Termodinámica	Pares de Polimorfos			
	II y I	III y II	IV y II	IV y III
$\Delta H_0$	-11,65 J/g	9,62 J/g	4,38 J/g	-5,21 J/g
$\Delta S_0$	-0,03 J/g °K	0,02 J/g °K	0,01 J/g °K	-0,01 J/g °K
$\Delta G_0$	-0,22 J/g	-0,46 J/g	-0,62 J/g	-0,17 J/g
Tt (o Ttv)	453,24K	421,99 °K	387,08 °K	456,54 °K
	180,24 °C	148,99 °C	114,08 °C	183,54 °C
Relación	Monotropía	Enantiotropía	Enantiotropía	Monotropía

**Tabla 4.** Propiedades termodinámicas calculadas para cuatro pares de polimorfos de Glibenclamida.

polimorfos de Glibenclamida se ordenaron siguiendo el orden de las temperaturas de fusión según el criterio que establece menor número a mayor estabilidad a temperatura ambiente. Analizando la Tabla 3 vemos que el valor negativo de la diferencia de energía libre de Gibbs calculada para cada sistema indica que la forma estable se corresponde con la de menor energía libre. Siendo el orden de estabilidad I>II>III>IV.

### CONCLUSIONES

Los dos sistemas monotrópicos (pares IV-III y II-I) se comportan como se describe en la Figura 2. El valor de la temperatura de transición, llamada "virtual" por su imposibilidad de comprobación, significa que la transformación polimórfica sucedería a temperaturas más altas que los dos puntos de fusión, o sea que ninguna transformación polimórfica puede suceder debajo de esta temperatura. En estos sistemas, las curvas de energías libres ( $G_{IV}$  y  $G_{III}$  o  $G_{II}$  y  $G_I$ ) se cortarían a temperaturas más altas que las temperaturas de fusión de los dos polimorfos en cada caso. Esto significa que a medida que la temperatura T disminuye  $\Delta G$  también disminuye, haciéndose cada vez más negativa cuanto menor es la temperatura. Sin embargo, si ambas formas no estuviesen fundidas, a temperaturas

superiores a la temperatura de transición virtual (Tt.v.) el orden de estabilidad se invierte. Por lo que la monotropía no estaría dada por la divergencia de las curvas de energías libres sino más bien por la no convergencia debajo de las temperaturas de fusión. El cálculo de la temperatura de transición virtual (Tt.v.) podría ser un parámetro que estaría dando el grado de acercamiento de las dos curvas sabiendo que, con cambios de presión, los sistemas monotrópicos se convertirían en enantiotrópicos y viceversa.

El comportamiento de los dos sistemas enantiotrópicos (pares IV-II y III-II) se asimila al representado en la Figura 3 donde, a medida que la temperatura del sistema disminuye  $\Delta G$  aumenta, volviéndose positiva por debajo de la temperatura de transición (Tt) invirtiéndose el orden de estabilidad. En estas situaciones, la pendiente de temperatura es positiva para los dos sistemas.

Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de la existencia de otras formas polimórficas además de las informadas en la literatura.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen al CERIDSECEGRIN de Santa Fé el empleo del instrumental y las determinaciones analíticas realizadas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blume, H., S.A. Ali & M. Siewert (1993) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **19**: 2713-41.
2. Simmons, D. L., R.J. Ranz, N.D. Gyanchandani & P. Picotte (1972) *Can. J. Pharm. Sci.* **7**: 15-28.
3. Takla, P. G. & C.J. Dakas (1989) *J. Pharm. Pharmacol.* **41**: 227-30.
4. Yu, L. (1995) *J. Pharm. Sci.* **84**: 966-74.
5. Werner, P.-E. & L. Eriksson (1997) Treor'97 Version in Microsoft Fortran for PC; and Pirum "A Fortran program for least-squares refinement crystal-structure cell dimensions"; Arrhenius Lab, Stockholm University, Sweden.
6. Brittain, H. G. (1997) *J. Pharm. Sci.* **86**: 405-12.