Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 26, n.2, p. 119-123, 2005
ISSN 1808-4532

Análise térmica de esparfloxacino

Salgado, H.R.N.[1,2]*;Ribeiro, Y.A.[1]; Ribeiro, C.A.[3]; Schapoval, E.E.S.[2]

[1]*Depto de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, Brasil*
[2]*Depto de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil*
[3]*Depto de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil*

Recebido 16/03/05 / Aceito 20/10/05

RESUMO

Foi realizada a análise térmica de esparfloxacino, fluorquinolona de terceira geração que possui potente atividade contra bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* inclusive cepas meticilina resistentes (MRSA), bactérias Gram-negativas, anaeróbios, *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp. e *Mycobacterium* spp. Nas curvas DTA observa-se pico endotérmico de fusão na temperatura de 276,5 ºC. A curva DTA, em ar sintético, apresenta dois picos exotérmicos (341,6 e 579,2 ºC), atribuídos à decomposição do composto. A curva TG permite observar a perda de massa total em duas etapas, entre as temperaturas 285,5 e 645,3 ºC. A curva DTA, em atmosfera de nitrogênio, apresenta pico exotérmico de decomposição na temperatura de 340,0 ºC e na curva TG, a perda de massa inicia-se na temperatura de 254,4 ºC.

Palavras-chave: Análise térmica, antibacteriano, esparfloxacino, fluorquinolona, quinolona.

INTRODUÇÃO

As quinolonas constituem um grupo de antimicrobianos de largo espectro de ação, sendo utilizadas no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra microrganismos pouco sensíveis a muitos fármacos, como *Chlamydia*. O ácido nalidíxico foi o primeiro representante desta classe, e desde a síntese deste precursor, numerosas pesquisas têm sido realizadas a fim de melhorar a potência e o espectro de atividade antibacteriana desta classe (Asahina et al., 1992), uma vez que este precursor possui utilidade terapêutica limitada e facilidade no desenvolvimento de resistência bacteriana (Mandell & Petri, 1996). O núcleo 4-quinolona e a carboxila na posição 3 são comuns a esta classe de compostos, os quais são, freqüentemente, chamados de quinolonas (White et al., 1999). Os derivados diferem entre si nos substituintes do anel e da cadeia lateral. A introdução do grupamento piperazinila, além de reduzir a neurotoxicidade e melhorar a estabilidade de metabólitos, conferiu atividade contra *P. aeruginosa*. Com este objetivo surgiu, em 1978, o norfloxacino, que possui um átomo de flúor na posição 6 e uma piperazinila na posição 7 do anel quinolona. Estes substituintes aumentam a potência e o espectro de atividade. Tais modificações levaram a vantagens farmacocinéticas e toxicológicas sobre a primeira geração de quinolonas, como, também, à diminuição no aparecimento de cepas resistentes (Goldstein, 1987; Stahlmann, 1988).

O esparfloxacino (Figura 1), ácido 5-amino-1-ciclopropil-6,8-diflúor-1,4-diidro-7-(*cis*-3,5-dimetil-1-piperazinil)-4-oxo-quinolino-3-carboxílico, pertencente à classe das fluorquinolonas, é um agente antibacteriano de amplo espectro e apresenta potente atividade contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* inclusive cepas meticilina resistentes (MRSA), bactérias Gram-negativas, não fermentadoras de glicose, anaeróbios, *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp. e *Mycobacterium* spp (Cooper et al., 1990; Shimada et al., 1993; Aubier et al., 1996; Sparfloxacin, 1996; Goa et al., 1997). Além de seu amplo espectro de atividade, o esparfloxacino tem como vantagens a facilidade de esquema posológico e a sua baixa toxicidade (Sparfloxacin, 1993; 1999). O esparfloxacino ainda não é comercializado no mercado brasileiro, todavia esta fluorquinolona é produzida no Japão pela Dainippon Pharmaceutical Company Ltd. (Suita, Osaka) sob o nome de Spara® e na França, o produto é encontrado com o nome comercial Zagam® em comprimidos de 200 mg (Sparfloxacin, 1997), assim como na Suíça (Parfitt, 1999). Nos EUA, é desenvolvido também pela RPR, que comercializa o produto na África do Sul e no sudeste asiático. Embora faça parte do arsenal terapêutico mundial, esta fluorquinolona não possui metodologia de análise oficial. Foram desenvolvidos métodos de quantificação por espectrofotometria na região de ultravioleta (Marona & Schapoval, 1999a), cromatografia líquida de alta eficiência (Marona & Schapoval, 1999b), ensaio microbiológico (Marona & Schapoval, 1998), doseamento em meio não-aquoso (Marona & Schapoval, 2001a) e espectrofotometria na região visível (Marona & Schapoval, 2001b). A revisão do esparfloxacino foi realizada por Schentag (2000).

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos sobre a análise térmica de esparfloxacino, utilizando DSC, TG e TGA, uma vez que não há caracterização térmica desta fluorquinolona na literatura.

**Autor Correspondente:* H.R.N. Salgado - Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rod. Araraquara-Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil. Email: salgadoh@fcfar.unesp.br. Fone: 55 16 33 01 69 67, Fax: 55 16 33 01 69 60.

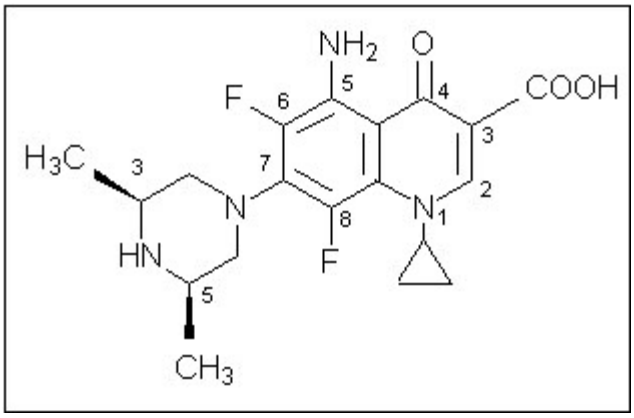

Figura 1 - Estrutura química do esparfloxacino (CAS 110871-86-8, AT-4140).

MATERIAL E MÉTODOS

Execução do ensaio

Material:

- Esparfloxacino substância de referência (SPAX-SR), com teor 99,5% (lote 631).*
- Esparfloxacino comprimidos revestidos (SPAX-COMP), 200 mg de SPAX (teor rotulado- Zagam®- lote 14843).*

Fórmula unitária: SPAX (200 mg), celulose microcristalina, amido, hidroxipropilcelulose, estearato de Mg, silício coloidal anidro, hipromelose, macrogol 600, dióxido de titânio.

As curvas TG e DTA foram obtidas através do módulo de análise térmica simultâneo SDT 2960 (TA Instruments). Os termopares para amostra e referência são de Pt-Pt/Rh 13%, com sensibilidade da balança de 0,1 µg e precisão de 1%, com capacidade de peso de 200 mg e sensibilidade ΔT (DTA) de 0,001 °C.

As curvas de DSC foram realizadas em módulo 2910 (TA Instruments), com capacidade de operação de –150 a 725°C. Os termopares diferenciais são de cromel-constantan e o termopar de amostra de cromel-alumel, com precisão calorimétrica de 1%, precisão de temperatura de 0,1%, reprodutibilidade de temperatura de ± 0,05 °C, taxa de aquecimento programável de 0,01 a 200 °C/min, sensibilidade máxima de 0,2 µW, massa de amostra de 0,5 a 100 mg e volume de amostra de 10 µL.Foram utilizados reagentes de grau analítico.

Método:

As amostras foram pulverizadas e dessecadas a 95 °C/ 8 h. Foram pesados analiticamente 9 mg de cada uma das amostras e colocadas em cadinhos de alumínio para realização das análises. Cada amostra foi analisada separadamente em aparelho de DSC, previamente calibrado com razão de aquecimento de 20 °C/min; variação de temperatura de 40-450°C e vazão de nitrogênio de 90 mL/min.

A faixa de temperatura utilizada foi de 0 a 1200 °C, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90 mL/min) e de nitrogênio (vazão de 90 mL/min), razão de aquecimento de 20 °C/min.

RESULTADOS

Foi realizado o estudo da estabilidade térmica do composto através da termogravimetria e análise térmica diferencial em atmosfera de nitrogênio e ar sintético. As curvas TG e DTA apresentaram diferenças de comportamento nas condições utilizadas.

Os termogramas apresentam as perdas de massa do esparfloxacino. A Figura 2 apresenta o termograma e a termogravimetria derivada de esparfloxacino sob atmosfera dinâmica de ar.

A curva sob atmosfera dinâmica de ar (Figura 2) apresenta dois estágios de perda de massa com o aquecimento que podem corresponder à decomposição do composto. Na curva DTA observa-se pico endotérmico de fusão na temperatura de 276,5°C. A temperatura de fusão observada encontra-se dentro da faixa de temperatura citada na literatura (O'Neil, 2001). O ponto de inflexão durante a perda da massa é determinado em, aproximadamente, 290°C, no qual um segundo pico endotérmico refere-se, provavelmente, à vaporização do composto fundido e correspondendo a 70% da massa inicial. No segundo estágio, a perda de massa também é uniforme. A curva DTA, em ar sintético, apresenta dois picos exotérmicos (341,6 e 579,2°C), atribuídos à decomposição do composto fundido (Figura 2).

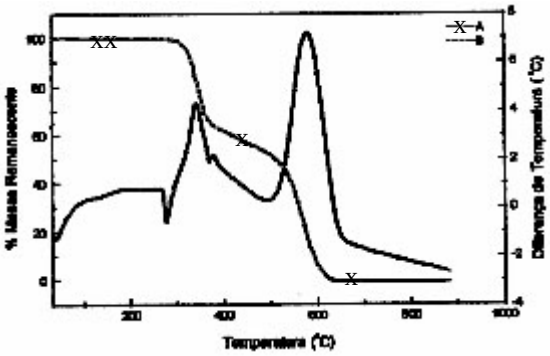

Figura 2 - Curva TG e DTA de esparfloxacino substância de referência. (A) TG (B) DTA sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90 mL/min); programação de aquecimento de 0 a 1000°C com razão de aquecimento de 20°C/min.

A Figura 3 apresenta o termograma e a termogravimetria derivada de esparfloxacino sob atmosfera de nitrogênio. Através da curva TG, verifica-se a perda de massa em duas etapas, entre as temperaturas 285,5 e 645,3°C. A curva DTA, em atmosfera de nitrogênio, apresenta pico exotérmico de decomposição na temperatura

* Gentilmente doado pela Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd (Suita, Osaka, Japan), na pessoa da Dra. Sayuri Kitada.

de 340,0ºC e na curva TG, a perda de massa inicia-se na temperatura de 254,4ºC (Figura 3).

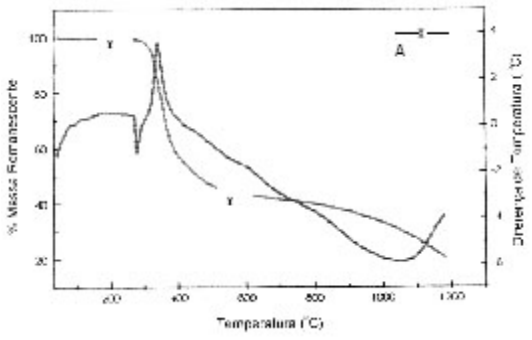

Figura 3 - Curva TG e DTA de esparfloxacino substância de referência. (A) TG (B) DTA sob atmosfera de nitrogênio (vazão de 90 mL/min); programação de aquecimento de 0 a 1200ºC com razão de aquecimento de 20ºC/min.

O pico exotérmico pode ser atribuído à oxidação dos produtos envolvidos e que correspondem à primeira perda de massa observada na curva de TG. O pico exotérmico em temperaturas mais elevadas pode ser atribuído à decomposição final do composto.

Tomando como parâmetro de análise o SPAX-SR (Figura 4), a curva DSC esparfloxacino comprimidos apresenta comportamento semelhante ao observado na curva de DSC de esparfloxacino substância de referência, mostrando um pico endotérmico de fusão em 260ºC. Deve-se salientar que as respectivas curvas mostram um pico endotérmico referente à fusão do esparfloxacino, evidenciando sua presença na forma farmacêutica. Não foram obtidos picos dos excipientes utilizados no comprimido. O esparfloxacino apresenta-se como cristais amarelos com faixa de fusão (decomposição) em 266-269ºC (O'Neil, 2001).

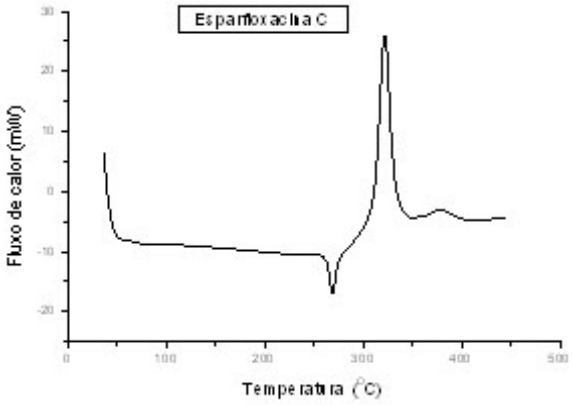

Figura 4 - Curva DSC de esparfloxacino substância de referência. Programação de aquecimento de 0 a 500ºC com razão de aquecimento de 20ºC/min.

DISCUSSÃO

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica que inclui métodos analíticos que determinam propriedades físicas de substâncias em função de modificações na temperatura, quando estas são submetidas a programas de temperatura controlada (Wendlandt, 1986). Tais técnicas envolvem o aquecimento e/ou arrefecimento simultâneo de amostra e substância de referência (contidas no mesmo forno), à mesma velocidade. A variação de temperatura entre a amostra e a substância de referência se dá em função da natureza desta e da temperatura a que se encontra no forno. Dentre as técnicas de análise térmica utilizadas na área farmacêutica podem-se citar a termogravimetria (TG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Giron, 1986; Barnes et al., 1993). A DSC é uma técnica similar à DTA, diferindo pelo fato de a amostra e a substância de referência se encontrarem em células (fornos) diferentes e possuírem, também, resistências distintas (Venkataram et al., 1995). Os métodos termoanalíticos têm sido amplamente utilizados na área farmacêutica em estudos de fármacos, excipientes, compatibilidades, caracterização térmica, estimação da pureza (Yoshii, 1997) e até mesmo para quantificação de fármacos (Wesolowski, 1992). O objetivo deste trabalho foi realizar a análise de esparfloxacino matéria-prima e comprimidos por DSC.

A termogravimetria (TG) permite registrar as variações de massa em função do tempo do ciclo de aquecimento ou arrefecimento e/ou temperatura (Canotilho et al., 1992). Desta forma, as curvas obtidas podem fornecer informações referentes à estabilidade térmica e à pureza da substância. A termogravimetria derivada é a derivada primeira da curva TG e possibilita uma melhor identificação da decomposição do composto (Giron, 1990; Canotilho et al., 1992). Entretanto, nem todos os eventos térmicos que ocorrem durante o aquecimento de uma amostra são acompanhados de mudança de massa (Brown, 1995).

A termogravimetria é uma técnica termoanalítica que apresenta as modificações (perda ou ganho) de massa de uma amostra em função da temperatura e/ou do tempo de exposição. Os termogramas são curvas que apresentam modificação de massas *versus* temperatura, e possibilitam informações relacionadas à estabilidade térmica e à composição inicial da amostra, dos compostos intermediários e do resíduo final.

A estabilidade térmica permite a determinação da capacidade de uma substância de manter suas propriedades sob variações térmicas.

Radecki & Wesolowski (1979) utilizaram a TG para avaliarem a influência dos excipientes de comprimidos na decomposição térmica de fármacos. As características das curvas podem ser utilizadas na identificação e na quantificação de produtos farmacêuticos (Wendlandt, 1986). Os parâmetros termoanalíticos para a determinação de componentes de um medicamento podem incluir: (i) desidratação, observada pela perda de água de cristalização e acompanhada pela formação de um composto intermediário de composição conhecida. Estes processos

ocorrem principalmente na faixa de temperatura entre 60 e 300ºC; (ii) descarboxilação, na qual a perda de CO_2 pode ocorrer entre 60 e 200ºC ou tardiamente em temperaturas elevadas entre 600 e 800ºC; (iii) perda de massa, resultante da formação de compostos intermediários da reação ou devido à total evaporação, sublimação e combustão dos componentes (Wendlandt, 1986).

É importante salientar que, em muitos casos, o uso de uma única técnica termoanalítica não permite informações suficientes sobre um dado sistema. Assim como em muitos outros métodos analíticos, informações complementares são obtidas por outras técnicas termoanalíticas. Desta forma, é comum associar resultados da DTA ou DSC às técnicas termogravimétricas (Wendlandt, 1986).

Dentre os fatores que afetam as curvas termogravimétricas, a atmosfera de análise tem sido relatada. O efeito da atmosfera sobre a modificação da massa do composto depende do tipo da reação, da natureza dos produtos de decomposição e do tipo utilizado de atmosfera (Wendlandt, 1986). O gás inerte é empregado para remover os produtos gasosos de decomposição da reação. Se a atmosfera contiver o mesmo gás da reação, somente as reações reversíveis serão afetadas. Quando a atmosfera dinâmica é utilizada, a taxa de decomposição é aumentada, bem como a concentração do gás ambiente, devido à decomposição da amostra. Se a concentração do gás aumenta, a taxa de reação diminui. Para a obtenção de resultados reprodutíveis, atmosferas dinâmicas rigorosamente controladas são recomendadas. Na curva de aquecimento em atmosfera dinâmica e nitrogênio, a reação de desidratação, que é reversível não é modificada, pois os gases são igualmente afetados e retirados pelo vapor d'água da superfície da amostra. Entretanto, em uma segunda etapa, as curvas podem divergir, uma vez que, sob atmosfera de nitrogênio, o oxigênio do composto reage com o produto formado, produzindo uma reação de oxidação secundária, que aumenta a temperatura do sólido que não reagiu. Neste caso, as temperaturas mais elevadas promovem a aceleração da taxa de decomposição. Portanto, a decomposição ocorre mais rapidamente e é completa em temperaturas inferiores quando em atmosfera dinâmica de ar. Por outro lado, o contrário é observado sob atmosfera de nitrogênio, quando altas temperaturas são necessárias para a completa decomposição do composto.

A determinação da pureza de esparfloxacino substância de referência e comprimidos foi determinada de acordo com a equação de Van't Hoff (Yoshii, 1997). Os valores obtidos foram de 99,56 e 99,54% para esparfloxacino substância de referência e comprimidos, respectivamente.

O comportamento semelhante verificado através das curvas de DSC, DTA e TG para o esparfloxacino na forma farmacêutica de comprimidos, quando comparado àquele observado através das respectivas curvas para a substância de referência, nas mesmas condições, comprovam a autenticidade da amostra.

As curvas de DTA permitiram observar os fenômenos endotérmicos e exotérmicos como fusão, vaporização e decomposição do fármaco. Além disto, as curvas de DSC permitiram identificar o esparfloxacino na formulação (Figura 5), através da faixa de fusão característica. Estes resultados podem ser utilizados no desenvolvimento de metodologia de análises qualitativas de esparfloxacino, paralelamente a outros métodos de análise, uma vez que este fármaco não possui método oficial de análise descrito na literatura, como foi mencionado anteriormente.

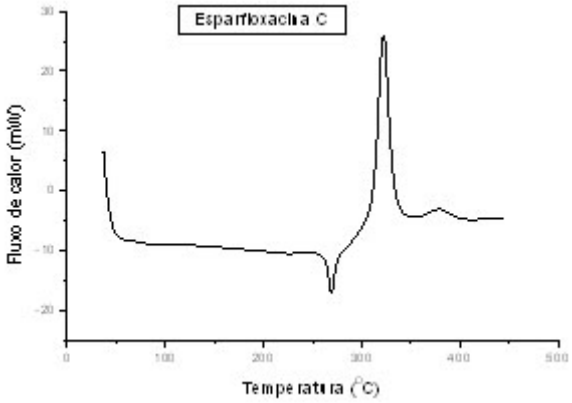

Figura 5 - Curva DSC de comprimidos de esparfloxacino. Programação de aquecimento de 0 a 500ºC com razão de aquecimento de 20ºC/min.

AGRADECIMENTOS

À Dainippon Pharmaceutical Co., Japão e ao Dr. Michel Pease da Rhône-Poulenc Rorer, U.S.A, pela doação da substância de referência e dos comprimidos de esparfloxacino. Ao Dr. Helder Teixeira pelo auxílio na aquisição dos comprimidos.

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

À CAPES-PICDT, pela bolsa concedida à H.R.N.S.

Ao CNPq.

Este trabalho foi apresentado no 1º Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria; promovido pela Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria, em Poços de Caldas (MG) em abril de 1998.

ABSTRACT

Thermal analysis of sparfloxacin

Sparfloxacin, a third-generation fluoroquinolone, is a potent antibacterial agent against a wide range of Gram-positive and Gram-negative organisms, for example *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (including methicillin-resistant strains), *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp. and *Mycobacterium* spp. This compound has been submitted to thermal analysis and the results are presented here. The DSC curve of sparfloxacin has an endothermic peak that indicates a melting point at 276.5 °C. The DTA curve of the sample in synthetic air shows two exothermic peaks, at 341.6 and 579.2 °C, attributed to compound decomposition. In the TG curve, the loss of mass can be seen to occur in two steps between 285.5 and 645.3 °C. The DTA curve obtained

in a nitrogen atmosphere shows an exothermic peak, with decomposition of sparfloxacin at 340.0 °C; from the corresponding TG plot, the loss of mass starts at 254.4 °C.
Keywords: Antibacterial substances, fluoroquinolones, quinolones, sparfloxacin, thermal analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asahina Y, Ishizaki T, Suzue S. Recent advances in structure activity relationships in new quinolones. Prog Drug Res, Birkhäuser Verlag, 1992; 38:57-106.

Aubier M, Lode H, Gialdroni-Grassi G, Huchon G, Hosie J, Legakis N, Regamey C, Segev S, Vester R, Wijnands WJ, Tolstuchow N. Sparfloxacin for the treatment of community-acquired pneumonia: a pooled data analysis of two studies. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37:73-82.

Barnes AF, Hardy MJ, Lever TJ. A review of the applications of thermal methods within the pharmaceutical industry. *J Thermal Anal* 1993; 40:499-509.

Brown ME. *Introduction to thermal analysis:* techniques and applications. New York: Chapman & Hall, 1995.

Canotilho J, De Sousa ATB, Pinto JAMC. Análise térmica. Interesse em tecnologia farmacêutica. *Rev Port Farm* 1992; 42:5-12.

Cooper MA, Andrews JM, Ashby JP, Mathews RS, Wise R. *In vitro* activity of sparfloxacin, a new quinolone antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26(5):667-76.

Giron D. Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal* 1986; 4(6):755-70.

Giron D. Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. *Acta Pharm Jugosl* 1990; 40:95-157.

Goa KL, Bryson HM, Markham A. Sparfloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability in lower respiratory tract infections. *Drugs* 1997; 53(4):700-25.

Goldstein EJC. Norfloxacin, a fluoroquinolone antibacterial agent: classification, mechanism of action, and *in vitro* activity. *Am J Med* 1987; 82(6B):3-17.

Mandell GL, Petri Jr WA. Fármacos antimicrobianos. *In*: Hardman JG, Limbird LE., editor. *Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Mc GrawHill; 1996. p.783-6.

Marona HRN, Schapoval EES. Desarrollo de análisis microbiológico para la determinación de esparfloxacino en polvo y en comprimidos de 200 mg. *Inf Tecnol* 1998; 9(5):251-4.

Marona HRN, Schapoval EES. Development and validation of a nonaqueous titration with perchloric acid to determine sparfloxacin in tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2001a; 52(2):227-9.

Marona HRN, Schapoval EES. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in pharmaceutical formulations using bromothymol blue. *J Pharm Biomed Anal* 2001b; 26(3):501-4.

Marona HRN, Schapoval EES. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in tablets. *J Antimicrob Chemother* 1999a; 44(1):136-7.

Marona HRN, Schapoval EES. High-performance liquid chromatographic assay of sparfloxacin. *J Pharm Biomed Anal* 1999b; 20:413-7.

O'Neil MJ, editor. The merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th. ed. Whitehouse Station: Merck, 2001.

Parfitt K, editor. Martindale: the complete drug reference. 32nd. ed. London: Pharmaceutical Press, 1999.

Radecki A, Wesolowski M. Studies on use of differential thermal and thermogravimetric techiques for checking compositions of some drug formulations. *J Thermal Anal* 1979; 17: 73.

Schentag JJ. Sparfloxacin: a review. *Clin Ther* 2000; 22:372-87.

Shimada J, Nogita T, Ishibashi Y. Clinical pharmacokinetics of sparfloxacin. *Clin Pharmacokin* 1993; 25(5):358-69.

Sparfloxacin Spara® Zagam®. *Drugs Fut* 1993; 18(5): 490-2.

Sparfloxacin Spara® Zagam®. *Drugs Fut* 1997; 22(5):575-7.

Sparfloxacin Spara® Zagam®. *Drugs Fut* 1999; 24(5)581.

Sparfloxacin: focus on clinical performance. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37(A). (Whole issue).

Stahlmann R. Fluoroquinolones: a new class of antimicrobial agents. *Drugs Today* 1988; 24(7):529-36.

Venkataram S, Khohlokwane M, Wallis SH. Differential scanning calorimetry as a quick scanning technique for solid state stability studies. *Drug Dev Ind Pharm* 1995; 21(7):847-55.

Wendlandt WW. *Thermal analysis*. 3rd. ed. New York: Wiley-Interscience; 1986. v.19, cap.2, p.18-25.

Wesolowski M. Analysis of drug formulations by thermal decomposition. *Thermochim Acta* 1992; 209:223-51.

White LO, Tobin CM, Lovering AM, Andrews JM. The 4-quinolones. *In:* Reeves DS, Wise R, Andrews JM, White LO. *Clinical antimicrobial assays.* Oxford: Oxford University; 1999. p.149-75.

Yoshii K. Application of differential scanning calorimetry to the estimation of drug purity: various problems and their solutions in purity analysis. *Chem Pharm Bull* 1997; 45(2):338-43.