



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DERIVADOS DE ERITROMICINA CON POSIBLE  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**Q U I M I C O**

P R E S E N T A :

**AARON RODRIGUEZ WELTON**



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO.

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	1
Eritromicina .....	2
Química .....	2
Estabilidad .....	4
Excreción .....	5
Usos .....	5
Resistencia .....	6
Mecanismo de acción.....	6
Fases importantes en la acción de fármacos .....	9
OBJETIVOS .....	12
RESULTADOS Y DISCUSION.....	13
PARTE EXPERIMENTAL.....	30
CONCLUSIONES .....	36
BIBLIOGRAFIA .....	38
ESPECTROS .....	39

## **INTRODUCCION.**

Las empresas farmoquímicas en México, sobretodo las medianas, ante la necesidad de diversificar su producción para una mayor y mejor competitividad en el mercado Nacional e Internacional y evitar la importación de tecnologías industriales, han empezado a apoyar grupos profesionales propios para desarrollar y optimizar procesos industriales.

El objetivo del presente trabajo consiste en la síntesis de nuevos derivados de Eritromicina con los cuales se establecen las bases experimentales para el desarrollo de una técnica para la obtención de un derivado comercial de eritromicina a escala piloto, partiendo de información publicada en revistas químicas y técnicas patentadas a nivel laboratorio. La metodología del proceso debería cumplir con los siguientes requisitos.

**Rendimiento global con buen margen de ganancia.**

**Calidad USP del producto.**

Implicar el menor número de pasos posibles considerando la infraestructura disponible en la empresa donde se desarrolló el trabajo.

## ANTECEDENTES.

Los antibióticos<sup>1,2,3</sup>, son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que inhiben el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Se conocen varios cientos de antibióticos, de los cuales cerca de 100 son de uso terapéutico en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Los antibióticos difieren marcadamente unos de otros en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, espectros antibacterianos y mecanismos de acción. De hecho en función de tales diferencias se han desarrollado diversos métodos para clasificar y agrupar a los agentes antimicrobianos:

1) Los agentes que inhiben la síntesis de las enzimas que rompen las paredes celulares bacterianas causando pérdida de la viabilidad y a menudo la lisis celular.

2) Los agentes que actúan directamente sobre la membrana celular, afectando su permeabilidad y produciendo filtración de compuestos intracelulares.

3) Los agentes que afectan la función de los ribosomas bacterianos causando inhibición reversible de la síntesis de proteínas.

4) Agentes que se unen a la subunidad ribosomal 30S y alteran la síntesis proteica, lo que conduce a la muerte celular.

5) Agentes que afectan el metabolismo del ácido nucleico.

6) Los antimetabolitos.

7) Los análogos del ácido nucleico.

Si bien la mayoría de los antibióticos conocidos se aisló como un metabolito secundario procedente de un cultivo de células de un

microorganismo, la química sintética ha contribuido notablemente en la obtención de mejores resultados por modificación estructural de ciertos grupos funcionales de la molécula original. En realidad, poca es la distinción que puede hacerse ya entre los compuestos de origen natural y sintético.

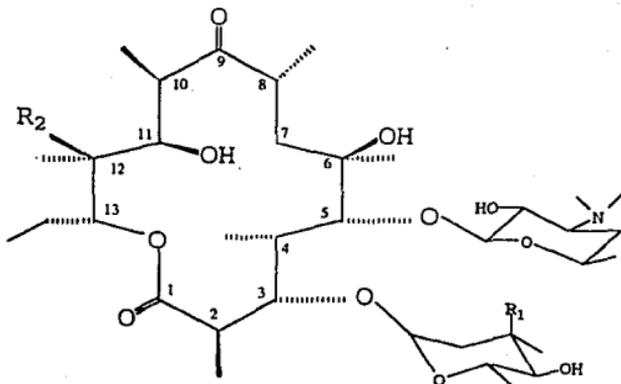
## ERITROMICINA

Terapéuticamente la Eritromicina<sup>3,4,5</sup> es sumamente importante y estructuralmente es uno de los antibióticos macrólidos más complejos. Este fué derivado de un actinomiceto, originalmente aislado de una muestra de tierra de la Ciudad de Iloilo en la isla de Panay en el archipiélago Filipino. El organismo fué identificado de una cepa de *Streptomyces erythreus*.

## QUIMICA

Existen cuatro Eritromicinas designadas A, B, C y D respectivamente, la proporción en la cual se producen durante la fermentación puede ser alterada por el cambio del contenido de nitrógeno del medio de cultivo. Cualitativamente la forma A presenta la toxicidad más baja en humanos y es la más activa contra las bacterias gram-positivas, tal como *Staphylococcus*, que es resistente a la Penicilina. La Eritromicina es higroscópica, inodora o casi inodora, se presenta como cristales blancos o ligeramente amarillentos. La base libre es poco soluble en agua (2 mg por ml). Muy soluble en Alcoholes, Acetona, Cloroformo y Acetonitrilo, moderadamente soluble en Éter y Dicloro etano. Su fórmula empírica es  $C_{37}H_{67}NO_{13}$  (masa molecular: 733.92), y conforme a las regulaciones de la Federal Food and Drug Administration concerniente a antibióticos y

fármacos, el contenido no debe ser menor a 850 mg de  $C_{37}H_{67}NO_{13}$  por mg calculado sobre su base anhidra. La estructura de las Eritromicinas A,B,C y D es la siguiente:



Eritromicina A  $R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = OH$ .

Eritromicina B  $R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = H$ .

Eritromicina C  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = OH$ .

Eritromicina D  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$

La Eritromicina A consiste esencialmente de 2 azúcares-desosamina y cladinosa-unidas al eritronólido (ver estructura). La molécula es completamente saturada y contiene 18 átomos de carbono asimétricos, 10 de los cuales se encuentran en el anillo ( $2R^*$ ,  $3S^*$ ,  $4S^*$ ,  $5R^*$ ,  $6R^*$ ,  $8R^*$ ,  $10R^*$ ,  $11R^*$ ,  $12R^*$ ,  $13R^*$ ). A diferencia de otros antibióticos macrólidos no presenta dobles enlaces carbono-carbono en el anillo lactónico. El eritronólido parece ser un derivado de un C-21-

hidroxilato de ácido graso con una cadena principal de 15-carbonos. La Eritromicina es una base relativamente débil y forma sales con los ácidos. Se han preparado un sin número de ésteres y otros derivados de la Eritromicina, algunos de ellos tienen propiedades farmacéuticas superiores al compuesto original, en las mismas proporciones. Estas sales y derivados han sido preparados con el fin de enmascarar el sabor amargo de la base libre.

### **ESTABILIDAD**

La Eritromicina es estable en estado seco, en solución retiene su actividad durante almacenamiento prolongado (5°C), al igual que a temperatura ambiente, sin perder progresivamente su actividad por varios días. Por breve exposición de sus soluciones a una temperatura de 60°C, la pérdida de actividad del antibiótico es muy rápida.

### **EXCRECION**

La principal ruta de excreción es renal (filtración glomerular) y biliar, la cantidad ingerida diaria puede ser demostrada en forma activa en la orina alcanzando una concentración de 2 mg por ml. Sin embargo la concentración en la orina no es necesariamente un índice de la concentración en el tejido y la presencia del antibiótico no es una garantía de efectividad máxima.

La Eritromicina también es excretada por la bilis. Cuando en los niveles de sangre es 2 µg o menos por ml; comparativamente el nivel es más pequeño en la bilis, pero en pacientes con niveles de suero de 4 µg o más por ml; la concentración en la bilis tiene un intervalo de 32 a 256 µg por ml, dependiendo de la duración de la terapia o de algún otro factor.

## USOS

*In vitro* el espectro antimicrobiano de la Eritromicina es parecido al de la Benzil Penicilina. El antibiótico es activo también contra las mismas formas (L-protoplastos) de organismos, los cuales en estado normal no son afectados por él; la misma micobacteria y la misma amiba son susceptibles a esta acción.

La actividad antibacteriana de Eritromicina tiene un marcado incremento por alcalinización del medio de cultivo.

La Eritromicina es considerada por muchos el fármaco de elección en el tratamiento de infecciones de Staphylococcus, resistentes a la Penicilina y/o Tetraciclina. Más del 90% del staphylococcus aislados de pacientes susceptibles a Eritromicina en diversos estudios, sólo un 50 a 60% son inhibidas por Penicilina y aproximadamente un 75% por Cloro u Oxitetraclina.

## RESISTENCIA

Normalmente las bacterias no parecen tener una fácil resistencia a la Eritromicina *In vivo*.

*In vitro*; organismos resistentes surgen rápidamente sobre repetidas series de transferencias de Staphylococcus, la resistencia a la Eritromicina se debe a la desmetilación de un residuo adenina específico (o varios) en el ácido ribonucleico de los ribosomas 23S, que puede expresarse de una forma inducible o constitucional.

## MECANISMO DE ACCION

La Eritromicina y otros antibióticos macrólidos, inhiben la síntesis de proteínas uniéndose a subunidades ribosomales 50S de microorganismos sensibles. La asociación entre la Eritromicina y el ribosoma es reversible y sólo se produce cuando la subunidad 50S está libre de moléculas de RNAt portadoras de cadenas nacientes de péptidos. La producción de pequeños péptidos continúa normalmente en presencia del antibiótico, pero la de homopéptidos altamente polimerizados se suprime.

El interés en desarrollar nuevos derivados de antibióticos ya comerciales, reside en ampliar su espectro de acción, disminuir su toxicidad y en el caso de las grandes firmas farmacéuticas mantenerse en un primer nivel en el mercado. Los primeros derivados de la Eritromicina son sales o ésteres los cuales son preparados con la finalidad de enmascarar el sabor amargo de la base libre (especialmente importante en uso pediátrico), además para mejorar su estabilidad y facilitar su absorción. Pero éstos compuestos sufren hidrólisis en el cuerpo para dar la base libre que es el principio activo.

A éstas sales o ésteres se les ha denominado de primera generación, a continuación se enlistan los de mayor uso terapéutico:

- a) Estearato de Eritromicina
- b) Estolato de Eritromicina
- c) Etilcarbonato de Eritromicina
- d) Etilsuccinato de Eritromicina
- e) Glucoheptonato de Eritromicina

## f) Lactobionato de Eritromicina

Los nuevos derivados o de segunda generación son aquellos en los que se realiza modificación en la estructura del anillo lactónico, principalmente en el carbonilo en C-9, que es esencial para la actividad antibacteriana<sup>12</sup>, ésto con la finalidad de incrementar su actividad *In vivo*. Algunos de ellos sirven como intermediarios para la obtención de derivados más complejos, de los cuales son utilizados uno o dos grupos funcionales del anillo lactónico, por ejemplo: La Roxitromicina donde se efectúa una O-alquilación de la Oxima de Eritromicina (previamente sintetizada), y la Dirhitromicina en la cual se utilizan la amina primaria en C-9 (previamente sintetizada) y el oxhidrido en C-11 formándose un aminocetal. Otro tipo de derivados se obtienen alquilando sólo uno de los grupos oxhidrido del anillo lactónico, por ejemplo: La Claritromicina, en la cual se forma un grupo metoxi en el átomo de carbono-6, sustituyendo al alcohol terciario.

Resultados de pruebas<sup>20,21,22</sup> *In vitro* de la actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática contra estafilococcus, enterococcus y estreptococcus, de Eritromicina y sus más recientes derivados químicos, muestran que los antibióticos más activos son la Azitromicina y Clarhitromicina, siguiéndole la Eritromicina y después la Roxitromicina. Empero, la Roxitromicina ha demostrado ser efectiva *In vitro* contra los siguientes microorganismos, muchos de ellos oportunistas: *Rodococcus equi*; *Campilobacter sp*; *Micobacterium leprae*; *Mycoplasma pneumoniae*; *Ureaplasma urealiticum*; *Legionella pneumofila* y *L. spi*; *Streptococcus sanguis* y *Chlamidia salpingitis*. Además, la Roxitromicina logró penetrar

células fagocíticas que contienen microorganismos intracelulares facultativos.

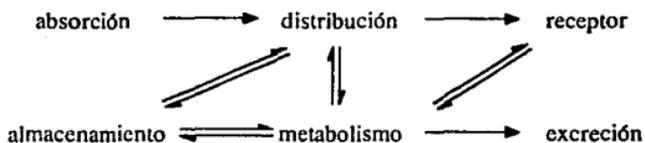
El impacto<sup>24</sup> de la Roxitromicina administrada en forma oral sobre la flora microbiana normal, parece ser menor que el observado con Eritromicina (solo disminuye en cantidad a los miembros de la familia enterobacteriaceae), quizá debido a que las concentraciones de Roxitromicina en heces son menores que las de Eritromicina. La concentración máxima de Roxitromicina en suero por administración de dos dosis orales de 150 mg al día, durante 3 a 4 días, varía de 5.5 a 11.1 mg/l. La vida media de Roxitromicina en suero, en individuos sanos ésta entre 9 y 16 horas. La capacidad de distribución de Roxitromicina en los tejidos del cuerpo se ha calificado de excelente. Por lo que la Roxitromicina puede ser recomendada como un antibiótico de elección, en caso de infecciones poco o medianamente severas, causadas por agentes microbianos sensibles a éste fármaco.

### **FASES IMPORTANTES EN LA ACCION DE FARMACOS .**

Todos los organismos vivos son sistemas químicamente dinámicos<sup>16,17</sup> resultado directo de una serie de reacciones químicas interdependientes que se mantienen en equilibrio. Se dice que existe una forma de actividad biológica, cuando una sustancia química es introducida a éste sistema y produce alteraciones ya sea por aceleración, inhibición o interacción con una o más de las reacciones químicas o de sus componentes.

La actividad biológica de cualquier sustancia ésta gobernada por diversos factores incluyendo transporte y almacenamiento en tejidos inertes, acción de enzimas degradativas e interacción con el receptor biológico.

El camino de una sustancia química desde su aplicación hasta la reacción con el sitio receptor, se puede esquematizar de la manera siguiente:



Los efectos que pueden causar los fármacos resultan en un aparente complejo de procesos, en los cuales intervienen varios factores. Se pueden observar Tres fases en la acción de un fármaco.

**Fase farmacéutica, fase farmacocinética y fase farmacodinámica.**

Durante la fase farmacéutica, que puede ser también la fase de exposición, en la cual ocurre la desintegración de la forma farmacéutica en que es administrado el fármaco, la fracción de la dosis que es removida por absorción, constituye una medida de la capacidad farmacéutica.

Durante la fase farmacocinética ocurre la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco.

La fase farmacodinámica comprende el proceso de interacción del fármaco con los receptores. Esta interacción resulta en una respuesta que desencadena una serie de fenómenos químicos y bioquímicos produciendo el efecto esperado.

## **OBJETIVOS.**

1) Efectuar la síntesis de derivados de Eritromicina A, intercambiando el carbonilo en C-9 y el oxhidrilo en C-2' por otros grupos funcionales. Los derivados diseñados son enlistados a continuación:

Oxima de Eritromicina.

Roxitromicina.

9-[(4-Metil piperazinil) hidrazona] de Eritromicina.

9-[[[(4-Metil piperazinil)-2'-propionil] hidrazona] de Eritromicina.

9-(morfolinil hidrazona) de Eritromicina.

9-[(morfolinil-2'-propionil) hidrazona] de Eritromicina.

2) Contribuir en el desarrollo de una técnica a escala piloto, basándose en patentes de laboratorio, para la producción de antibióticos derivados de la Eritromicina.

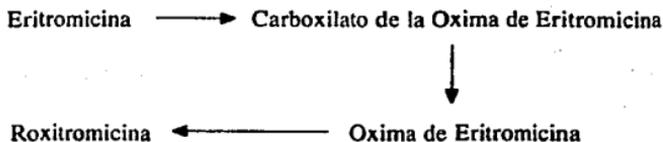
3) Determinar la actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se partió de la documentación bibliográfica, obtenida en bancos de datos sobre la síntesis, métodos químicos de identificación y pruebas biológicas. Una vez analizada la información se determinó ensayar experimentalmente una técnica de preparación de la oxima<sup>7,8</sup> y de las hidrazonas de Eritromicina, así como también un método de alquilación de la Oxima<sup>9</sup>. Por ser difícil obtener un estándar USP de la Roxitromicina y de la Oxima se aisló el principio activo de un producto farmacéutico comercial que tiene como principio activo Roxitromicina, (Rulid).

Como el proceso de preparación de la Roxitromicina es de interés para la compañía que financía el estudio, no se podrá revelar los procedimientos finales a que se llegó. Empero, se puede adelantar que la ruta consta de dos transformaciones: formación de la Oxima de la Eritromicina y alquilación de la misma, con purificación del producto de reacción y recuperación de aguas madres. El rendimiento global desde Eritromicina usada como sustrato inicial, hasta Roxitromicina de calidad USP, es de 50% w/w. Es de hacer notar que de la literatura consultada se desprende un proceso que consta de dos reacciones, tres intermediarios, dos recristalizaciones y cuatro recuperaciones de producto de las aguas madres. Las reacciones efectuadas se visualizan en el Esquema 1.

### ESQUEMA 1.



Esta ruta consta de ocho pasos en total. En este trabajo se logró acortar la ruta a tan sólo cuatro pasos.

Se estudiaron los siguientes parámetros en cada una de las reacciones: concentración del reactivo [Hidroxilamina y/o Cloruro de (2-metoxietoxi) metilo nombre comercial (CI-MEM)]; disolvente y volumen del mismo, temperatura y tiempo de reacción, catálisis, método de aislamiento y purificación por precipitación y/o cristalización. También se desarrolló un método de preparación del CI-MEM, por problemas derivados de su costo y adquisición. Corey et al<sup>19</sup>, refieren tan sólo que se parte del Metil Cellosolve y Trioxano con un flujo de Cloruro de Hidrógeno, extrayendo con Pentano y secando con MgSO<sub>4</sub>. Se logró establecer un rendimiento del 90% en un concentrado, extrayendo con Cloruro de Metileno y secando con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, evitando la destilación.

Para la realización de las pruebas biológicas, en éste trabajo se emplearon los métodos informados en la literatura<sup>7,8,9</sup>.

Los datos experimentales de las reacciones de formación de hidrazonas se enlistan en las tablas 1, 2, 3, y 4, observándose que el mejor pH de reacción es 6.6 con Ácido Láctico, la temperatura de reacción 70°C, el pH de precipitación del producto con mayor pureza: 5.8, el mejor sistema de

disolventes de reacción 1.2 volúmenes de Metanol y 1 volumen de Agua, con respecto a la Eritromicina base.

Se realizó una precipitación directa del medio de reacción, adicionando 4 volúmenes de Agua y alcalinizando con NaOH al 30% a un pH de 10.2 a 11, con un rendimiento del 90%, pero estas hidrazonas presentan problemas en su purificación.

Se efectuó la extracción directa del medio de reacción adicionando 4 volúmenes de Agua y 6 volúmenes de Cloruro de Metileno para extracción, alcalinizando a un pH de 10.2 a 11, y concentración del disolvente, obteniéndose un 70% de rendimiento pero con un menor grado de pureza comparado con el que pasa por lactato de hidrazona.

Se busco un mejor disolvente de extracción probándose Cloruro de Metileno, Cloroformo y Acetato de Etilo observándose por cef que el Acetato de Etilo es el mejor disolvente para la extracción, con el inconveniente de que al concentrarlo la Oxima no precipita, sino que se forma una pasta, evitando la obtención de la misma. El Cloroformo extrae de manera semejante al Cloruro de Metileno y por ser éste menos tóxico se prefiere al primero.

Con la aportación de éstos datos, se lleva al cabo la síntesis de las hidrazonas.

**TABLA 1**

ACIDO	% RENDIMIENTO DE CARBOXILATO DE HIDRAZONA DE ERITROMICINA
FÓRMICO	82.2
ACÉTICO	80.5
LÁCTICO	90

**TABLA 2**

TEMPERATURA(OC)	TIEMPO(HORAS)	%RENDIMIENTO CARBOXILATO DE HIDRAZONA DE ERITROMICINA
45	48	40
50	48	50
60	36	64
65	36	75
70	24	90

**TABLA 3**

pH DE PRECIPITACION	% RENDIMIENTO DE PRECIPITACION	% PUREZA EN CCF	% RENDIMIENTO HIDRAZONA DE KITROMICINA LIBRE
	5.0	90	80
5.2	90	80	62
5.5	90	85	64
5.8	90	90	70
6.0	90	85	60
6.3	85	80	50
6.6	80	75	50

**TABLA 4**

SISTEMA DE DISOLVENTES		TIEMPO (HORAS)	%RENDIMIENTO DE LACTATO DE ERITROMICINA	%RENDIMIENTO HIDRAZONA DE ERITROMICINA LIBRE
MeOH	H <sub>2</sub> O			
5V/W	-	22	80	50
3V/W	-	22	80	50
5V/W	1V/W	24	82	55
3V/W	1V/W	24	90	70
2V/W	1V/W	24	90	70
1.2V/W	1V/W	24	90	70
1.2V/W	1.5V/W	36	90	60

### 3.- Síntesis de 9-[(4-Metil piperazinil) hidrazona] de Eritromicina.

La 9-[(4-Metil piperazinil) hidrazona] de Eritromicina, se obtiene a partir de la Eritromicina base y la 1-Amino-4-metil piperazina, utilizando Metanol/Agua como disolventes, con un rendimiento del 70%.

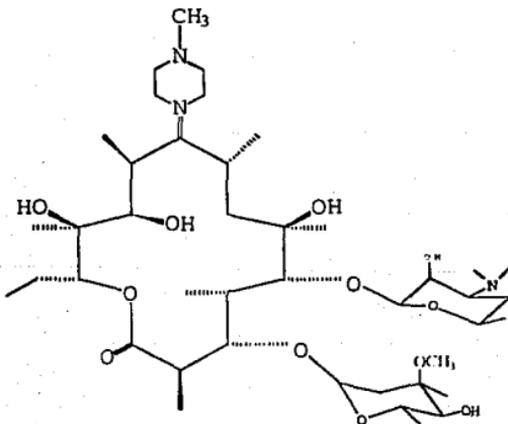
La estructura de éste compuesto, así como sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en el Esquema 2.

El espectro de infrarrojo, presenta bandas de absorción a 3440, 2960, 1725, 1600, 1445, 1380, 1150, 1100, 1045 cm<sup>-1</sup> características para la Eritromicina, exceptuando la banda a 1600 cm<sup>-1</sup> que es una banda pequeña y ancha característica de hidrazonas en sustitución de la banda a 1715 cm<sup>-1</sup> que correspondería al grupo cetona del carbono-9 de la Eritromicina.

La diferencia entre este nuevo derivado y la Eritromicina estriba en la nueva señal del espectro de infrarrojo a 1600  $\text{cm}^{-1}$  del grupo cetona, presentando punto de fusión, actividad óptica y  $R_f$  distintos a los de la Eritromicina base.

Debido a lo complejo del espectro de RMNP no es posible asignar las nuevas senales correspondientes al sustituyente en la posición 9, por lo que sólo son asignadas algunas señales características.

### ESQUEMA 2



P.f. = 130-134 $^{\circ}\text{C}$  con descomposición

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -45^{\circ}$

IR 3440, 2960, 2920, 1725, 1600, 1445, 1380, 1150, 1100, 1045  $\text{cm}^{-1}$  (Espectro 3)

RMNP(90Mhz,CDCl<sub>3</sub>):0.85(3H,t,CH<sub>3</sub>-15);1.51(3H,s,CH<sub>3</sub>6);  
2.3(6H,s,NMe<sub>2</sub>); 3.3(3H,s,OCH<sub>3</sub>); 4.0(1H,s,H-1');4.4(1H,d,H-1");  
4.86(1H,dd,H-13); 5.1(1H,d,H-11). (Espectro 3a).

#### **4.- Síntesis de 9-[(4-Metil piperazinil)-2'-propionil] hidrazona] de Eritromicina.**

Este derivado es obtenido a partir de la 9-[(4-Metil piperazinil) hidrazona] de Eritromicina y Anhídrido Propiónico, utilizando Acetona como disolvente, con un rendimiento del 96%.

La estructura de este compuesto así como sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en el Esquema 3

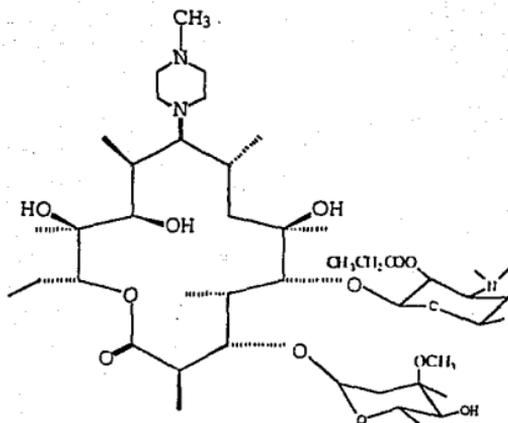
El espectro de infrarrojo presenta bandas de absorción a 3460, 2960, 1735, 1600, 1445, 1380, 1270, 1200, 1150, 1100, 1045 cm<sup>-1</sup>, características para la Eritromicina, exceptuando las bandas a 1600, 1270, 1200.cm<sup>-1</sup>.

La diferencia entre este derivado y su compuesto de partida se observa en el espectro de infrarrojo en el cual se tiene un incremento en la banda correspondiente a los carbonilos en 1735 cm<sup>-1</sup> y los sobretonos característicos de los ésteres a 1270 y 1200 cm<sup>-1</sup> y el decremento en las bandas en 3460, 2960, y 1600 cm<sup>-1</sup> que casi no se puede observar.

En el espectro de RMNP aparece una nueva señal en 4.75 ppm que corresponde al H-2' desplazado a campos más bajos debido a que se encuentra unido al carbono vecino del éster introducido.

Por lo anteriormente descrito y la diferencia en su Pf., actividad óptica y Rf, se comprueba que la estructura propuesta es la indicada en el Esquema 3.

### ESQUEMA 3.



P f = 125-130°C con descomposición.

$[\alpha]_{25}^{D} = -41.90$

IR 3460, 2960, 2920, 1735, 1600, 1445, 1380, 1270, 1200, 1150, 1100, 1045,  $\text{cm}^{-1}$  (Espectro 4).

RMNP (90Mhz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.85(3H, t,  $\text{CH}_3$ -15); 1.51(3H, s,  $\text{CH}_3$ -6); 2.3(6H, s,  $\text{NMe}_2$ ); 3.3(3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); 4.0(1H, s, H-1'); 4.4(1H, d, H-1''); 4.75(1H, t, H-2''); 4.86(1H, dd, H-13); 5.1(1H, d, H-11). (Espectro 4a).

### **5.- Síntesis de 9-[Morfolinil hidrazona] de Eritromicina.**

La 9-[Morfolinil hidrazona] de Eritromicina, es obtenida a partir de la Eritromicina base y la 4-Amino morfolina, utilizando Metanol/Agua como disolvente, con un rendimiento del 68.5%.

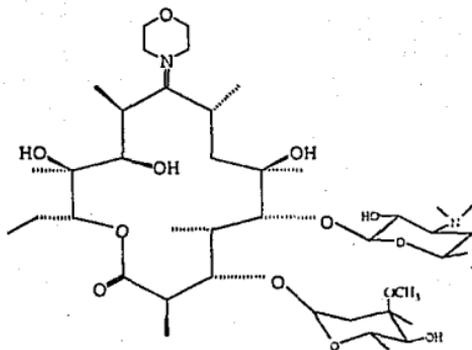
La estructura de éste compuesto, así como sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en el Esquema 4..

El espectro de infrarrojo presenta bandas de absorción a 3460, 2960, 1730, 1640, 1450, 1380, 1150, 1100, 1045  $\text{cm}^{-1}$ , características para la Eritromicina, exceptuando la banda a 1640  $\text{cm}^{-1}$  que es una banda pequeña y ancha característica de hidrazonas, en sustitución de la banda a 1715  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al grupo cetona del carbono-9 de la Eritromicina.

La diferencia entre este nuevo derivado y la Eritromicina estriba en la nueva señal del espectro de infrarrojo a 1640  $\text{cm}^{-1}$ , con la consiguiente desaparición de la banda a 1715  $\text{cm}^{-1}$  del grupo cetona, presentando Pf., actividad óptica y Rf distintos a la Eritromicina.

Debido a lo complejo del espectro de RMNP no es posible asignar las nuevas señales correspondientes al sustituyente en la posición 9 de la Eritromicina, por lo cual sólo son asignadas algunas señales característica.

#### ESQUEMA 4



P f. = 128-132°C con descomposición.

$[\alpha]_{D_{25}}^{20} = -45.1^{\circ}$

IR 3460, 2960, 2920, 1730, 1640, 1450, 1380, 1150, 1100, 1045 cm<sup>-1</sup> (Espectro 5).

RMNP (90Mhz, CDCl<sub>3</sub>): 0.85(3H, t, CH<sub>3</sub>-15);

1.53(3H, s, CH<sub>3</sub>-6); 2.3(6H, s, NMe<sub>2</sub>); 3.3(3H, s, OCH<sub>3</sub>); 4.0(1H, s, H-1'); 4.4(1H, d, 1");

4.86(1H, dd, H-13); 5.1(1H, d, H-11). (Espectro 5a).

## **6.- Síntesis de 9-[(Morfolinil-2'-propionil) hidrazona] de Eritromicina.**

Este derivado es obtenido apartir de la 9-[Morfolinil hidrazona] de Eritromicina y Anhídrido Propiónico, utilizando Acetona como disolvente, con un rendimiento del 85%.

La estructura de este compuesto, así como sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en el Esquema 5.

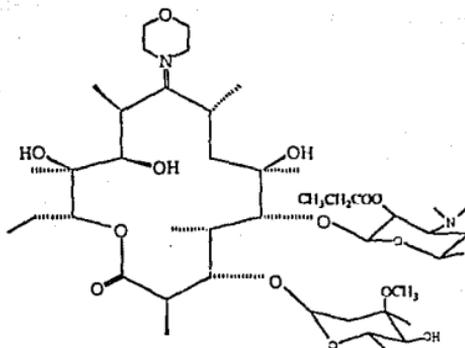
El espectro de infrarrojo presenta bandas de absorción a 3440, 2960, 1735, 1620, 1450, 1360, 1270, 1180, 1150, 1100, 1045  $\text{cm}^{-1}$ , caracterfsticas para la Eritromicina exceptuando las bandas a 1620, 1270, 1180  $\text{cm}^{-1}$ .

La diferencia entre este derivado y su compuesto de partida se observa en el espectro de infrarrojo en el cual la banda a 1735  $\text{cm}^{-1}$  tiene un incremento y los sobretonos caracterfsticos de los ésteres a 1270 y 1180  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que las bandas a 3440, 2960, y 1620  $\text{cm}^{-1}$ , tienen un decremento tal que la banda a 1620  $\text{cm}^{-1}$  casi no puede ser observada.

En el espectro de RMNP aparece una nueva senal a 4.75 ppm que corresponde al H-2' desplazado a campos más bajos debido a que se encuentra unido al carbono vecino al éster introducido.

Por lo anteriormente descrito y la diferencia en Pf., actividad óptica y Rf, se comprueba que la estructura propuesta es la indicada en el Esquema 5.

ESQUEMA 5.



P f. = 122-125°C con descomposición.

$[\alpha]_{25}^D = -40.50$

IR 3440, 2960, 2920, 1735, 1620, 1450, 1360, 1270, 1180, 1150, 1100, 1045  $\text{cm}^{-1}$ . (Espectro 6).

RMNP(90Mhz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.85(3H,t,  $\text{CH}_3$ -15); 1.5(3H,s,  $\text{CH}_3$ -6); 2.3(6H,s,  $\text{NMe}_2$ ); 3.3(3H,s,  $\text{OCH}_3$ ); 4.0(1H,s, H-1'); 4.4(1H,d, H-1''); 4.75(1H,t, H-2''); 4.86(1H,dd, H-13); 5.1(1H,d, H-11). (Espectro 6a).

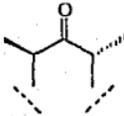
## EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

La evaluación de la actividad antibacteriana, se realizó mediante un ensayo biológico de difusión en agar.

Para todos los derivados obtenidos el ensayo se realizó con un inóculo de *Sarcina Lutea* ATCC 9341, de acuerdo con el método descrito en la USP XXII<sup>10</sup>.

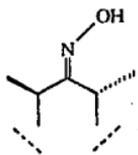
Con el fin de minimizar la variabilidad de la respuesta en estas pruebas, se decidió aplicar la muestra del antibiótico al azar por medio de un diseño de cuadro latino<sup>11</sup>. Los resultados obtenidos para cada derivado sintetizado se informan en la tabla 5 y están expresados en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de Eritromicina, substancia de referencia. Entre parentesis se encuentra la medida del halo de inhibición expresada en milímetros.

Tabla 5.- Evaluación de la actividad antimicrobiana de derivados de Eritromicina.

Derivado	Estructura	Actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ Eritromicina)
Eritromicina		986 (20.6)

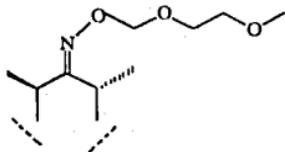
Oxima de  
Eritromicina

500 (16.0)



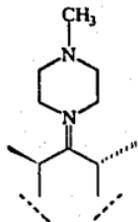
Roxitromicina

551 (17.2)



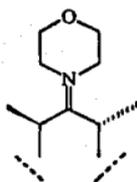
9-[4-Metil-  
piperazinil]-

176 (13.32)



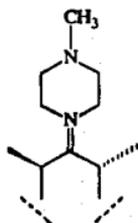
9-(Morfolinil)-

128 (11.7)

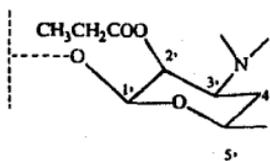


9-[4-Metil-  
piperazinil]-  
-2'-propionil-

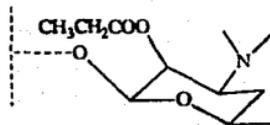
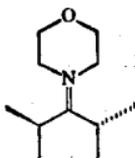
66 (8.9)



9-(Morfolinil)-  
-2'-propionil-



65 (8.85)



Por los resultados obtenidos se observa que al sustituir el carbonilo en C-9 por un grupo oxima, la actividad biológica *In vitro* decrece notablemente con respecto a la Eritromicina, lo cual confirma que el grupo carbonilo en C-9 es esencial para la actividad biológica<sup>12</sup>.

Sin embargo, la Roxitromicina presenta una mayor actividad *In vivo* con respecto a la Eritromicina, debido posiblemente a que la Roxitromicina sea activada por el metabolismo del organismo.

En la formación de hidrazonas en C-9 se observa una disminución evidente en la actividad biológica *In vitro* con respecto a la Eritromicina y los derivados con el grupo (=N-O-R), probablemente el cambio del átomo de Oxígeno por el átomo de Nitrógeno afecte la formación de uniones con el sitio receptor y también por una posible interacción dipolo-dipolo que influya la unión no covalente entre el sitio receptor y el fármaco.

La diferencia en actividad antibacteriana entre la 9-[4-Metil piperazinil] y la 9-(Morfolinil), se debe posiblemente a la reactividad química o a su arreglo espacial, el cual puede interferir en la unión del fármaco con el sitio receptor.

La actividad entre la 9-[4-Metil piperazinil],-2'-propionil y la 9-(Morfolinil),-2'-propionil, fué prácticamente igual, con lo cual se confirma el hecho de que la esterificación de la posición C-2' de la desosamina, produce compuestos que presentan *In vitro* actividad biológica casi nula. Sin embargo estos compuestos pueden sufrir modificaciones en el organismo para dar los derivados hidrolizados libres<sup>4</sup>.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo la metodología convencional utilizando placas de vidrio recubiertas con Silica-gel 60 F-254 de Merck, utilizando en todos los derivados el mismo eluyente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-Hexano}/\text{NH}_4\text{OH}$ . 60:5:15:0.3, respectivamente.

Las constantes físicas y espectroscópicas fueron determinadas en los siguientes aparatos:

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos.

Los espectros de infrarrojo fueron realizados en un instrumento Perkin-Elmer Mod. 599B, en pastilla de KBr (Facultad de Química).

Los espectros de RMNP, se determinaron en un espectrómetro de RMN EM-390 Casa VARIAN, utilizando como disolvente  $\text{CDCl}_3$  y como referencia interna TMS. Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm). (Facultad de Química).

La rotación óptica fue determinada en un polarímetro Perkin-Elmer 241, a una temperatura de  $18^\circ\text{C}$ , utilizando una lámpara de radiación de Sodio.

La evaluación de la actividad biológica fue realizada por el método de difusión en agar, utilizando un diseño de cuadro latino. El medio antibiótico utilizado fue el DIFCO No.1 y el microorganismo de prueba fue *Sarcina Lutea* ATCC 9341.

Los reactivos y disolventes se emplearon en su forma comercial, ya fuese grado analítico o industrial. La Eritromicina que se empleó fue proporcionada de un lote industrial con un título HPLC de 968  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

## PARTE EXPERIMENTAL

### Síntesis de Oxima de Eritromicina.

En un matraz bola de 3 bocas equipado con canastilla de calentamiento, agitación mecánica y refrigerante se adiciona una mezcla de 5 g (6 mmol) de Eritromicina en 10 ml de Metanol, la mezcla se calienta a 60°C adicionando una solución de Hidroxilamina al 50% calentando a 50°C, ajustando el pH a 6.3 con Ácido Fórmico al 88% y calentando a reflujo por 15 horas. Al término de este tiempo la mezcla se enfría a 10°C por 30 minutos, la solución se filtra y el sólido obtenido se lava con 10 ml de una solución fría de Metanol-Agua 1:1. La sal obtenida se trasbasa a un matraz igualmente equipado al anterior conteniendo 15 ml de Agua, la mezcla se agita y se adicionan 30 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 ml de Hidróxido de Amonio concentrado, agitando por 15 minutos para extraer la Oxima libre, el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se remueve a presión reducida, obteniéndose 60% de rendimiento del producto.

La Oxima fundió a 150-152°C con descomposición. Su identificación se realizó por IR (Espectro 1), RMNP (Espectro 1a) y Actividad óptica.

### Síntesis de Roxitromicina.

En un matraz bola debidamente equipado se coloca una mezcla de 1.87 g (2 mmol) de Oxima de Eritromicina, 25 ml de Acetona, 0.94 g de Bicarbonato de Sodio y 0.3 ml de Cl-MEM y se calienta a reflujo en atmósfera inerte, por 16 horas, durante las cuales se adicionan 0.3 ml de Cl-MEM. La mezcla se filtra al vacío y el filtrado se concentra a 1/3 de su

volumen, y se adiciona una solución acuosa de Bicarbonato de Sodio. La mezcla se extrae con Éter. La fase orgánica se seca y se evapora a sequedad, el residuo se purifica por cromatografía en columna flask, utilizando como eluyente Benceno-Trietilamina, se obtiene un rendimiento del 40% de Roxitromicina.

La Roxitromicina fundió a 128-130°C, con descomposición, su identificación se realizó por IR (Espectro 2) y RMNP (Espectro 2a).

#### Síntesis de 9-[(4-Metil piperazinil) hidrazona] de Eritromicina.

En un matraz bola de 3 bocas equipado con canastilla de calentamiento, agitación mecánica, embudo de adición y refrigerante, se coloca una mezcla de 5 g (6 mmol) de Eritromicina 6 ml de Metanol y 5 ml de agua, se adicionan 0.86 g (7 mmol) de 1-Amino-4-metil piperazina ajustando el pH a 6.6 con Ácido Láctico concentrado. La mezcla se calienta a reflujo por 24 horas, al término de este tiempo, la mezcla se enfría primero a 25°C se ajusta el pH a 5.8 y se enfría hasta 10°C por 30 minutos. La suspensión se filtra y el sólido se lava con 10 ml de una solución fría de Metanol-Agua 1:1. La sal obtenida se trasbasa a un matraz igualmente equipado al anterior, conteniendo 15 ml de Agua, la mezcla se agita y se adicionan 30 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  agregando Hidróxido de Amonio hasta pH de 10.2 a 11, agitando por 15 minutos a 30°C, se separan las fases, y la fase orgánica se concentra hasta un tercio de su volumen original. El sólido formado se filtra y se seca al vacío por 3 horas, a 50°C, obteniéndose un rendimiento del 70%.

El producto presentó un  $R_f = 0.333$

### **Síntesis de 9-[Morfolinil hidrazona] de Eritromicina.**

En un matraz bola de 3 bocas, equipado con canastilla de calentamiento, agitación mecánica, embudo de adición y refrigerante se coloca una mezcla de 5 g (6 mmol) de Eritromicina, 6 ml de Metanol y 5 ml de agua, se adicionan 0.76 g (7 mmol) de 4-Amino morfolina ajustando el pH a 6.6 con Ácido Láctico concentrado, la mezcla se calienta a reflujo por 24 horas. Al término de este tiempo la mezcla se enfría a 25°C, ajustando el pH a 5.8 y se enfría hasta 10°C por 30 minutos. La suspensión se filtra y el sólido se lava con 10 ml de una solución fría de Metanol-Agua 1:1. La sal obtenida se trasbasa a un matraz igualmente equipado al anterior, conteniendo 15 ml de Agua, la mezcla se agita y se adicionan 30 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> agregando Hidróxido de Amonio concentrado hasta pH 10.2 A 11, agitando por 15 minutos a 30°C, y separando las fases. La fase orgánica se concentra hasta un tercio de su volumen original, el sólido se filtra y se seca al vacío por 3 horas a 50°C, obteniéndose un rendimiento del 68.5%.

El producto presentó un Rf = 0.443

### **Síntesis de 9-[(4-Metil-piperazinil),-2'-propionil] hidrazona de Eritromicina.**

En un matraz bola de 3 bocas, equipado con canastilla de calentamiento, agitación mecánica, embudo de adición, termómetro y refrigerante se coloca una mezcla de 5 g (6.01 mmol) de 9-[(4-Metil piperazinil) hidrazona] de Eritromicina en 30 ml de Acetona y lentamente 0.86 g (6.6 mmol) de Anhídrido Propiónico con agitación, la mezcla se

calienta ligeramente a una temperatura entre 30-35°C durante 2 horas. Al término de este tiempo la mezcla se enfría a 10°C y se neutraliza con 2 ml de Hidróxido de Amonio concentrado, seguido por 45 ml de Agua destilada, formandose un precipitado, el cual es filtrado y lavado con 10 ml de Agua, el producto se seca al vacio a 70°C durante 5 horas.

El producto presentó un  $R_f = 0.605$  Rend. = 96%.

### **Síntesis de 9-[(Morfolinil,-2'-propionil) hidrazona] de Eritromicina.**

En un matraz bola de 3 bocas, equipado con canastilla de calentamiento, agitación mecánica, embudo de adición, termómetro y refrigerante, se agrega una mezcla de 5 g (6.1 mmol) de 9-[(Morfolinil) hidrazona] de Eritromicina en 30 ml de Acetona y lentamente 0.87 g (6.7 mmol) de Anhídrido Propiónico con agitación, la mezcla se calienta ligeramente a una temperatura entre 30-35°C durante 2 horas, al término de este tiempo la mezcla se enfría a 10°C y se neutraliza con 2 ml de Hidróxido de Amonio concentrado, y se agregan 45 ml de Agua destilada, formandose un precipitado, el cual es filtrado y lavado con 10 ml de Agua, el producto es secado al vacio a 70°C durante 3 horas.

El producto presentó un  $R_f = 0.579$  Rend. = 85%.

### **Obtención de Cloruro de (2-metoxietoxi) metilo (Cl-MEM).**

En un matraz bola de 3 bocas, equipado con un tubo de vidrio con terminal porosa, llave de paso y agitación magnética, se adicionan 120 ml de Metil Cellosolve y 50.5 g de 1,3,5-trioxano, la mezcla se enfría a 15°C,

burbujeandole Cloruro de Hidrógeno con un flujo de 15 ml/seg durante 3 horas o cuando el volumen de la solución se incremente en un 30%. Al término de la reacción son adicionados 735 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  agitando la mezcla por 10 minutos a  $20^\circ\text{C}$ , las fases son separadas, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se remueve a presión reducida obteniendose 90% de rendimiento.

Su identificación se realizó por RMNP (Espectro 7).

## EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Se pesaron 50 mg del derivado en cuestión, se transfirieron a un matraz aforado de 50 ml, se adicionó metanol hasta disolución y se llevó al aforo con el mismo disolvente, (concentración = 1000 mg/ml)<sup>10</sup>.

Se tomó 1 ml de la solución y se aforó a 100 ml con una solución amortiguadora de fosfatos pH 8. A partir de esta solución, se prepararon dos diluciones distintas:

Dilución 1: Se tomaron 10 ml de la solución, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml y se llevó al aforo con una solución amortiguadora de fosfatos pH 8.

Dilución 2: Se tomaron 10 ml de la solución, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 ml y se llevó al aforo con una solución amortiguadora de fosfatos pH 8.

Se prepararon placas de 30 x 30 cm de medio Antibiótico No. 1 DIFCO, inoculado con *Sarcina Lutea* ATCC 9341, de las cuales se hicieron 64 zonas de aplicación en un arreglo de 8x8, ordenadas al azar bajo un diseño de cuadro latino 11.

Finalmente se aplicaron 0.1 ml de cada dilución, junto con una muestra estándar de Eritromicina que fué previamente diluída en las mismas condiciones que la de la muestra del derivado en estudio, sobre las zonas previamente determinadas al azar. Se incubaron a 35°C, durante 18 horas y se midieron los halos de inhibición, comparando con los producidos por la muestra de referencia de Eritromicina.

## **CONCLUSIONES.**

1.- Se obtuvieron los derivados de Eritromicina deseados:

Oxima de Eritromicina.

Roxitromicina.

9-[(4-Metil piperazinil) hidrazona] de Eritromicina.

9-(Morfolinil hidrazona) de Eritromicina.

9-[(4-Metil piperazinil)-2'-propionil hidrazona] de Eritromicina.

9-[(Morfolinil-2'-propionil) hidrazona] de Eritromicina.

2.- Una vez obtenidos éstos derivados se logró la contribución al establecimiento de las bases a nivel laboratorio, de un proceso a escala piloto de Roxitromicina.

3.- Con la aportación de los datos obtenidos en las pruebas realizadas, se estableció que las mejores condiciones para la síntesis de este tipo de derivados son:

Tiempo de reacción: 24 horas.

Temperatura de reacción: 70°C.

pH de reacción: 6.6.

pH de precipitación del producto con mayor pureza: 5.8.

Mejor sistema de disolvente de reacción: 1.2 volúmenes de Metanol y 1 volumen de Agua con respecto a la Eritromicina base.

4.- De los derivados sintetizados, incluyendo a la Roxitromicina, todos presentaron una menor actividad antibacteriana *In vitro*, comparados con la Eritromicina. Sin embargo se ha informado que la Roxitromicina presenta mayor actividad *In vivo*, por lo que sería recomendable realizar la evaluación farmacológica en estas condiciones de los derivados sintetizados.

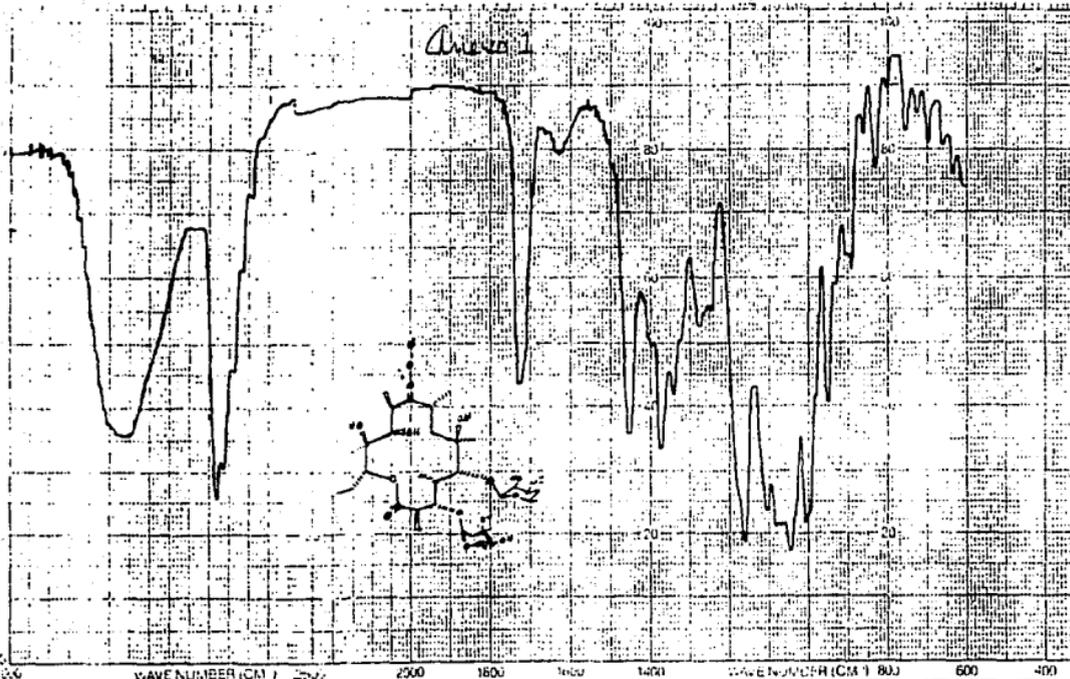
## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Burger, A.; Medicinal Chemistry; Third Edition Part I: A-Wiley-Interscience; USA (1970).
- 2.- Wolff, E.M.; Burger's Medicinal Chemistry; Fourth Edition; Part II; A-Wiley-Interscience; USA (1970).
- 3.- Korolkovas, A.; Essentials of Medicinal Chemistry; Second Edition; A-Wiley-Interscience; USA (1976).
- 4.- Osol-Pratt; The United States Dispensatory; 27th Edition; J.B. Lippincott Company; USA (1972)
- 5.- Purcell, W.P. Baco; and et; Strategy of Drug Design. A Molecular; Guide to Biological Activity; John-Wiley & Sons.; N.Y. (1973).
- 6.- Goodman, S.L. y Gilman, G.A.; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.; Séptima Edición; Ed. Médica Panamericana; México (1986).
- 7.- Patent Specification 1,100,504; Britanic (1966).
- 8.- European Patent Application: 0 342 990; A2 (1989).
- 9.- United States Patent; 4,349,545 (1982).
- 10.- USP XXII 1488 (1990).
- 11.- Hewitt, W. Microbiological Assay; An Introduction to Quantitative Principles an Evaluation Academic Press; N.Y. (1977).
- 12.- Massey H.E; Kitchell S.B.; Martin D.L. and Gerzon K.; Journal of Medicinal Chemistry; 17 105 (1974).
- 13.- Elks, J. and Ganellin.; R.C.Dictionary of Drugs; Chemical Data Structures and Bibliographies; Chapman and Hall; Scientific Data Division; Great Britain (1990).

- 14.- Q.F.B. Hernández Covarrubias C.M.  
Síntesis y Relaciones Cuantitativas Estructura-actividad de algunas Rifamicinas con Propiedades Antibacterianas.; Tesis de grado (maestría); Facultad de Química. UNAM (1991).
- 15.- Franklin J.T. and Snow A.C.; *Biochemistry of Antimicrobial Action*; Third Edition; Chapman and Hall; London (1981).
- 16.- *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Volume 10.
- 17.- Foye, O.W.; *Principles of Medicinal Chemistry*; Third Edition Lea and Febiger; London (1989).
- 18.- Pretsch, E.; Clerc, T.; Seil, J.; Simon, W.; *Tablas para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos*; Editorial Alhambra; Segunda Edición; España (1989).
- 19.- Corey et al.; *Tetrahedron Letters*; 846 (1986).
- 20.- Hamilton-iller, S.M.T.; *J. Antimicrob. Chemother.*; 29 (2) 1417
- 21.- Le Noc, P; Croize, J. et al; *Pathol. Biol.*; 37 (5bis) 553-9
- 22.- Fernández, P.B.; Hardy D.J; *Drugs Exp. Clin Res.*; 14 (7) 445-51
- 23.- Hand, W.Lee; King-Thompson, Nevard; *J. Antimicrob. Chemother.*; 23 (5) 681-9
- 24.- Pecquet, Sophie. et al; *Antimicrob. Agents Chemother.*; 35 (3) 548-52

PURIN ELMER 9

CHART 152-1042

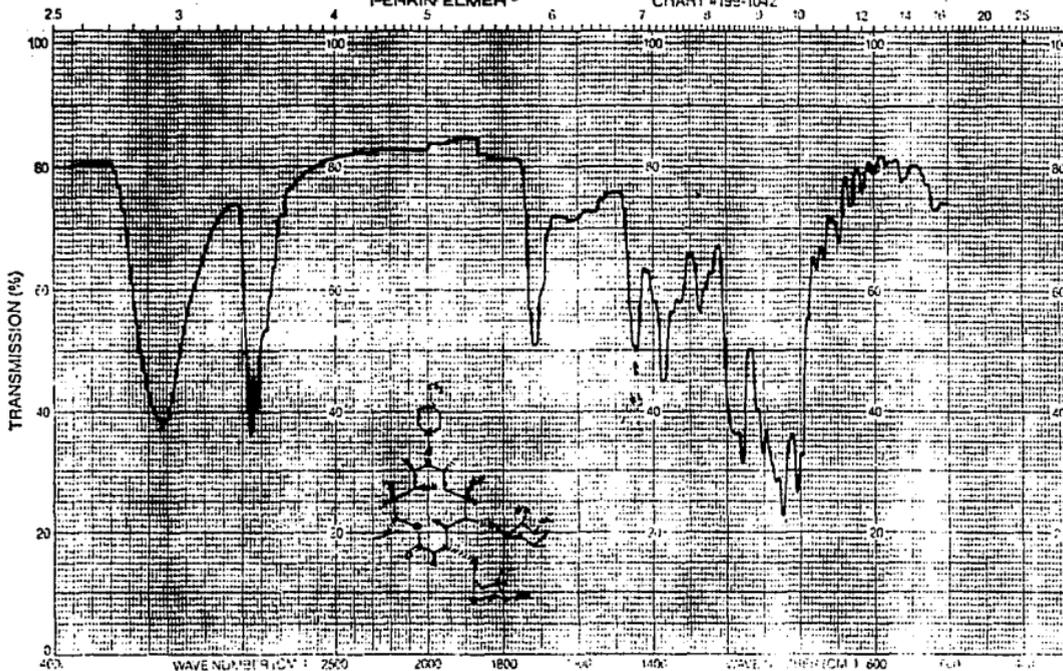


EXPAN. _____	EXPANSION _____	ORDINATE _____	SCAN TIME _____	REP. SCAN _____	SINGLE BEAM _____
SUPPLY _____	WAVELENGTH _____	ABS _____	MULTIPLIER _____	TIME DRIVE _____	OPERATOR <u>Amf</u> DATE _____
SAMPLE <u>Amf</u>	PREPARED <u>Amf</u>	IDENTIFIED <u>Amf</u>	SOLVENT _____	CELL PATH _____	REFERENCE <u>Amf</u>
ORIGIN _____	SPECTRO _____		IDENTIFICATION _____	_____	

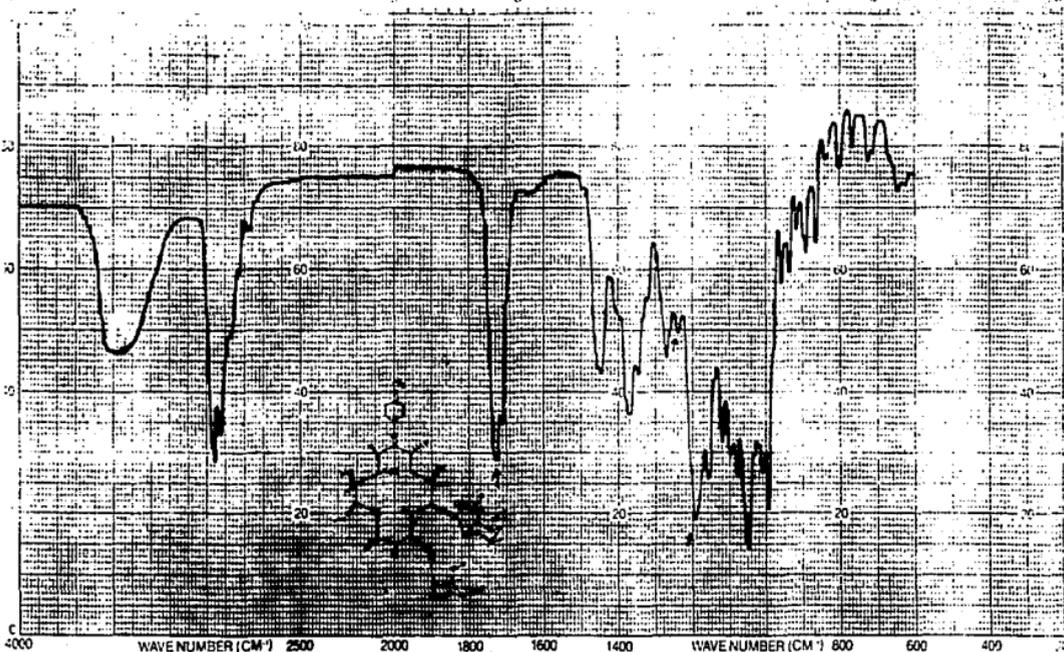


PERKIN ELMER<sup>®</sup>

CHART #199-1042



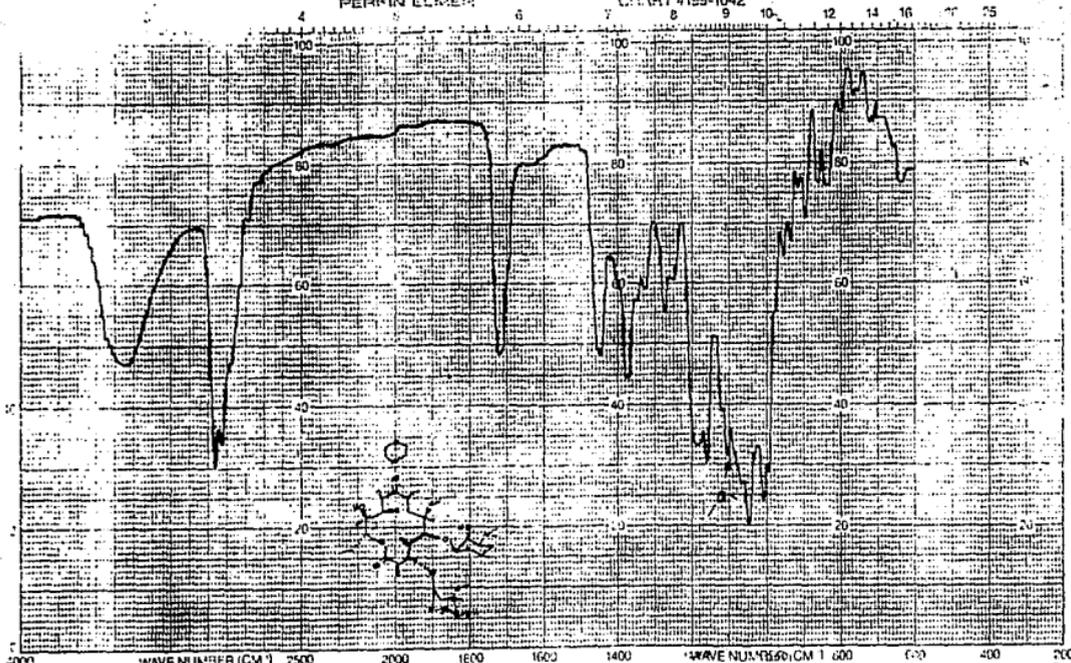
ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>12</u>	REF. SCAN <u>      </u> SINGLE BEAM <u>      </u>
EXPANSION <u>      </u>		EXPANSION <u>      </u>		MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE <u>      </u>
SAMPLE REF. <u>      </u>		S.T. <u>      </u>		SCALE IN GRAM <u>N</u>	OPERATOR <u>Amoroso</u> DATE <u>4-1</u>
SAMPLE <u>ROWA 107</u>		REMARKS <u>Yastilla</u>		SOLVENT <u>KBr</u>	CELL <u>      </u>
PREP. <u>Carro Rodriguez M.</u>		ESPECTRO <u>3</u>		CONCENTRATION <u>      </u>	REFERENCE <u>      </u>



ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>12</u>	REP. SCAN <u>SINGLE REA...</u>
EXPANSION	EXPANSION	%T	ABS	MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE
SUPPRESSION				SLIT PROGRAM <u>N</u>	OPERATOR <u>Chula</u> DATE <u>10-5-71</u>
SAMPLE <u>ROWA 115</u>	REMARKS <u>Paulista</u>	SOLVENT <u>KBr</u>		CELL PATH <u>-</u>	
ORIGIN <u>Don Rodriguez W</u>	<u>Espectro 4</u>	CONCENTRATION <u>-</u>		REFERENCE <u>all</u>	

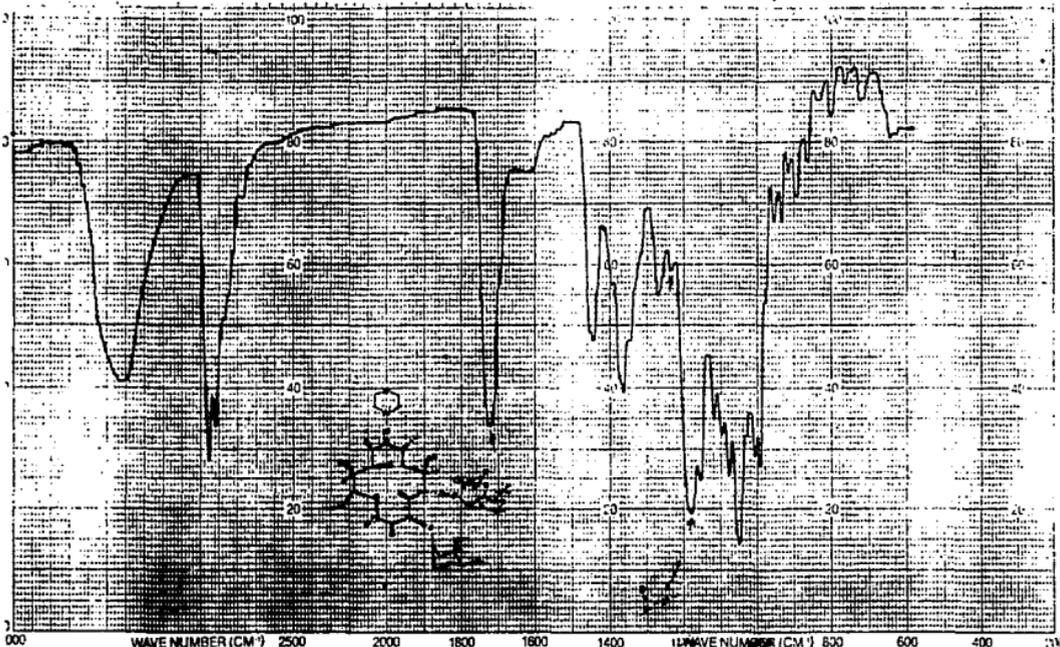
PERKIN ELMER

CHART #199-1042



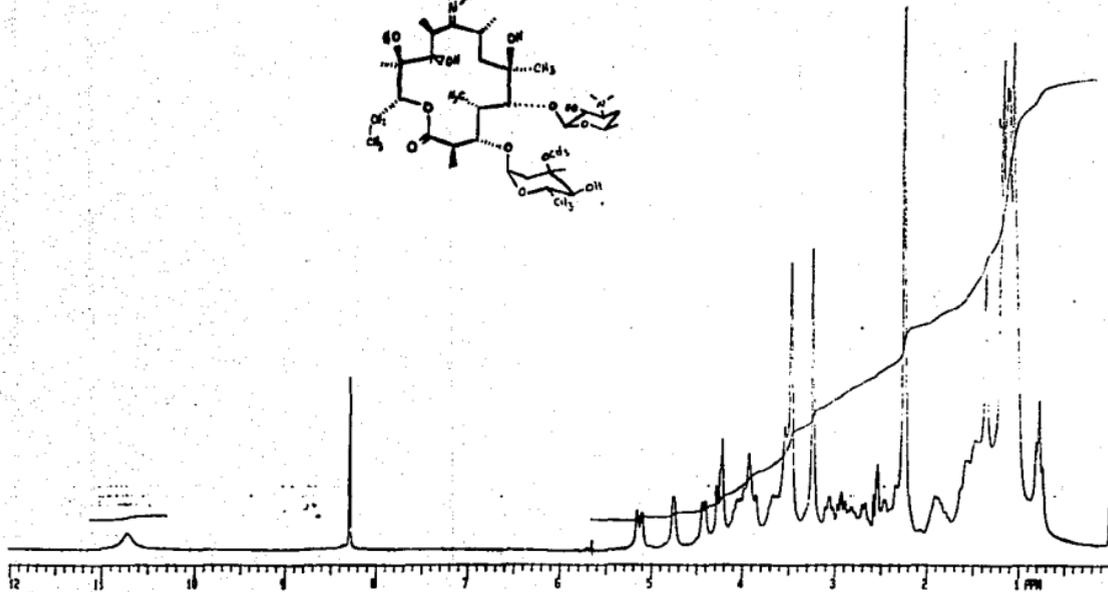
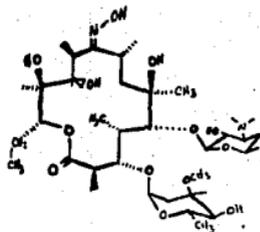
ABSCISSA		ORDINATE		SCAN NO. <u>11</u>		REF. SCAN		SING. BEAM	
EXPANSION		EXPANSION		MULTIPLIER		TIME DRIVE		<u>2-1X-91</u>	
SUPPL. METHOD		%T		SLIT PROGRAM <u>N</u>		OPERATOR <u>Bluba</u>		DATE	
SAMP. F.		REMARKS <u>Estilla</u>		SOLVENT <u>EtBr</u>		CELL PATH		REFERENCE <u>air</u>	
<chem>OC1=CC=C(R)C=C1</chem> <i>Aceto. Kodiyog</i>		<u>ABN 111</u>		<u>ESPECTRO 5</u>					

PERKIN ELMER



ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>12</u>	REP SCAN _____	SINGLE BEAM
EXPANSION _____	EXPANSION _____	MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE _____	OPERATOR <u>Ampon</u> DATE <u>10-9-77</u>		
SUPPRESSION _____	%T _____	SLIT PROGRAM <u>N</u>				
SAMPLE <u>RDWA 117</u>	REMARKS <u>partida</u>	SOLVENT <u>KBr</u>	CELL PATH _____			
ORIGIN <u>Don Rodriguez W</u>	<u>Espectro 6</u>	CONCENTRATION _____	REFERENCE <u>dm</u>			

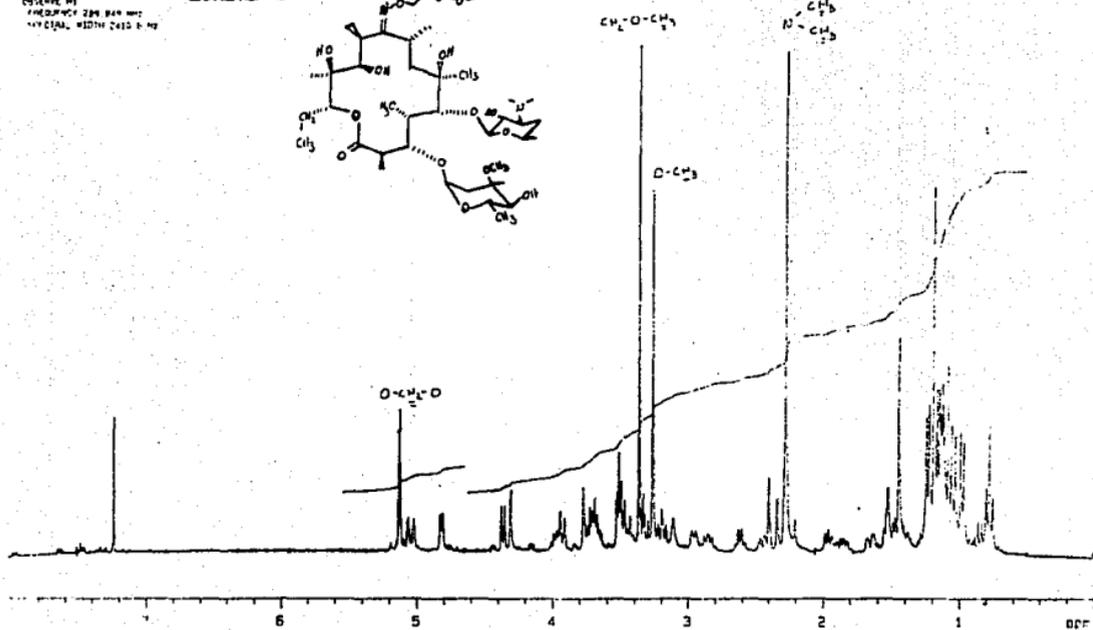
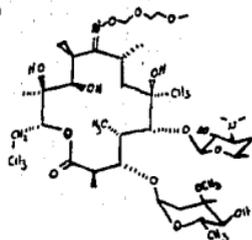
Anexo 2



Espectro. la

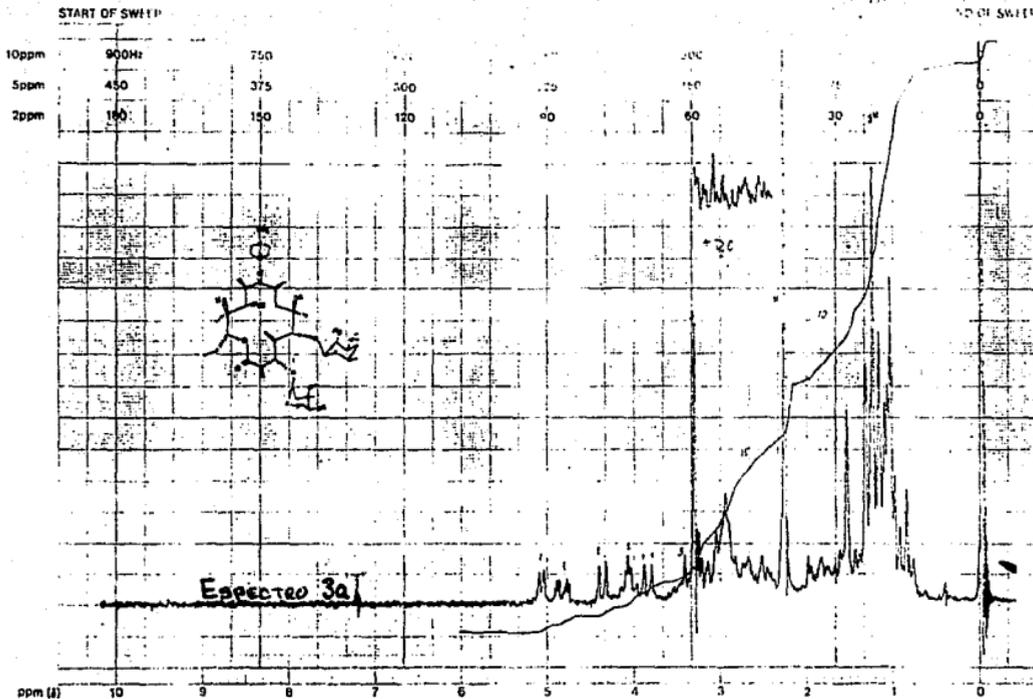
200 MHz en CDCl<sub>3</sub>  
PULSADO 90  
FREQÜENCIA 200 MHz  
RESOLUCIÓN 0.1 Hz

Anexo 6



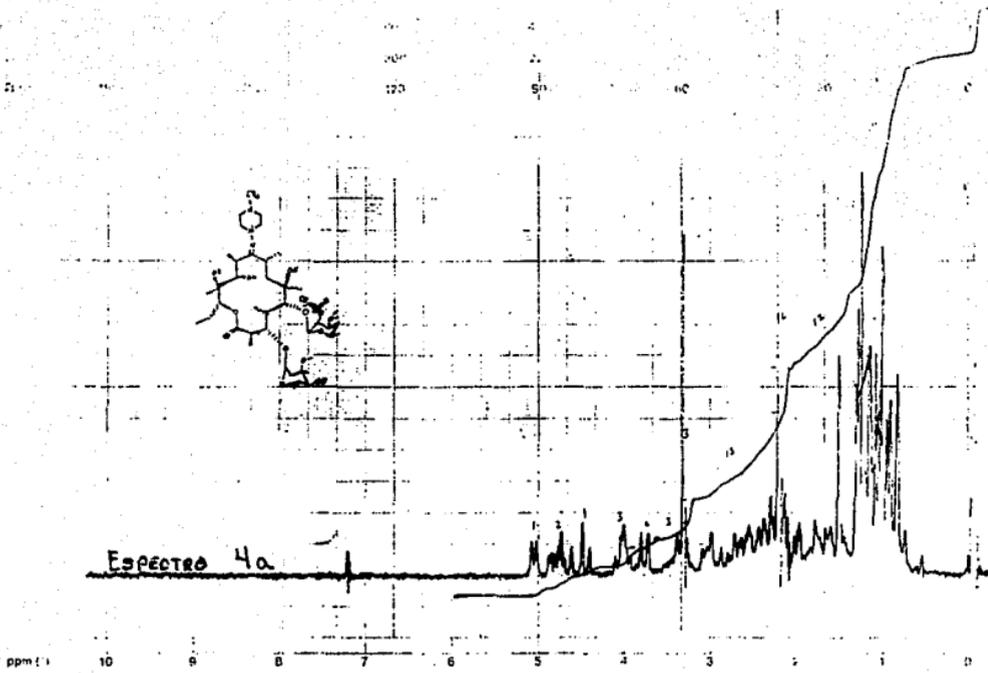
ESPECTRO 2a

varian instrument division  
palo alto, california



LOCK POS. _____ ppm	SPECTRUM AMPL. <u>2</u> x 10 <sup>10</sup>	SWEEP TIME <u>5</u> min	NUCLEUS <u><sup>1</sup>H</u>	SAMPLE <u>0.1g</u>	OPERATOR <u>Alf...</u>
LOCK POWER _____ mG	FILTER <u>0.05</u> sec	SWEEP WIDTH <u>10</u> ppm	ZERO REF. <u>FMS</u>	<u>C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub></u>	DATE <u>6-24-57</u>
DECOUPLE POS. _____ ppm	RF POWER <u>0.05</u> mG	END OF SWEEP <u>0</u> ppm	SAMPLE TEMP <u>0</u> °C	SOLVENT: <u>CDCl<sub>3</sub></u>	SPECTRUM NO. <u>12712</u>

Varian instrument division Palo Alto, California



LOCK POS	ppm	SPECTRUM AMPL	2.4	0.00	SWEEP TIME	5	min	NUCLUS	<sup>1</sup> H	SAMPLE	0.100	OPERATOR	W. J. ...
LOCK POWER	mG	FILTER	0.05	sec	SWEEP WIDTH	1.0	ppm	ZENITH	THS	DATE	12-1-62		
DECOUP. POWER	ppm	RF POWER	0.05	mG	END OF SWEEP	0	ppm	SAMPLE TEMP.	A				

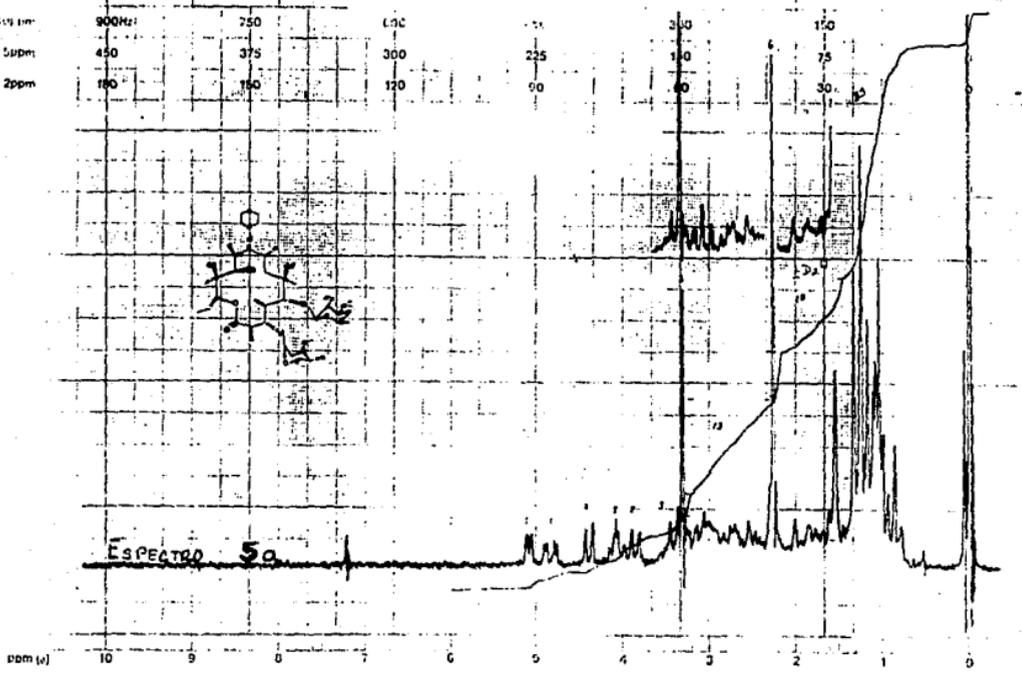
Varian Instrument Division  
 Palo Alto, California



STATUS OF SWEEP

900Hz	750	600
450	375	300
150	150	120

300	150
150	75
00	30



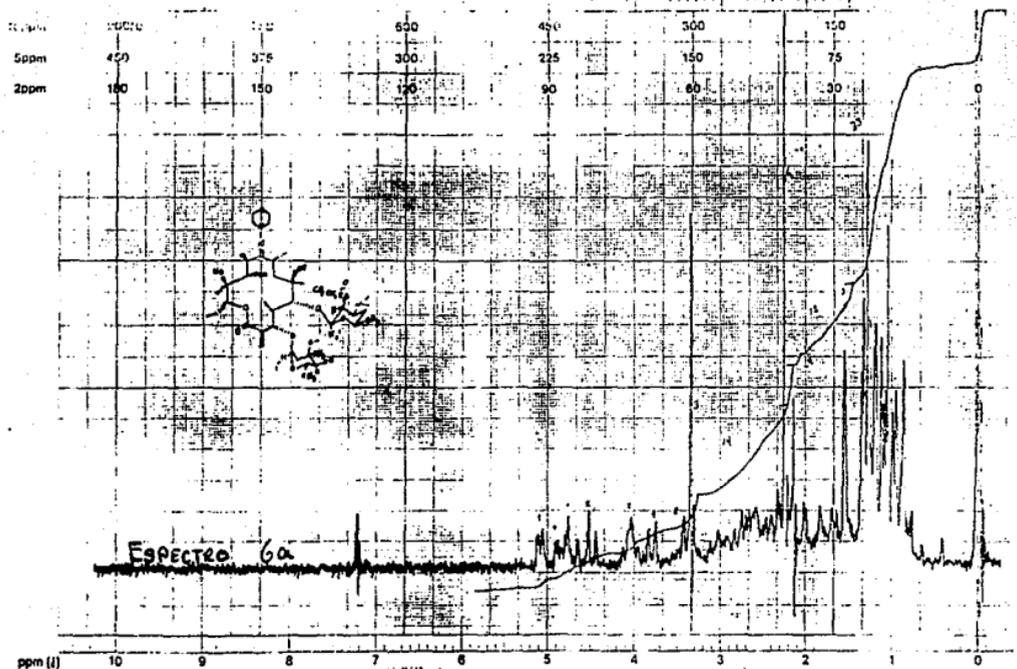
ESPECTRO 5a

LOCK POS \_\_\_\_\_ ppm    SPECTRUM AMPL. 6.5    SWEEP TIME \_\_\_\_\_ min    NUCLEUS H    SAMPLE Carb  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG    FILTER 9.05 sec    SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ ppm    ZERO REF. TMS    CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ndm    RF POWER 9.05 mG    END OF SWEEP \_\_\_\_\_ min    SAMPLE TEMP. 1 C    SOLVENT: CD<sub>2</sub>  
 OPERATOR H. J. ...  
 DATE 3-10-57  
 SPECTRUM NO. 158

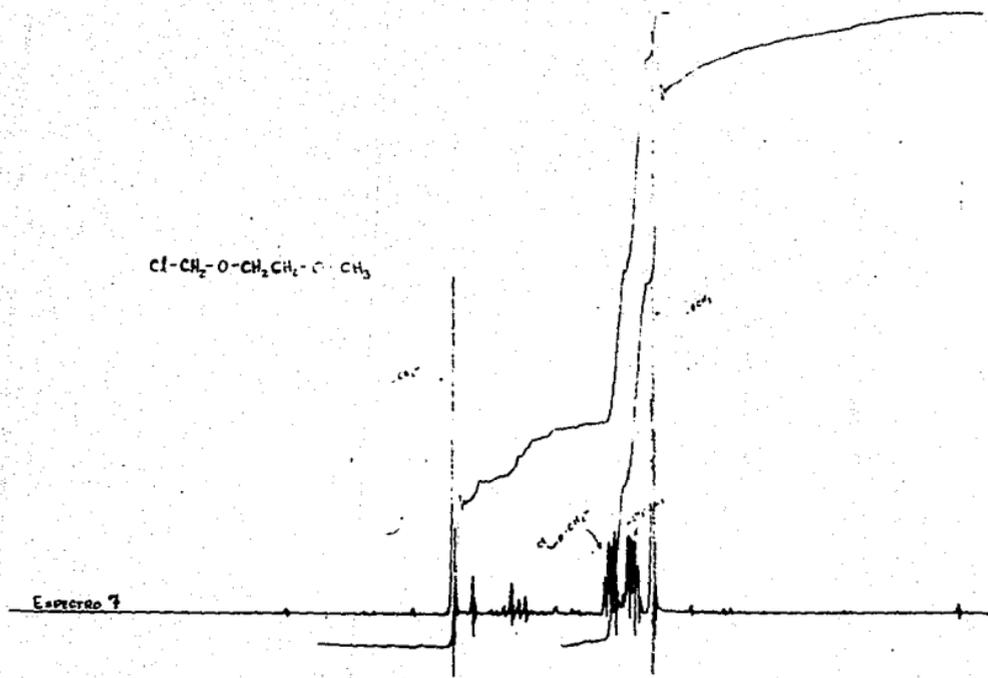
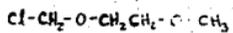
Varian Instrument Division  
 Palo Alto, California

Varian Instrument Division

palo alto, california

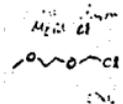


LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 3.6x1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H SAMPLE: 6a  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS 2006-11-7 OPERATOR W. J. ...  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm RF POWER 8.09 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. A °C SOLVENT: CDCl<sub>3</sub> 2.1 ml 9.4 DATE 12-18-72  
 DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG SPECTRUM NO. 15867



100°C  
100%  
100%

15  
100%



6011 NMR SPECTROMETER