

00550 /



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION INDUSTRIAL DE ROXITROMICINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(QUIMICA FARMACEUTICA)

P R E S E N T A :

QFB FRANCISCO AGUILAR PEREZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE DR. ÁNGEL GUZMÁN SÁNCHEZ
VOCAL DR. MARIO FERNÁNDEZ ZERTUCHE
SECRETARIO DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
PRIMER SUPLENTE DRA. MARTHA EUGENIA ALBORES VELASCO
SEGUNDO SUPLENTE DR. RAYMUNDO CRUZ ALMANZA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: INDUSTRIA DE ANTIBIÓTICOS
FERMIC, S.A. DE C.V.

A) ASESOR

DR. GUSTAVO GARCÍA DE LA MORA

B) SUSTENIANTE

QFB FRANCISCO AGUILAR PÉREZ

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: QFB FRANCISCO

Aguilar Pérez

FECHA: 27 agosto 2002

FIRMA: [Firma manuscrita]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	PÁG
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 INDUSTRIA FARMACÉUTICA	7
2.2 AISLAMIENTO DE ERITROMICINA	12
2.3 PURIFICACIÓN DE ERITROMICINA	15
2.4 FORMACIÓN DE DERIVADOS	16
2.5 PREPARACIÓN DE ESTERES	17
2.6 PREPARACIÓN DE OXIMAS	18
2.7 O-ALQUILACIÓN DE OXIMAS	19
2.8 PREPARACIÓN INDUSTRIAL DE ERITROMICINA	20
3. OBJETIVOS	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 PREPARACIÓN DE LA SAL DE AMONIO DE ERITROMICINA	27
4.2 LIBERACIÓN DE ERITROMICINA DE SU SAL DE AMONIO	33
4.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ERITROMICINA POR REEXTRACCIÓN CONTINUA	35
4.4 PREPARACIÓN DE ETILSUCCINATO DE ERITROMICINA	40
4.5 PREPARACIÓN DE LA OXIMA DE ERITROMICINA	43
4.6 PREPARACIÓN DE ROXITROMICINA	47
4.7 PREPARACIÓN DEL CLORURO DE METOXIETOXIMETILO, MEMCI	51
5. PARTE EXPERIMENTAL	52
6. CONCLUSIONES	68
7. BIBLIOGRAFÍA	70
8. ESPECTROSCOPIA	73

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. INTRODUCCIÓN

La eritromicina¹ fue descubierta en 1952 por McGuire y colaboradores, logró rápida aceptación como un antibiótico efectivo por vía oral en el tratamiento de enfermedades provocadas por estafilococos, estreptococos β -hemolítico, e infecciones por neumococos y contra cepas que desarrollaron resistencia a la penicilina, tetraciclina y estreptomina. Exhibe acción bacteriostática o bactericida, según el microorganismo y la concentración del fármaco. Las bacterias gram-positivas acumulan 100 veces más eritromicina que los microorganismos gram-negativos. La eritromicina como otros antibióticos macrólidos inhibe la síntesis de proteínas por unión a la unidad 50 S ribosomal de microorganismos sensibles, su toxicidad es relativamente baja. Rara vez produce efectos indeseables graves. La eritromicina es un polvo blanco amargo, inestable a pH menor o igual a 4.

Del caldo filtrado de fermentación de *streptomyces erythreus* se aíslan eritromicina tipo A, B y C. La eritromicina está constituida por un anillo lactónico, el cual es un resto de aglicón de 14 miembros, llamado eritronólido, al que se une por el átomo de carbono número 3, a través de un enlace glicosídico el carbohidrato llamado cladinosa (2,3,6-trideoxi-3-metoxi-3-C-metil-L-ribohexosa). Se une al carbono número 5 del eritronólido el aminoazúcar desosamina (3,4,6-trideoxi-3-dimetilamino-D-xilohexosa). La amina terciaria de la desosamina confiere el carácter básico a la eritromicina, de la que se forman sales de amonio de ácidos débiles para su aislamiento y purificación.

Con la finalidad de mejorar la farmacocinética de la eritromicina, en particular su estabilidad y su absorción, así como para enmascarar el desagradable sabor amargo, se han preparado varios ésteres de este fármaco. En el mercado se encuentran el etilsuccinato, el estearato y el estolato de eritromicina, entre otros. Es una característica de estos productos el liberar in vivo a la eritromicina base, por lo que se pueden considerar como profármacos, siendo su espectro antibacteriano semejante o igual al del fármaco de origen.

Entre los derivados comerciales de segunda generación de la eritromicina están roxitromicina y claritromicina. La roxitromicina ha mostrado ser más estable en medio ácido y absorberse más rápidamente. La eritromicina y sus derivados se prescriben principalmente en el tratamiento de enfermedades del aparato respiratorio. A partir del descubrimiento del *Helicobacter pylori* como agente causal de úlceras gástricas, se ha empleado roxitromicina o claritromicina, en el tratamiento combinado para su erradicación.

La fortaleza de un país la sustenta su economía y dentro de las diversas ramas de ésta, la correspondiente al sector farmacéutico participa en la atención de las necesidades nacionales del sector salud. Por lo que todo esfuerzo dirigido a desarrollar la industria farmoquímica nacional, en las actuales condiciones de competencia internacional de precio y calidad, debe ser auspiciado y apoyado decididamente.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2. ANTECEDENTES

2.1 Industria farmacéutica.

Actualmente la industria farmacéutica en el ámbito mundial enfrenta el gran reto de la innovación acelerada, la investigación clínica es campo de una competencia sin precedentes. Sucede cada vez con mayor frecuencia, que un medicamento de última generación o compuesto derivado para el tratamiento de una enfermedad o padecimiento, es lanzado al mercado por más de una compañía farmacéutica en un término menor a un año. En una conferencia pública celebrada el 15 de junio de 1997, el entonces vicepresidente ejecutivo de Ciencia y Tecnología de Eli Lilly y Cía., Dr. August M. Watanabe, estimó que desarrollar un fármaco requiere de una inversión en el proceso de investigación y desarrollo de cada nuevo producto farmacéutico de 300 a 500 millones de dólares (140 millones más que en 1990), esto sólo en capital, descontando que se cuenta con grupos de trabajo interdisciplinarios de excelencia y se posee una infraestructura en instalaciones, equipo y materiales de primera. El tiempo promedio de desarrollo de un medicamento es de 15 años (casi el doble de hace 15 años), tiempo en que se han probado y sintetizado 5 mil compuestos relacionados, y en el que también aparecen medicamentos equivalentes por parte de la competencia. Cabe destacar que sólo en Estados Unidos de América 6 laboratorios farmacéuticos² (Pfizer, Merck & Co., Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, American Home Products, Schering-Plugh) invirtieron en 1999, 11 mil 402 millones de dólares en investigación y desarrollo². En 1999,

las compañías farmacéuticas de Estados Unidos registraron 1,252 patentes. En los últimos diez años la industria estadounidense participó, en promedio, con las dos terceras partes del financiamiento de la investigación y desarrollo, y realizó el 75% de la investigación aplicada y desarrollo tecnológico. Del total de los gastos en investigación y desarrollo, en general, el 17% se destinan a investigación básica (que principalmente se realiza en las universidades e instituciones superiores), aproximadamente el 22% se dirige a la investigación aplicada, y alrededor de 61% al desarrollo tecnológico. Según un estudio desarrollado entre 1975-1998 por el profesor Baruch Lev³, la inversión de un dólar en investigación y desarrollo en el área de química en E. U. A., produce beneficios promedios de 2.60 dólares.

El panorama de las industrias de manufactura nacional, dentro de las cuales se encuentra la industria farmacéutica no es muy favorable, y exhibe obstáculos para trabajos de investigación debido a: 1) los altos costos que implica esta actividad y la pobre participación de las empresas en este rubro. Conforme a los Indicadores de Actividades Científicas y Tecnológicas del Conacyt⁴, la planta productiva nacional está constituida por 2.8 millones de empresas, 99% tienen un nivel de competitividad emergente (de sobrevivencia), 3,377 cuentan con ISO 9000, 2 550 son exportadoras y menos de 300 hacen algún tipo de investigación y desarrollo; 2) las grandes compañías que dominan el mercado son transnacionales y realizan la mayoría de sus estudios de investigación y desarrollo en sus países de

origen: Hacia estas empresas ligadas a la exportación se dirige también la inversión extranjera directa que recibe el país. En el 2000 la contribución del Grupo Farmacéutico al Comercio Exterior de Bienes de Alta Tecnología arrojó un saldo deficitario de 438.8 millones de dólares (22% al déficit nacional, en este rubro); 3) fuerte dependencia industrial de la tecnología externa La Balanza de Pagos Tecnológicos de México en el 2000, fue deficitaria en 363.6 millones de dólares; lo que ha llevado a un constante incremento en los índices de precios al productor y a una consecuente reducción de la competitividad de nuestros productos Otro parámetro de la dependencia tecnológica industrial está reflejado en el origen de las Patentes del periodo 1990-2000, de 5,519 patentes concedidas en México, sólo 2 % pertenecen a mexicanos; 4) la mayoría de las empresas nacionales se concentra principalmente en el desarrollo de formas farmacéuticas, y las pocas que realizan síntesis o preparación de los principios activos, lo hacen con tecnologías desarrolladas en el extranjero, por lo que los fármacos que producen no son de última generación; 5) a partir de la crisis de 1995 gran proporción de las industrias se encuentran con fuertes adeudos bancarios (documentados en moneda extranjera) y fiscales: las principales empresas cotizadas en la Bolsa Mexicana de Valores no cuentan con una opción de financiamiento en pesos que ayude a disminuir el riesgo cambiario; 6) alta obsolescencia tecnológica; el sector industrial ha señalado que en microempresas se registra un atraso hasta de 50 años. El índice de cambio

estructural en la industria mexicana, que mide el avance del desarrollo industrial, se redujo 33.5 % en el último lustro, hecho que refleja el abandono y el rezago tecnológico de nuestras industrias; 7) el Gasto Nacional en Ciencia y Tecnología en el 2000 ascendió a 3,428.1 millones de dólares (0.41% del PIB), contribuyendo el Gobierno con el 76% y el Sector privado con 24%. En México se tiene 23 científicos por cada diez mil habitantes; 8) según el "International Institute for Management Development", de 49 países estudiados en su desempeño económico, México ocupa el lugar 41 en competitividad.

El trabajo experimental descrito en esta tesis se inscribe dentro del esfuerzo que realiza la Facultad de Química de la UNAM, para ofrecer opciones de solución factibles en beneficio de la industria farmoquímica, a través del desarrollo tecnológico experimental, que posibilite no solamente una adecuada implantación y optimización de tecnologías adquiridas por una empresa, sino también el desarrollo de tecnología propia. Entendiendo que por la magnitud de los retos y los recursos disponibles es deseable y posible integrar grupos de trabajo universidad-empresa para atender problemas específicos.

Una empresa puede agregar nuevos productos a través de la adquisición y/o el desarrollo de los mismos: La opción de la adquisición a su vez toma tres formas⁵: la compañía puede i) adquirir nuevas empresas; ii) comprar patentes de otras compañías, o iii) puede adquirir una licencia o

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

concesión de otra empresa. En los tres casos la empresa no desarrolla nuevos productos, sino simplemente adquiere los derechos de productos ya existentes. La ruta del nuevo producto puede tomar dos formas. La compañía puede i) desarrollarlos en sus propios laboratorios, o ii) puede contratar servicios con investigadores independientes, universidades o empresas. Por nuevos productos se entenderá: 1) productos originales o innovadores para el mundo; 2) productos de penetración al mercado; 3) productos complementarios a los existentes en línea; 4) productos mejorados; 5) productos modificados; 6) productos de reposicionamiento, y 7) productos de nuevas marcas.

En el presente trabajo se abordaron 3 necesidades que puede tener una empresa farmoquímica, a saber: 1) **innovación** de un proceso clave, 2) **optimización** de una técnica de preparación de un producto, y 3) **desarrollo** industrial de la metodología de preparación de un nuevo producto de línea. Considerando las siguientes acepciones, **innovación**: introducción de modificaciones sustanciales a una secuencia de pasos de una metodología vigente en planta, que aseguren superar algún factor fijo (rendimiento, costo, tiempo, etc) a corto plazo, limitante de la producción; **optimización**: a partir de una técnica estándar actual de producción, y previa estimación de la magnitud y dirección de los efectos de uno o más factores controlables, determinar las condiciones que conducen a un mayor rendimiento y calidad

del producto; desarrollo: a partir de i) información técnica a nivel laboratorio (alguna de ésta patentada), ii) caracterización (experimental) de las variables que limitan el escalamiento a planta, idear un procedimiento de modificación o sustitución de las variables limitantes que permitan elaborar una metodología optimizada de producción a nivel industrial (know how).

2.2 Aislamiento de eritromicina.

La extracción líquido-líquido es un procedimiento útil para aislar y/o purificar compuestos orgánicos de naturaleza ácida o básica⁶⁷. La extracción es un proceso de separación en el que un soluto (o más) se distribuyen en una relación definida entre dos líquidos inmiscibles, en equilibrio a una temperatura en particular. Considerando un soluto A que está en equilibrio entre una fase acuosa y una fase orgánica, obtenemos una constante que es llamada *coeficiente de distribución* o *coeficiente de partición*, K,

$$K_D = [A]_{\text{org}} / [A]_{\text{aq}}$$

en donde [A] es la concentración del soluto A en la fase acuosa u orgánica. En términos termodinámicos rigurosos, lo que se mantiene constante es la relación entre las actividades del soluto A, en lugar de la relación entre las concentraciones; pero como en general los coeficientes de actividad son raramente conocidos se emplean generalmente las concentraciones.

Debido a que la base orgánica en la fase acuosa puede establecer un equilibrio dinámico,



y por tanto existir más de una especie en la fase acuosa, se emplea la *relación de distribución*

$$D = \frac{[\text{RNR}'_2]_{\text{org}}}{[\text{RNR}'_2]_{\text{aq}} + [\text{R}^+\text{NHR}'_2]_{\text{aq}}} \quad (1)$$

$$D = \frac{\text{amina total en la fase orgánica}}{\text{amina total en la fase acuosa}}$$

Considerando que las aminas orgánicas son bases débiles que en forma de su ácido conjugado con carga ($\text{pH} < \text{pKa}$) son más solubles en la fase acuosa que en la fase orgánica, en tanto que la amina libre ($\text{pH} > \text{pKa}$) es más soluble en la fase orgánica que en la acuosa, tenemos las siguientes expresiones de equilibrio:

$$K_{\text{DRNR}'_2} = \frac{[\text{RNR}'_2]_{\text{org}}}{[\text{RNR}'_2]_{\text{aq}}} \quad (2)$$

$$K_b = \frac{[\text{R}^+\text{NHR}'_2]_{\text{aq}} [\text{OH}^-]_{\text{aq}}}{[\text{RNR}'_2]_{\text{aq}}} \quad (3)$$

$$[\text{R}^+\text{NHR}'_2]_{\text{aq}} = \frac{K_b [\text{RNR}'_2]_{\text{aq}}}{[\text{OH}^-]_{\text{aq}}} \quad (4)$$

sustituyendo (4) en (1)

$$D = \frac{[\text{RNR}'_2]_{\text{org}}}{[\text{RNR}'_2]_{\text{aq}} + \left[\frac{K_b [\text{RNR}'_2]_{\text{aq}}}{[\text{OH}^-]_{\text{aq}}} \right]} \quad (5)$$

sustituyendo (2) en (5) tenemos

$$D = \frac{K_{DRNR}^2}{1 + (K_b / [OH^-]_{aq})} \quad (6)$$

De esta forma se obtiene una expresión que muestra la dependencia de la relación de distribución con respecto al coeficiente de distribución de la base débil, su constante de ionización y el pH de la fase acuosa

Si un volumen V_1 del caldo de fermentación filtrado conteniendo W_0 gramos de la eritromicina base neutra disuelta, es extraído repetidamente con volúmenes puros V_2 de un solvente orgánico inmiscible en agua. Y considerando que W_1 gramos es el peso de la eritromicina que permanece en la fase acuosa, después de la primera extracción, entonces la concentración en la fase acuosa es W_1 / V_1 g por ml, y $(W_0 - W_1) / V_2$ g por ml en la fase orgánica, por lo que el coeficiente de partición se puede expresar como,

$$K = \frac{W_1 / V_1}{(W_0 - W_1) / V_2}$$

por lo que W_1 será,

$$W_1 = W_0 \frac{KV_1}{KV_1 + V_2}$$

después de n extracciones W_n gramos permanecerán en la fase acuosa,

$$W_n = W_0 \left(\frac{KV_1}{KV_1 + V_2} \right)^n$$

No obstante los cálculos teóricos, por existir en el caldo de fermentación más de un soluto, por ser el disolvente orgánico de extracción no totalmente inmiscible en la fase acuosa y por requerirse una pureza FDA (Food Drug Administration) para la eritromicina; se determinó empíricamente la naturaleza, volumen y número de reextracciones a emplear con el disolvente.

2.3 Purificación de eritromicina⁸.

La naturaleza básica de la eritromicina permite su aislamiento por formación de (a) sales insolubles en el disolvente de extracción, precipitándola por la adición un ácido orgánico débil (ácido láctico), o por la adición de una sal y un ácido orgánico débil (tiocianato de sodio y ácido acético); (b) sales solubles en el disolvente de extracción, por adición de un ácido orgánico débil (ácido acético), que permite reextraer la sal a una fase acuosa. Debido a la degradación de la eritromicina en medios acuosos ácidos, se debe controlar el pH y la temperatura de reextracción

Aumentando el pH de la fase acuosa de reextracción es posible: (a) precipitar la eritromicina de la solución acuosa, o (b) reextraer nuevamente la eritromicina en medio básico a un segundo disolvente orgánico, del cual se pueda precipitar directamente.

La precipitación de la eritromicina como sal obligará a liberarla posteriormente. Por el método de las reextracciones sucesivas se pretende

(a) reducir el tiempo de operación, (b) hacer más manejable el proceso por reducción sucesiva de los volúmenes de las soluciones, (c) obtener un producto más puro por cristalización.

La precipitación⁹ de un soluto por adición de un reactivo o por cristalización es un método de aislamiento y purificación recomendable a nivel industrial, siempre y cuando se obtengan sólidos cristalinos con grado aceptable de pureza y sin grandes inconvenientes en el paso de filtración. La precipitación es una técnica de separación en la que las fases implicadas son sólido-líquido, generándose la fase sólida "in situ". Es una técnica distributiva de control termodinámico. Las ventajas de las separaciones por precipitación son (a) simplicidad, (b) bajo costo, (c) facilidad de manejar grandes cantidades de muestra en una sola operación.

2 4 Formación de derivados de Eritromicina.

Una vez que se determina la estructura o fórmula química de un compuesto con actividad farmacológica terapéutica, los laboratorios farmacéuticos inician trabajos investigación para sintetizar derivados de los grupos funcionales reactivos que posee la molécula original con la finalidad de: (a) ampliar los beneficios de la patente, (b) obtener fármacos que puedan exhibir mayor potencia, selectividad o estabilidad y causar los menores efectos secundarios que el principio activo original, o al menos tener más formas equivalentes, (c) mantener una posición competitiva en el mercado

farmacéutico De esta manera se generan los fármacos de diferente generación.

En la formación de derivados, la eritromicina posee como grupos funcionales más reactivos la amina terciaria y el grupo hidroxilo del resto de la desosamina, y el grupo funcional carbonilo de cetona del macrociclo.

2.5 Preparación de ésteres.

Entre los métodos más comunes y económicos para la preparación de ésteres^{10 11}, partiendo de un grupo hidroxilo, se encuentran las reacciones de esterificación con un ácido carboxílico o anhídrido, catalizada por ácidos como HCl, H₂SO₄^{12 13}, BF₃, o la reacción entre un halogenuro de ácido o anhídrido y el alcohol, en presencia de una base.



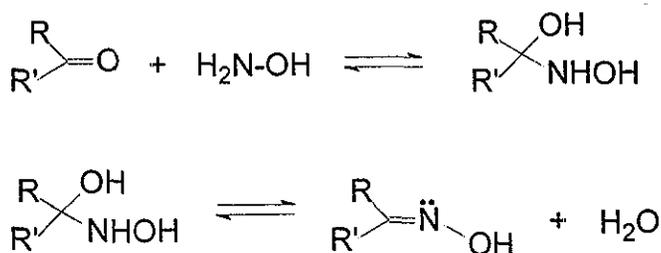
donde Z = OH, Cl

Los cloruros de ácido reaccionan rápidamente con alcoholes primarios y secundarios para dar ésteres en buenos rendimientos. Con alcoholes terciarios en general, para evitar las reacciones colaterales de deshidratación o formación de halogenuros de alquilo, es necesario la

presencia de una base, como una amina terciaria alifática, aromática o heterocíclica, o bases inorgánicas. En compuestos donde existen grupos lábiles al medio ácido, es más conveniente la preparación de ésteres empleando halogenuros de ácido y alcoholes.

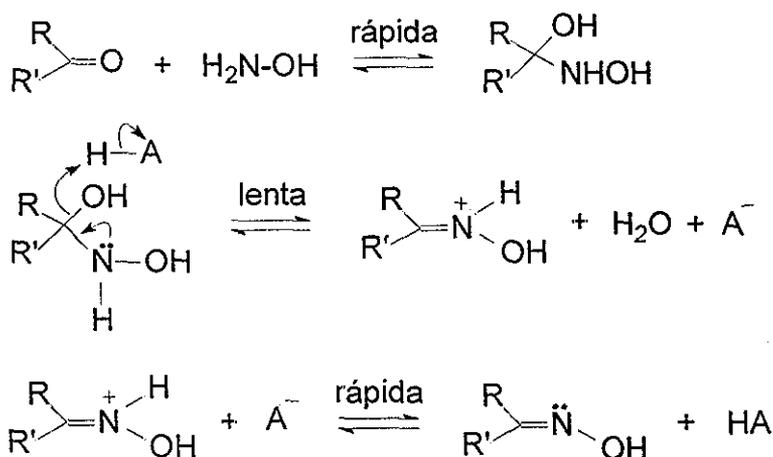
2.6 Preparación de oximas.

La adición de hidroxilamina a grupos carbonilo de aldehídos y cetonas sigue el patrón de adición-eliminación, a través de la formación del intermediario tetraédrico carbinolamina, característico de la adición de aminas y sus derivados, con posterior eliminación de una molécula de agua.



La velocidad de reacción^{14 15} es dependiente del pH, y éste se busca ajustar a un valor que favorezca la eliminación de agua, $\text{pH} < 4$, a la vez que no disminuya el carácter nucleofílico de la hidroxilamina, $\text{pH} > 4$. En general, una mayor acidez favorece la deshidratación pero dificulta el paso de adición, porque solamente la hidroxilamina no protonada es reactiva¹⁶. Para

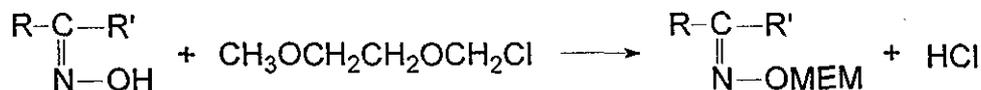
compuestos fuertemente básicos, $pK_{a_{BH^+}}$ 6 a 10 del tipo de la hidroxilamina, se acepta que el paso de la adición no requiere catálisis ácida, por lo que el paso determinante de la reacción es la eliminación (deshidratación)^{17 18}.



2.7 O-alkilación de oximas.

Las oximas son alquiladas con halogenuros¹⁹ o sulfatos de alquilo, la N-alkilación²⁰ puede ser un subproducto de reacción. La proporción entre el éter de oxima (O-alkilación) y la nitrona (N-alkilación) depende de la naturaleza del agente alquilante y las condiciones de reacción. No obstante, el cloruro de metoxietoximetilo, MEMCl, se ha utilizado como grupo protector de alcoholes^{21 22 23} (primarios, secundarios y terciarios) dando lugar a altos

rendimientos de los éteres correspondientes, también es un buen agente alquilante de otros grupos funcionales.



2.8 Preparación Industrial de Eritromicina.

El proceso fermentativo⁸ comprende el crecimiento de un hongo actinomiceto en un medio de cultivo conteniendo fuentes asimilables de carbohidratos, nitrógeno y sales inorgánicas. El actinomiceto empleado en la fermentación pertenece al género *Streptomyces* del orden Actinomycetales, identificado por Waksman como *Streptomyces erithreus*; registrado como el cultivo número NRRL 2338, en "The Culture Collection of the Northern Regional Research Laboratories at Peoria, Illinois", posteriormente se incorporaron las cepas NRRL 2359, NRRL 2360 y NRRL2361. El microorganismo fue inicialmente aislado de una muestra de suelo obtenida de la ciudad de Lloilo en las islas de Filipinas.

Obtención de eritromicina por fermentación sumergida

La fabricación de eritromicina es un ejemplo del proceso típico de obtención de antibióticos por fermentación. Como en la producción de otros antibióticos en cantidades masivas se emplea el método comercial de la fermentación

aeróbica sumergida, empleando la forma vegetativa del microorganismo para la inoculación de los tanques de producción. El inóculo o "simiente" se prepara por el desarrollo de un cultivo madre del hongo a partir de esporas liofilizadas que se encuentran en un sustrato de agar nutritivo. Varios litros del medio de cultivo, generalmente constituyendo del 5 al 10 % del contenido total, se preparan en una serie de depósitos de siembra y sirven para sembrar una gran cuba de fermentación. Por economía en la producción, obtención de máximos rendimientos del antibiótico y facilidad en el aislamiento de la eritromicina, se prefieren ciertos medios de cultivo y condiciones de fermentación.

Composición promedio del caldo para el inóculo:

Almidón	14.5 Kg
Harina de soya	14.5 Kg
Harina de maíz	4.5 Kg
Cloruro de sodio	4.5 Kg
Carbonato de calcio	2.7 Kg
Agua	946 lt

El caldo es puesto en un tanque de acero de 1,300 litros de capacidad y es esterilizado por calentamiento bajo presión a una temperatura de 120° C. por 30 minutos. Se enfría el caldo esterilizado y se inocula asépticamente con esporas de *Streptomyces erithreus*, NRRL 2338. El microorganismo crece en el tanque a 26° C por un periodo de 45 horas. Durante el periodo de

crecimiento el caldo es agitado y aireado con aire estéril con un flujo de 0.5 volúmenes de aire por volumen de cultivo por minuto.

En un tanque de acero de 6,000 litros se prepara el caldo de fermentación, con la siguiente composición promedio:

Glucosa	113.4	Kg
Almidón	113.4	Kg
Harina de soya	69.4	Kg
Harina de maíz	213.2	Kg
Levadura de cerveza	22.7	Kg
Cloruro de sodio	22.7	Kg
Carbonato de calcio	9.1	Kg
Cloruro de cobalto	113.4	gr
Agua	4,542	lt

Al caldo de fermentación se le ajusta el pH a 6.5, y se esteriliza por calentamiento bajo presión a 120° C. por 30 minutos. El caldo es enfriado y asépticamente se le agrega el inóculo preparado anteriormente. El caldo se mantiene a 26° C. por 4 días. Durante el periodo de crecimiento el caldo se agita y aire estéril se bombea a través del caldo a una velocidad de 0.5 volúmenes de aire por volumen de caldo por minuto. Al final del periodo de crecimiento la actividad antimicrobiana es equivalente a 150 mcg. de eritromicina por mililitro de caldo. Se ajusta el pH del caldo de fermentación a 9.5 con una solución hidróxido de sodio al 40%, y se agrega decalite (3%, peso / volumen) como ayuda filtro para remover el micelio por filtración sobre tambor, obteniéndose un caldo filtrado.

Las cuatro fases principales de la fabricación de eritromicina son:

1. Fermentación.
2. Separación del micelio del caldo fermentado y aislamiento de eritromicina por extracción con un disolvente orgánico.
3. Purificación de eritromicina.

Ensayos de control, almacenamiento y venta.

3. OBJETIVOS

- 1) Desarrollar un método de aislamiento y purificación de eritromicina base libre, a partir de un caldo filtrado de fermentación.
- 2) Optimizar la técnica de elaboración de un derivado comercial.
- 3) Desarrollar el proceso de elaboración de un nuevo derivado de eritromicina a escala de planta.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aislamiento de eritromicina.

Metodología

Los procesos de aislamiento se apoyan en la solubilidad de la eritromicina base o de sus sales de amonio, en fase acuosa o en un disolvente orgánico inmisible con agua. La extracción líquido-líquido a pH ácido o básico ajustado, y la posterior precipitación o cristalización es posible debido a que la eritromicina base es soluble en disolventes orgánicos polares y prácticamente insoluble en agua; en tanto que las sales de amonio son apreciablemente solubles en agua y escasamente solubles en disolventes orgánicos.

Con base en la información descrita en la literatura^{1 8 23} y el estudio de las propiedades físicas y químicas de la eritromicina²⁴ se pueden proponer 2 métodos generales de aislamiento y purificación de eritromicina: por precipitación de una sal de eritromicina y posterior liberación de la base libre, o por cristalización de la eritromicina base libre en un disolvente orgánico

4 1 Precipitación de la sal de amonio de eritromicina.

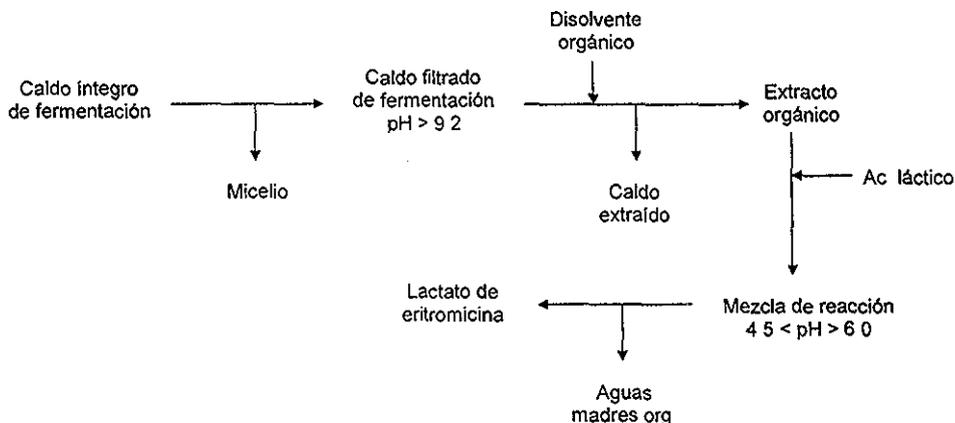
Metodología.

El caldo filtrado de la fermentación de eritromicina se llevó a un pH mayor de 9 y menor de 10.5 con una solución acuosa de una base inorgánica fuerte, extrayéndose posteriormente con un disolvente orgánico polar empleando un volumen de 10 a 20% del volumen del caldo filtrado. El

extracto orgánico después de ser tratado con un agente desecante para eliminar el exceso de agua de saturación de la extracción, se acidula con un ácido orgánico débil precipitándose la sal de amonio de eritromicina. También se puede agregar 1:1 equivalentes de una sal de un ácido débil a la vez que se acidula con un ácido orgánico débil. Se filtra y seca el producto.

Según la proporción y naturaleza de las impurezas disueltas en las aguas madres orgánicas de precipitación, éstas podrían reemplazarse en una o más reextracciones de caldos filtrados de fermentación, o ser neutralizadas y tratadas con un agente desecante para su recuperación.

Diagrama de flujo



Aislamiento de eritromicina
Precipitación del Lactato de eritromicina

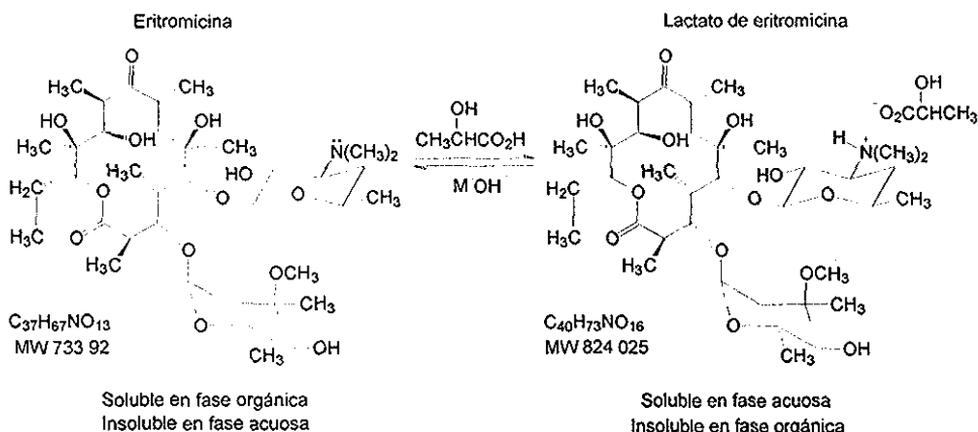


Tabla N° 1

SELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN						
Caldo Filtrado pH 9.5; 5g. act.	Disolvente ext. 250 mililitros	pH	H ₂ O org. mililitros	LEB gramos	HPLC mcg/mg	EB teo g. act.
1000 ml	AcBu	5.5	235	4.36	780	3.4
1000 ml	AcEt	5.5	215	—	—	3.4
1000 ml	CHCl ₃	5.5	187.5	—	—	3.4
1000 ml	MIC	5.5	225	—	—	3.4

Variación del disolvente de extracción del caldo filtrado: AcOBu, AcOEt, CHCl₃ y MIC.
 Rendimiento de la reacción en negritas: 68 % actividad/actividad desde caldo filtrado.
 Abreviaturas: H₂O org. = aguas madres del disolvente orgánico; LEB = lactato de eritromicina, MIC = metil isobutil cetona.

Tabla N° 2

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE EXTRACCIÓN						
Caldo Filtrado pH 9.5; 6 g. act.	AcOBu mililitros	pH	H ₂ O org. mililitros	LEB gramos	HPLC mcg/mg	EB teo g. act.
1000 ml	250	5.5	230	5.25	779	4.09
1000 ml	200	5.5	192	5.32	778	4.14
1000 ml	150	5.5	141	4.23	781	3.30
1000 ml	100	5.5	90	2.63	778	2.05

Variación del volumen de extracción: 25, 20, 15 y 10 VV_{CF}.
 Rendimiento de la reacción en negritas: 69 % actividad/actividad desde caldo filtrado.

Tabla N° 3

FIJACIÓN DEL PH DE EXTRACCIÓN DEL CALDO FILTRADO						
Caldo Filtrado pH9.5; 6.5g. act	AcOBu mililitros	pH	H ₂ O _m org mililitros	LEB gramos	HPLC mcg/mg	EB teo g. act.
pH 10	200	5.5	178	5.27	786	4.14
pH 9.5	200	5.5	192	5.62	786	4.42
pH 9.0	200	5.5	194	5.00	788	3.94

Variación del pH de extracción del Caldo filtrado: 10, 9.5 y 9.0

Rendimiento de la reacción en negritas: 68 % actividad/actividad desde caldo filtrado.

Tabla N° 4

DETERMINACIÓN DEL PH DE PRECIPITACIÓN DEL LEB					
Caldo Filtrado pH9.5; 6.5g. act	AcOBu mililitros	Ac Láctico pH	LEB gramos	HPLC mcg/mg	EB teo. g. act.
1000 ml.	200	5.5	5.61	786	4.41
1000 ml.	200	5.0	5.96	785	4.68
1000 ml.	200	4.5	6.10	730	4.45

Variación del pH de precipitación del LEB: 4.5, 5.0, 5.5

Rendimiento de la reacción en negritas: 72 % actividad/actividad desde caldo filtrado

Tabla N° 5

NÚMERO DE EXTRACCIONES DEL CALDO FILTRADO								
CF 6g.act	S. ext. ₁ ml.	CFexh ₁ mcg/ml	EB ₁ teo g. act.	H ₂ O _m org ₁	S. ext. ₂ ml.	CFexh ₂ mcg/ml	EB ₂ teo. g. act.	H ₂ O _m org ₂
1 lt.	200	400	4.32	192 ml	50	—	—	40
1 lt.	150	1700	3.60	138	50	750	0.38	38

Variación del número de extracciones al caldo filtrado: una extracción más una reextracción

Rendimiento de la reacción en negritas: 72 % actividad/actividad desde caldo filtrado

Abreviaturas: S. Ext.₁ = volumen del disolvente de la primera extracción; S Ext.₂ = volumen del disolvente de la segunda extracción; CF exh₁ = cantidad de eritromicina en el caldo filtrado después de la primera extracción; CF exh₂ = cantidad de eritromicina en el caldo filtrado después de la segunda extracción; H₂O_m org. = volumen del disolvente orgánico después de la extracción.

Tabla N° 6

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE RECIRCULACIONES DEL DISOLVENTE					
Caldo Filtrado pH9.5; 6.4 g. act.	Disolvente ext 200 mililitros	Ac. Láctico pH	LEB gramos	HPLC mcg/mg	EB teo. g. act.
1000 ml.	AcBu dest.	5.0	5.85	787	4.60
1000 ml.	AcOBu recir.₁	5.0	6.11	785	4.80
1000 ml	AcOBu recir. ₂	5.0	5.55	750	4.16

Variación del número de recirculaciones del disolvente de extracción: destilado, recirculado 1 y 2.

Rendimiento de la reacción en negritas: 75 % actividad/actividad desde caldo filtrado.

Tabla N° 7

CONDICIONES DE REACCIÓN ÓPTIMIZADA					
Caldo Filtrado pH9.5	Disolvente ext 0.2 V/V _{CF}	Ac. Láctico pH	LEB gramos	HPLC mcg/mg	EB teo.
9.5	AcBu dest. o AcOBu recir. ₁	5.0	> 1.13 W/W _{EB}	750-790	72-75 %

Variación del número de recirculaciones del disolvente de extracción: destilado

Resultados del Aislamiento de Eritromicina.

En la serie de experimentos se logró determinar:

- 1) La naturaleza del disolvente de extracción: el acetato de butilo fue el mejor tanto en recuperación del lactato de eritromicina, como en la recuperación del volumen original gastado, 95% (tabla N° 1),
- 2) El volumen del disolvente de extracción: a un menor volumen de 0.2 V_{AcOBu}/V_{CF} se recupera menos lactato de eritromicina, y a uno mayor, además de que no se incrementa el rendimiento del producto, aumenta la degradación del disolvente en 7% (tabla N° 2),

- 3) El pH de extracción del caldo filtrado: pH = 9.5, abajo de este pH se extrae menos eritromicina y arriba se incrementa la degradación básica del disolvente de extracción (tabla N° 3),
- 4) El pH de precipitación del lactato de eritromicina: pH = 5, abajo de este pH aumenta ligeramente el peso del lactato de eritromicina precipitado, pero el producto es más impuro, y arriba de ese pH se recupera menos producto (tabla N° 4),
- 5) El número de extracciones del caldo filtrado: aún y cuando el caldo de filtración extraído conserva eritromicina, la recuperación de ésta de las aguas madres es inconveniente por el rendimiento que se obtiene y el mayor tiempo de operación (tabla N° 5),
- 6) El número de recirculaciones del disolvente de extracción: el AcOBu de la primera extracción es tratado con Na_2SO_4 anhidro, y sin destilar, se emplea como disolvente de extracción nuevamente. El rendimiento del proceso aumenta 3%. Si se usa el AcOBu de la segunda extracción para una tercera, el producto obtenido es más impuro y no se incrementa el rendimiento (tabla N° 6).

La identificación de la Eritromicina se hizo por espectroscopia de IR, ^1H , ^{13}C y Masas (ver Espectroscopia de Eritromicina págs 56-57, 74-79).

4.2 Liberación de eritromicina del lactato de eritromicina.

Metodología.

La sal de eritromicina es suspendida entre 10 y 20 volúmenes de una solución de agua-acetona en una proporción 10:1. Se ajusta el pH a la suspensión (aproximadamente 6.5) hasta disolución y se filtra en caso de presencia de impurezas sólidas. Posteriormente, la solución se lleva a pH mayor de 9.0 y menor de 10.5 con una solución acuosa diluida de una base fuerte, precipitándose la eritromicina base libre, la cual se filtra y seca.

Diagrama de flujo

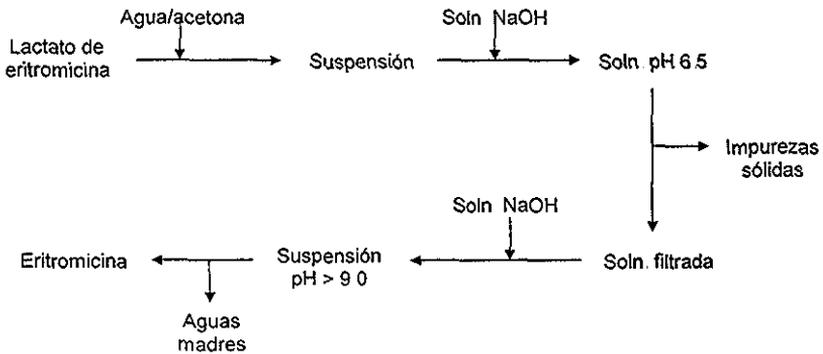


Tabla N° 8

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE AGUA DE SUSPENSIÓN						
EB como LEB 6,41 g, 780mcg/mg	H ₂ O	Codisolvente 0.1:1.0 V/W _{EB}	pH	EB g. peso	HPLC mcg/mg	EB g. act.
5 g. act.	50 ml	Me ₂ CO, 5ml	9.5	4.70	850	4.00
5 g. act.	60 ml	Me₂CO, 6.0ml	9.5	5.10	930	4.75
5 g. act.	75 ml	Me ₂ CO, 7.5ml	9.5	4.82	932	4.5

Variación del volumen de H₂O 10, 12, 15 W/W_{LEB}.

Rendimiento de la reacción en negritas: 95 % actividad/actividad

Abreviaturas: EB = eritromicina; LEB = lactato de eritromicina; V/W_{EB} = volumen del codisolvente a peso de eritromicina.

Tabla N° 9

SELECCIÓN DEL CODISOLVENTE DE PRECIPITACIÓN						
EB como LEB 6,41 g, 780mcg/mg	H ₂ O	Codisolvente 0.1:1.0 V/W _{EB}	pH	EB g. peso	HPLC mcg/mg	EB g. act.
5 g. act.	60 ml	EtOH, 6.0ml	9.5	4.74	938	4.45
5 g. act.	60 ml	Me₂CO, 6.0ml	9.5	4.98	943	4.70
5 g. act.	60 ml	MeOH, 6.0ml	9.5	4.52	941	4.25

Variación del codisolvente de precipitación: Me₂CO, EtOH y MeOH.

Rendimiento de la reacción en negritas: 94 % actividad/actividad

Tabla N° 10

FIJACIÓN DEL PH DE PRECIPITACIÓN						
EB como LEB 6,41 g, 780mcg/mg	H ₂ O	Codisolvente 0.1:1.0 V/W _{EB}	pH	EB g. peso	HPLC mcg/mg	EB g. act.
5 g. act.	60 ml	Me ₂ CO, 6.0ml	10.5	5.07	938	4.76
5 g. act.	60 ml	Me₂CO, 6.0ml	10.0	5.07	938	4.76
5 g. act.	60 ml	Me ₂ CO, 6.2ml	9.5	4.80	938	4.50

Variación del pH precipitación: 10.5, 10.0 y 9.5

Rendimiento de la reacción en negritas: 95 % actividad/actividad.

Resultados de la Liberación de la eritromicina del lactato de eritromicina.

Las tres series de experimentos permitieron determinar:

- 1) El volumen de agua de suspensión empleando un 10%, V/VH₂O (tabla N° 8), de codisolvente: con de 12.0 V/W_{EB}, se logra un mejor resultado,
- 2) La naturaleza del codisolvente: la acetona es el mejor codisolvente (tabla N° 9),
- 3) El pH de precipitación: a pH 9.5 se obtiene un 95% de recuperación de la eritromicina (tabla N° 10).

4.3 Aislamiento y purificación de eritromicina por extracciones continuas.

Metodología

El extracto orgánico de la primera extracción, S_{ext 1}, del caldo filtrado es reextraído en frío (5 a 15°C) a pH ácido (4 a 6) con agua, S_{ext 2}, empleando un volumen de 30 a 40 % V/V_{Sext 1}. El extracto acuoso ácido puede a su vez

- 1) reextraerse a pH básico (pH<9), con un segundo disolvente orgánico polar, S_{ext 3}, 7 a 15 % V/V_{Sext 2}, que una vez tratado con sulfato de sodio anhidro, al enfriar cristaliza la eritromicina base libre, o
- 2) a la fase acuosa se le agrega acetona en una proporción de 10 a 15 %, precipitándose la eritromicina al elevar el pH alrededor de 9.5. Se filtra y seca el producto.

Diagrama de flujo

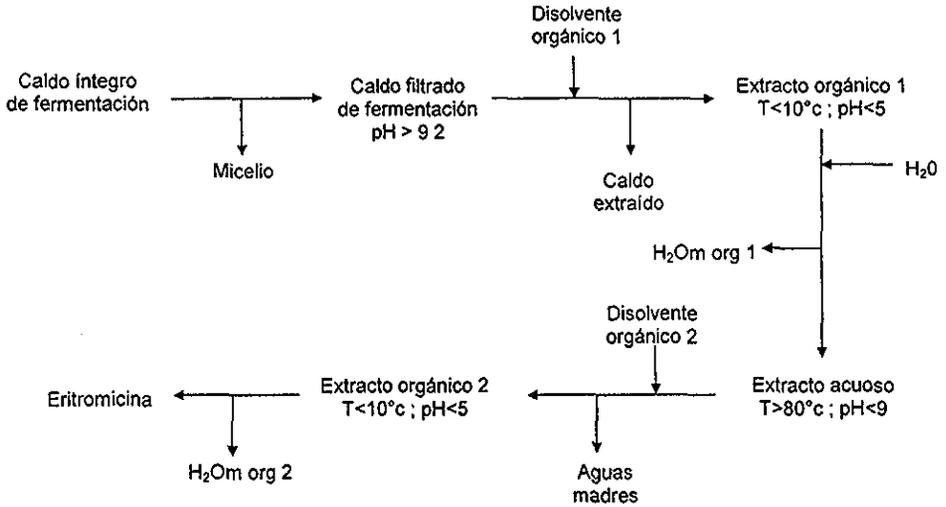


Tabla N° 11

DETERMINACIÓN DEL PH DE REEXTRACCIÓN							
EB/CF 5.7 g/lit	$S_{ext.1}$, AcOBu	$S_{ext.2}$, H ₂ O 0.35:1 V/V	AcOH pH	$S_{ext.3}$, AcOBu	LEB g. peso	HPLC mcg/ml	EB g.act.
5 lt.	1 lt.	0.350 lt.	6.0	0.5 lt.	—	—	—
5 lt.	1 lt.	0.350 lt.	5.5	0.5 lt.	—	—	—
5 lt.	1 lt.	0.350 lt.	5.0	0.5 lt.	—	—	—
5 lt.	1 lt.	0.350 lt.	4.5	0.5 lt.	23.81	790	18.81
5 lt.	1 lt.	0.350 lt.	4.0	0.5 lt.	23.75	792	18.81

Variación del pH de reextracción: 6.0, 5.5, 5.0, 4.5 y 4.0

Rendimiento de la reacción en negritas: 66 % actividad/actividad desde el caldo filtrado.

Abreviaturas: EB = eritromicina; CF = caldo filtrado; $S_{ext.1}$ = volumen del acetato de butilo empleado en la primera extracción; $S_{ext.2}$ = volumen del agua empleado en la segunda extracción; $S_{ext.3}$ = volumen del disolvente orgánico empleado en la tercera extracción.

Tabla N° 12

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE AGUA DE REEXTRACCIÓN							
EB/CF 5.7 g/lit	S _{ext.1} , AcOBu	S _{ext.2} , H ₂ O V/V S _{ext.1}	AcOH pH	S _{ext.3} , AcOBu	LEB g. peso	HPLC mcg/ml	EB g.act.
5 lt.	1 lt.	0.400 lt.	4.5	0.5 lt.	24.96	794	19.82
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	0.5 lt.	25.06	791	19.82
5 lt.	1 lt.	0.200 lt.	4.5	0.5 lt.	17.34	791	13.72
5 lt.	1 lt.	0.100 lt.	4.5	0.5 lt.	13.45	793	10.67

Variación del volumen de agua de reextracción: 40, 31.5, 20 y 10 % V/V_{Sext.1} Temp. ext. 10°c

Rendimiento de la reacción en negritas: 65 % actividad/actividad desde el caldo filtrado

Tabla N° 13

FIJACIÓN DE LA TEMPERATURA DE REEXTRACCIÓN 2								
EB/CF 5.9 g/lit	S _{ext.1} , AcOBu	S _{ext.2} , H ₂ O 0.31:1 V/V	AcOH pH	Temp.	S _{ext.3} , AcOBu	LEB g. peso	HPLC mcg/ml	EB g.act.
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	15° C	0.5 lt.	24.26	790	19.17
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	10° C	0.5 lt.	24.26	790	19.17
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	5° C	0.5 lt.	24.20	792	19.17

Variación de la temperatura de reextracción: 15°, 10° y 5° c.

Rendimiento de la reacción en negritas: 65 % actividad/actividad desde el caldo filtrado.

Tabla N° 14

SELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN 3								
EB/CF 6.2 g/lit	S _{ext.1} , AcOBu	S _{ext.2} , H ₂ O 0.31:1 V/V ₁	AcOH pH	Temp.	S _{ext.3} , 110 ml	EB g. peso	HPLC mcg/ml	EB g.act.
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	10° C	CHCl₃	23.08	940	21.7
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	10° C	CH ₂ Cl ₂	22.34	940	21.0
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	10° C	AcOBu	—	—	—

Variación del disolvente de extracción 3: CHCl₃, CHCl₂ y AcOBu.

Rendimiento de la reacción en negritas: 70 % actividad/actividad desde el caldo filtrado.

Tabla N° 15

SELECCIÓN DEL VOLUMEN DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN 3								
EB/CF 6.0 g/lit	S _{ext.1} , AcOBu	S _{ext.2} , H ₂ O 0.31:1 V/V ₁	AcOH pH	Temp	S _{ext.3} , CHCl ₃	EB g. peso	HPLC mcg/ml	EB g.act.
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	10° C	110 ml	22.34	940	21.0
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	10° C	91.5 ml	23.94	940	22.5
5 lt.	1 lt.	0.315 lt.	4.5	10° C	79 ml	22.34	940	21.0

Variación del volumen del disolvente de reextracción 3, CHCl₃: 35, 29 y 25% V/V S_{ext.2}

Rendimiento de la reacción en negritas: 75 % actividad/actividad desde el caldo filtrado

Tabla N° 16

VARIACIÓN DEL VOLUMEN DE LOS DISOLVENTES DE EXTRACCIÓN				
	Caldo Filtrado	AcOBu	Agua	Cloroformo
Volumen	5000 ml	1000 ml	315 ml	92 ml
Var. % v/v		20 %	31.5 %	29.2 %
Var. % v _i /v _f			6.3 %	1.84 %

Tabla N° 17

CONDICIONES DE REACCIÓN OPTIMIZADAS							
EB/CF	S ext. 1 AcOBu	S ext. 2 H ₂ O	pH ext. 2	Temp.	S. ext. 3 CHCl ₃	HPLC mcg/ml	EB %
1 lt	0.2:1.0 V/V _{CF}	0.315:1.00 V/V Sext. ₁	4.5	10° C	0.29:1.0 V/V Sext. ₂	940	75

Resultados del Aislamiento y purificación de eritromicina por un proceso extracción continua.

Cinco grupos de experimentos posibilitaron:

- 1) Fijar el pH ácido de la extracción acuosa: a pH de 4.5 prácticamente (por observación en CCF) toda la eritromicina contenida en el extracto de acetato de butilo de la primera extracción, se lleva a la fase acuosa como acetato de eritromicina (tabla N° 11),
- 2) Determinar el volumen de agua de extracción: con una relación de 0.3 a 0.4 volúmenes de agua respecto al volumen de acetato de butilo se logra extraer toda la eritromicina (tabla N° 12),
- 3) Establecer la temperatura de extracción acuosa ácida: en la práctica no hubo diferencia entre las temperaturas de 5, 10 y 15°C, se decidió por 10°C, por razones de tiempo, costo y seguridad sobre la hidrólisis ácida de la eritromicina (tabla N° 13),
- 4) Seleccionar el disolvente orgánico de la tercera extracción, S.ext 3: se obtuvieron los mismos resultados con cloroformo y cloruro de metileno;

se optó por el primero en virtud de que ofrecía mayor seguridad en su manejo evitando pérdidas por evaporación (tabla N° 14),

- 5) Determinar el volumen del cloroformo de la tercera extracción, S.ext. 3: la relación de 0 29:1 0 volúmenes de cloroformo respecto al volumen del agua aseguró un rendimiento del 75% de eritromicina desde el caldo filtrado, (tabla N° 15)

Si bien no se obtuvo un mayor rendimiento de eritromicina, desde caldo filtrado, al logrado vía la precipitación y liberación del lactato de eritromicina, se puede concluir que: **a)** la eritromicina aislada por extracción continua tiene una pureza mucho mayor, HPLC 940 mcg/mg. Además de que pierde el desagradable sabor amargo, lo que la hace ideal para preparaciones pediátricas orales; **b)** los tiempos de operación se reducen sustancialmente de días a horas; **c)** el proceso se hace mucho más fácil de conducir en planta por la gran reducción en los volúmenes de operación; **d)** como consecuencia se aumenta la productividad y se reducen los costos.

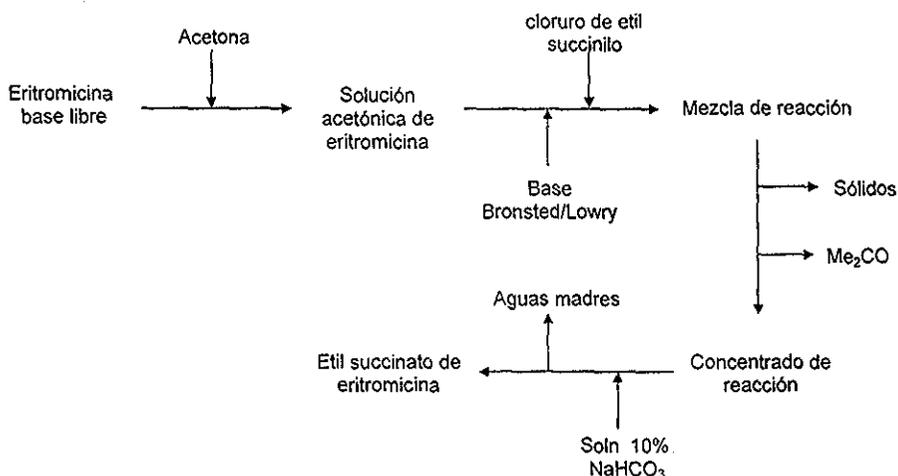
La identificación de la Eritromicina se hizo por espectroscopia de IR, ¹H, ¹³C y Masas (ver Espectroscopia de Eritromicina págs. 56-57, 74-79), y comparación con espectros estándar.

4.4 Preparación de etilsuccinato de eritromicina.

Metodología.

Se disuelve a temperatura ambiente la eritromicina base, EB, en acetona (3 a 5 V/W), posteriormente se agrega una base inorgánica (3.0 a 5 eq./eq EB). Después se adiciona gota a gota cloruro de etilsuccinoilo (1.2 a 2.0 eq./eq EB) diluido con acetona V/V. En caso de requerirlo la reacción se calienta hasta que concluya (por CCF). Una vez concluida, la mezcla de reacción se filtra y se evapora el filtrado hasta alcanzarse una relación 1:2 peso a volumen de eritromicina en acetona. Sobre la mezcla de reacción se vierte una solución acuosa (10 V/W_{EB}) de bicarbonato de sodio al 10 % para inducir la precipitación de etilsuccinato de eritromicina. El producto se filtra, seca y pesa.

Diagrama de flujo



Preparación del Etilsuccinato de eritromicina

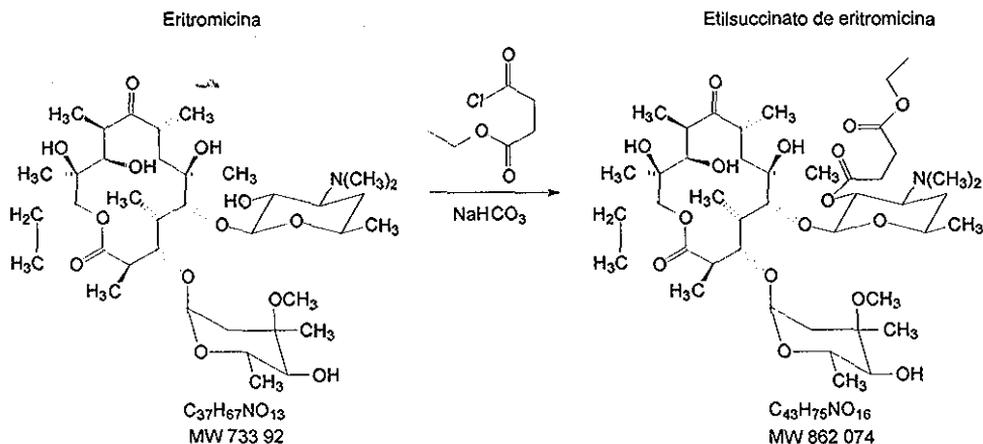


Tabla N° 18

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE ACETONA DE REACCIÓN							
EB 5.3 g peso	Me ₂ CO	K ₂ CO ₃ ·H ₂ O 2.5 eq/eq EB	ClEtSuc 2.0 eq/eq EB	T. rxn	ETSE g. peso	HPLC mcg/mg	ETSE g. act.
5 g act.	25 ml	2.8 g	1.93 ml	40°C	6.17	774	4.78
5 g act.	20 ml	2.8 g	1.93 ml	40°C	6.23	772	4.81
5 g act.	15 ml	2.8 g	1.93 ml	40°C	6.07	774	4.70

Variación del volumen de acetona de 5, 4 y 3 V/W_{EB}. $K_2CO_3 \cdot H_2O = K_2CO_3 \cdot 1/2 H_2O$

Rendimiento de la reacción en negritas: 117 5% peso a peso, 96 2 % actividad-actividad.

Abreviaturas: EB = eritromicina; ClEtSuc = cloruro de etilsuccinilo; ETSE = etilsuccinato de eritromicina

Tabla N° 19

SELECCIÓN DE LA BASE DE BRONSTED LOWRY							
EB 5.3 g peso	Me ₂ CO	Base de B-L	ClEtSuc 2.0 eq/eq EB	ETSE g. peso	HPLC mcg/mg	ETSE g. act.	
5 g act	20 ml	NaHCO ₃ , 1.71 g, 3.0 eq/eqEB	1.93 ml	4.51	776	3.5	
5 g act	20 ml	KOH, 1.14 g, 3.0 eq/eqEB	1.93 ml	3.89	770	3.0	
5 g act.	20 ml	K₂CO₃·1/2H₂O, 1.69 g, 1.5 eq/eqEB	1.93 ml	6.18	776	4.80	

Variación de la base de Bronsted-Lowry: 3 eq/eqEB

Rendimiento de la reacción en negritas: 116 6% peso a peso, y 96 % actividad-actividad

Tabla N° 20

DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE K_2CO_3						
EB 5.3 g peso	Me_2CO	$K_2CO_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$	ClEtSuc 2.0 eq/eq EB	ETSE g. peso	HPLC mcg/mg	ETSE g. act.
5 g act.	20 ml	2.25 g, 2.0 eq/eq EB	1.93 ml	6.19	778	4.82
5 g act.	20 ml	1.69 g, 1.5 eq/eq EB	1.93 ml	6.17	778	4.80
5 g act.	20 ml	1.12 g, 1.0 eq/eq EB	1.93 ml	6.07	774	4.00

Variación de la cantidad de $K_2CO_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$: 1.0, 1.5 y 2.0 eq/eq EB

Rendimiento de la reacción en negritas: 116% peso a peso, y 96 % actividad-actividad.

Tabla N° 21

DETERMINACIÓN DEL CLORURO DE ETILSUCCINOILO						
EB 5.3 g peso	Me_2CO	$K_2CO_3 \cdot H_2O$ 1.5 eq/eq EB	Cloruro de etil succinoilo	ETSE g. peso	HPLC mcg/mg	ETSE g. act.
5 g act.	25 ml	1.69 g	1.94 ml, 2.0 eq/eq EB	6.19	778	4.82
5 g act.	20 ml	1.69 g	1.74 ml, 1.8 eq/eq EB	6.21	776	4.82
5 g act.	15 ml	1.69 g	1.45 ml, 1.5 eq/eq EB	6.16	776	4.78

Variación del cloruro de etilsuccinoilo 2.0, 1.8, 1.52 eq/eq EB

Rendimiento de la reacción en negritas: 117% peso a peso, y 96.4 % actividad-actividad

Tabla N° 22

CONDICIONES DE REACCIÓN OPTIMIZADA						
EB	Me_2CO	$K_2CO_3 \cdot H_2O$	Cloruro de etil succinoilo,	ETSE	HPLC	ETSE
g. act.	4 V/W_{EB}	1.5 eq/eq EB	1.8 eq/eq EB	g. peso	mcg/mg	g. act.

La reacción optimizada de acilación de la eritromicina con cloruro de etilsuccinoilo da un rendimiento de 99% peso a peso, y 82 % actividad-actividad. De 5.3 g. peso se debe obtener 6.22 g. peso de ETSE, o de 5 g act se debe obtener 5.87 g act. de ETSE

Resultados de la Preparación de Etilsuccinato de Eritromicina.

Las cuatro series de experimentos permitieron ajustar las cantidades a emplear de:

- 1) El volumen de acetona: 4 volúmenes a peso de eritromicina (tabla N° 18),

2) La naturaleza y cantidad de la base de Bronsted-Lowry: 1.5 eq./eq (tabla N° 19 y 20),

3) equivalentes de cloruro de etilsuccinoilo: 1.8 eq./eq. Es evidente en la optimización de este proceso de acilación que las cantidades iniciales de reacción estaban en ligero exceso, sin que ello hubiese implicado reducción en la pureza o el rendimiento del producto (tabla N° 21).

La identificación del Etilsuccinato de eritromicina se hizo por espectroscopia de IR, ^1H , ^{13}C y Masas (ver Espectroscopia de Etilsuccinato de Eritromicina págs. 59-60, 80-85).

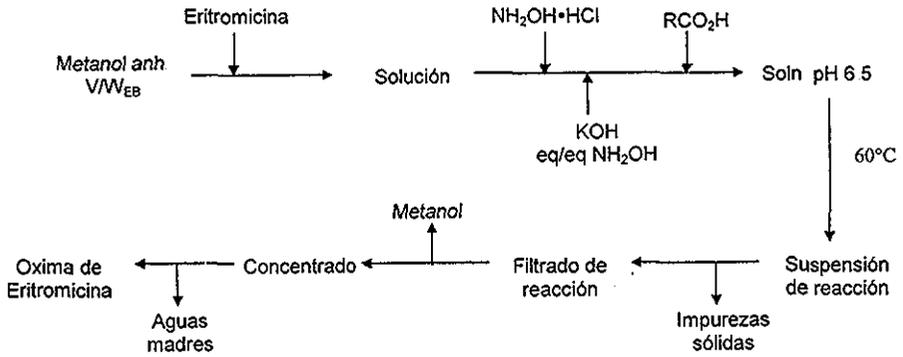
4.6 Preparación de la Oxima de eritromicina.

Metodología.

La eritromicina base se disuelve en metanol anhidro (3 a 6 $\text{V}/\text{W}_{\text{EB}}$). A la solución se agrega clorhidrato de hidroxilamina (7 a 9 eq./eq_{EB}) e hidróxido de potasio (eq./eq $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), ajustándose el pH (6.3 a 6.8) con un ácido carboxílico (ácido acético o láctico) inmediatamente después de cada adición. La mezcla de reacción se calienta a reflujo, ajustando el pH entre 6.3-6.8 hasta que la reacción concluya. La reacción es filtrada para eliminar impurezas sólidas. El filtrado metanólico es evaporado a la mitad del volumen original, enfriando a 10°C y filtrando posteriormente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diagrama de flujo



Preparación de la Oxima de eritromicina

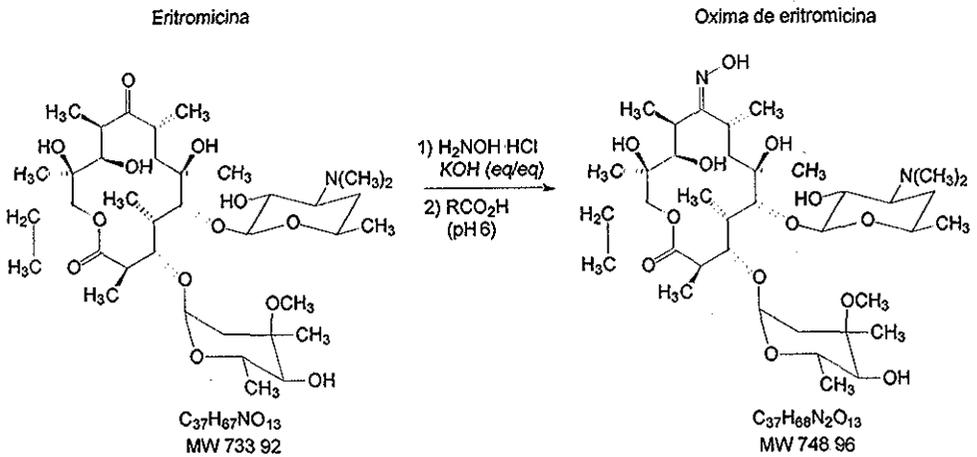


Tabla N° 23

DETERMINACIÓN DEL PH DE REACCIÓN					
EB	MeOH	NH ₂ OH HCl	KOH	CH ₃ CO ₂ H	Oxima EB
6.81 mmol	6 V/W _{EB}	9 eq/eq EB	9 eq/eq EB	pH	g. peso
5 g. act.	30 ml.	4.26 g.	3.44 g.	6.8	2.19
5 g. act.	30 ml.	4.26 g.	3.44 g.	6.5	2.55
5 g. act.	30 ml.	4.26 g.	3.44 g.	6.3	1.94

Variación del pH de reacción: 6.8, 6.5 y 6.3

Rendimiento de la reacción en negritas: 50% peso activo a peso, de 5.10 g teóricos.

Tabla N° 24

DETERMINACIÓN DE LOS EQUIVALENTES DE NH ₂ OH HCl/ KOH					
EB	MeOH	NH ₂ OH HCl	CH ₃ CO ₂ H	T. rxn.	Oxima EB
6.81 mmol	6 V/W _{EB}		pH		g. peso
5 g. act.	30 ml.	4.26 g. 9 eq/eq EB	6.5	24 h.	2.56
5 g. act.	30 ml.	3.79 g. 8 eq/eq EB	6.5	24 h.	2.86
5 g. act.	30 ml.	3.31 g. 7 eq/eq EB	6.5	30 h.	2.85

Variación de los equivalentes de NH₂OH HCl y KOH: 9.0, 8.0 y 7.0 eq/eq EB

Rendimiento de la reacción en negritas: 56% peso activo a peso, de 5.10 g teóricos.

Tabla N° 25

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE METANOL					
EB	MeOH	NH ₂ OH HCl	CH ₃ CO ₂ H	T. rxn.	Oxima EB
6.81 mmol			pH		g. peso
5 g. act.	25 ml. 5 V/W _{EB}	3.79 g. 8 eq/eq EB	6.5	24 h.	2.85
5 g. act.	20 ml. 4 V/W_{EB}	3.79 g. 8 eq/eq EB	6.5	18 h.	2.84
5 g. act.	15 ml. 3 V/W _{EB}	3.79 g. 8 eq/eq EB	6.5	18 h.	2.85

Variación del volumen de metanol: 5.0, 4.0 y 3.0 V/W_{EB}

Rendimiento de la reacción en negritas: 56% peso activo a peso, de 5.10 g teóricos.

Tabla N° 26

CONDICIONES DE REACCIÓN OPTIMIZADAS					
EB	MeOH	NH ₂ OH HCl	CH ₃ CO ₂ H	T. rxn.	Oxima EB
6.81 mmol			pH		g. peso
5 g. act.	20 ml. 4 V/W_{EB}	3.79 g. 8 eq/eq EB	6.5	18 h.	2.84

Rendimiento de la reacción: 56% peso activo a peso, de 5.10 g teóricos. De las aguas madres se recuperan 0.58 g., 11.4% del producto para dar en total 3.42 g., 67% peso activo a peso.

Resultados de la Preparación de la Oxima de Eritromicina

Las tres series de experimentos permitieron fijar:

- 1) El pH de reacción: se debe agregar el clorhidrato de hidroxilamina y el hidróxido de potasio, en dos porciones ajustando inmediatamente a pH 5, de lo contrario se tiende a precipitar la eritromicina. Así mismo, se debe ajustar el pH frecuentemente durante todo el curso de la reacción (Tabla N° 23),
- 2) Los equivalentes de clorhidrato de hidroxilamina e hidróxido de potasio: con 8 equivalentes por equivalente de eritromicina se logró el mejor rendimiento y el tiempo más corto (tabla N° 24),
- 3) el volumen del metanol: aunque con 4 y 3 volúmenes de metanol por peso de eritromicina, la reacción concluye en el mismo tiempo, empleando 3 volúmenes la reacción es más difícil de controlar y manipular (tabla N° 25).

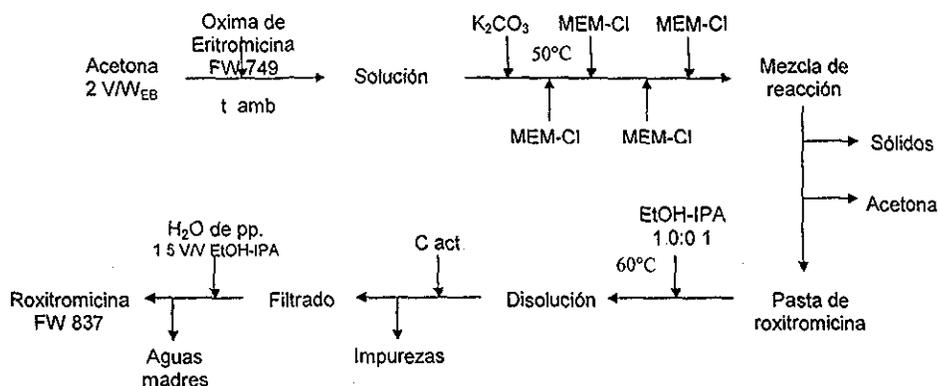
La identificación de la Oxima de eritromicina se hizo por espectroscopia de IR, ^1H , ^{13}C y Masas (ver Espectroscopia de la Oxima de Eritromicina págs. 62-63, 86-91)

4.7 Preparación de Roxitromicina

Metodología.

La oxima de la eritromicina, OEB, se disuelve en acetona (15 a 20 V/W_{OEB}), se adiciona (2.0 a 4.5 eq/eq OEB) una base inorgánica (K₂CO₃, o KOH). Posteriormente se agrega lentamente el cloruro de metoxietoximetilo (1.6-2.0 eq/eq_{OEB}) en cuatro porciones, mediando entre cada adición 2.5 horas (se observa por CCF). La suspensión de reacción bajo agitación se mantiene a 50 °C, hasta que se observa por CCF que la oxima de eritromicina se ha agotado. La mezcla de reacción se concentra hasta pasta, disolviéndose el concentrado en una mezcla caliente de etanol-isopropanol (aproximadamente 5.5 V/W_{OEB}), 1.0:0.1. Después se adiciona agua hasta turbidez (aproximadamente 1.5 V/V_{ETOH-IPA}), enfriando lentamente. El producto se filtra, pesa y seca

Diagrama de flujo



Preparación de Roxitromicina

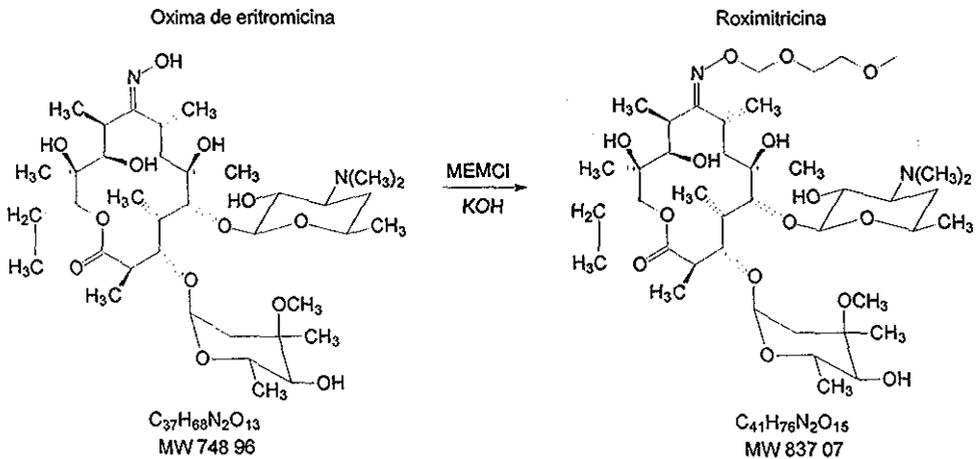


Tabla N° 27

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ADICIONES DE MEM-CI								
Me ₂ CO 30 V/W _{OEB}	OEB ~6.68 mmol	K ₂ CO ₃ 4.5 eq/eq OEB	MEM-CI 2.0 eq./eq. OEB			Roxi. g. peso	HPLC mcg/mg	Roxi. g. act.
150 ml	5g. peso	4.15 g	1.52 ml	—	—	—	—	—
150 ml	5g. peso	4.15 g	0.76 ml	0.76 ml	—	—	—	—
150 ml	5g. peso	4.15 g	0.51 ml	0.51 ml	0.51 ml	3.30	952	3.14

Variación del número de adiciones del MEM-CI 2 eq./eq.OEB: 1, 2 y 3 adiciones

Rendimiento de la reacción en negritas: 59% W/W_{OEB}, 56% act/W_{OEB}, de 5.59 g. peso teórico.

Abreviaturas: OEB = oxima de eritromicina; Roxi = roxitromicina.

Tabla N° 28

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE ACETONA								
Me ₂ CO ml. V/W _{OEB}	OEB ~6.68 mmol	K ₂ CO ₃ 4.5 eq/eq OEB	MEM-CI 2.0 eq./eq. OEB			Roxi. g. peso	HPLC mcg/mg	Roxi. g. act.
100; 20 V/W	5g. peso	4.15 g	0.51 ml	0.51 ml	0.51 ml	3.35	950	3.18
85; 17 V/W	5g. peso	4.15 g	0.51 ml	0.51 ml	0.51 ml	3.28	950	3.12
75; 15 V/W	5g. peso	4.15 g	0.51 ml	0.51 ml	0.51 ml	3.26	950	3.10

Variación del volumen de acetona: 20, 17 y 15 volúmenes a peso de OEB.

Rendimiento de la reacción en negritas: 60% W/W_{OEB}, 57% act/W_{OEB}, de 5.59 g peso teórico

Tabla N° 29

DETERMINACIÓN DE LOS EQUIVALENTES DE MEM-Cl						
Me ₂ CO 20 V/W _{EB}	OEB ~6.68 mmol	K ₂ CO ₃ 4.5 eq/eq OEB	MEM-Cl eq./eq. OEB	Roxi g. peso	HPLC mcg/mg	Roxi. g. act.
100 ml	5g. peso	4.15 g	1.52 ml.; 2.0 eq/eq	4.00	950	3.80
100 ml	5g. peso	4.15 g	1.37 ml.; 1.8 eq/eq	4.00	952	3.80
100 ml	5g. peso	4.15 g	1.22 ml.; 1.6 eq/eq.	3.57	950	3.39

Variación de los equivalentes de MEM-Cl: 2.0, 1.8 Y 1.6 eq./eq. OEB, los volúmenes se agregaron en 3 adiciones en cada caso, como en las tablas anteriores

Rendimiento de la reacción en negritas: 71% W/W_{OEB}, 68% act / W_{OEB}, de 5.59 g. peso teórico.

Tabla N° 30

DETERMINACIÓN DE LA BASE DE BRONSTED-LOWRY						
Me ₂ CO 20 V/W _{EB}	OEB ~6.68 mmol	Base de Bronsted-Lowry eq/eq OEB	MEM-Cl 1.8 eq./eq. OEB, en 4 adiciones	Roxi g peso	HPLC mcg/mg	Roxi. g act.
100 ml	5g. peso	K ₂ CO ₃ 4.15 g., 4.5 eq/eq	1.37 ml	4.00	952	3.81
100 ml	5g. peso	K ₂ CO ₃ 3.23 g., 3.5 eq/eq	1.37 ml	3.98	952	3.79
100 ml	5g. peso	KOH 0.94 g., 2.5 eq/eq	1.37 ml	4.41	950	4.19
100 ml	5g. peso	KOH 0.75 g., 2.0 eq/eq	1.37 ml	4.11	950	3.90

Variación de la base y los equivalentes de la misma: K₂CO₃ 4.5 y 3.5 eq/eq KOH 2.5 y 2.0 eq/eq OEB, los volúmenes de MEM-Cl se agregaron en 3 adiciones en cada caso

Rendimiento de la reacción en negritas: 79% W/W_{OEB}, 75% act / W_{OEB}, de 5.59 g. peso teórico.

Tabla N° 31

CONDICIONES DE REACCIÓN OPTIMIZADAS						
Me ₂ CO 20 V/W _{EB}	OEB ~6.68 mmol	KOH 2.5 eq/eq OEB	MEM-Cl 1.8 eq./eq OEB, en 4 adiciones	Roxi. g peso	HPLC mcg/mg	Roxi. g act.
100 ml	5g. peso	0.94 g	1.37 ml	4.36	952	4.15

Rendimiento: 78% W/W_{OEB}, 74% act / W_{OEB}, de 5.59 g. peso teórico.

Resultados de la Preparación de Roxitromicina.

Las cuatro series de experimentos permitieron establecer:

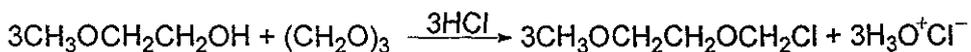
- 1) La cantidad y número de adiciones del MEMCl: cuando se agrega el MEMCl en una o dos adiciones no se forma la Roxitromicina, observándose por cromatografía en capa fina un producto en el punto de aplicación; probablemente la amina cuaternaria del resto de desosamina de la eritromicina. Las 4 adiciones se hacen con el MEMCl diluido en acetona (4 V/V), y gota a gota, hasta observar por placa que la reacción no avanza (tabla N° 27 y 29),
- 2) El volumen de acetona: no se observó una diferencia significativa con los volúmenes empleados. La acetona debe estar seca (tabla N° 28),
- 3) La naturaleza y cantidad de la base: el hidróxido de potasio triturado sobre acetona hace a la reacción más rápida (4 horas vs. 8 horas del carbonato de potasio) y requiere una agitación no tan vigorosa como con el carbonato de potasio (tabla N° 30)

La identificación de Roxitromicina se hizo por espectroscopia de IR, ^1H , ^{13}C y Masas (ver Espectroscopia Roxitromicina págs. 66-67, 92-97)

4.8 Preparación del cloruro de metoxietoximetilo, MEM-Cl.

Metodología

El cloruro de metoxietoximetilo, MEM-Cl se preparó²⁰ a partir de una disolución de trioxano en metoxietanol (metilcelosolve) a temperatura ambiente, burbujeando cloruro de hidrógeno a la mezcla de reacción, manteniendo la temperatura de reacción en 15° C. El MEM-Cl producto de la reacción se extrae con dicloro metano (cloruro de metileno), el extracto orgánico se seca con sulfato de sodio anhidro, y la evaporación del cloruro de metileno deja como residuo al MEM-Cl, el cual se destila a presión reducida.



Conforme a la relación estequiométrica, se emplearon 3 moles de metoxietanol por mol de trioxano. La cantidad de cloruro de hidrógeno se estableció empíricamente con base en mantener una temperatura de reacción de 15° C. y observarse la salida de cloruro de hidrógeno por el tubo que conectaba al matraz de reacción con la trampa de sosa

Resultados en la Preparación del MEMCl.

Se desarrolló un método escalable a planta industrial muy diferente al descrito para pequeñas cantidades²⁰. El método fue optimizado y se utiliza en la producción de Roxitromicina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. PARTE EXPERIMENTAL

Características del equipo empleado en los análisis de identificación y purezas.

Los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrómetro Perkin-Elmer® FTIR 1605. Las unidades se expresan en cm^{-1}

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se hicieron en un espectrofotómetro Varian Unity Inova® empleando una frecuencia de 300 MHz, empleando tetrametil silano y/o CDCl_3 como referencia interna, los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz)

Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro JEOL® JMS SX 102 A doble sector de geometría inversa, la técnica empleada en todos los casos fue Ionización Electrónica por detección de iones positivos, con esta técnica se da el valor m/e del ión molecular (M^+), el pico base (100%) y el resto de todo el espectro de fragmentación.

Los resultados de cromatografía y microbiología fueron realizados en la Fabrica de Antibióticos FERMIC, S.A. de C.V., los resultados confirmatorios de las muestras coincidieron con los tiempos de retención de los estándares de referencia

Los resultados microbiológicos (potencia) de las muestras fueron demostrados bajo las condiciones apropiadas por sus efectos inhibitorios en *Micrococcus luteus* 9341, en placas de medios de cultivo.

HPLC:

Instrumento: ProStar
Tipo de detector ADCB (10 volts)
Vel. de muestra: 10 Hz
Tiempo de corrida: 17 min.

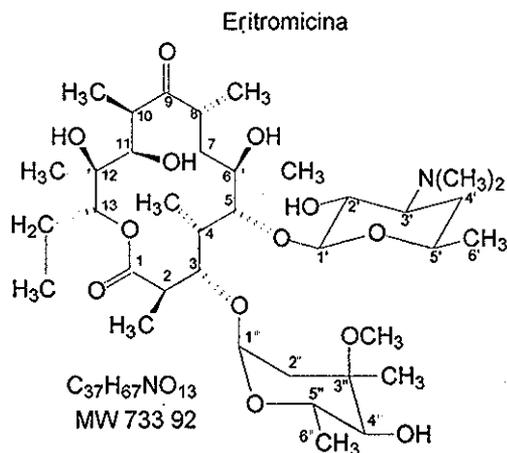
Condiciones de operación:
Columna: Kromasil ODS 5 μm , 4.6 x 250 nm, Phenomenex.
Volumen de inyección: 20 μl
Longitud de onda: 205 nm
Temperatura: ambiente
Flujo: 1.5 ml/min
Fase móvil: agua: 17% fosfato de amonio monobásico pH 5.3: acetonitrilo (510 ml: 200 ml: 315 ml)
Diluyente de muestra: fase móvil.

Preparación del lactato de eritromicina

En un vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml se vierten 1000 ml de caldo filtrado de la fermentación de eritromicina (5 mg/ml), se alcaliniza a un pH de 9.5 con una solución acuosa al 28% de hidróxido de amonio, extrayéndose posteriormente con 200 ml de acetato de butilo, empleando un volumen de 10 a 20% al volumen del caldo filtrado. La fase orgánica se separa en un embudo de separación y se trata con sulfato de sodio anhidro. El extracto orgánico se acidula a pH 5.5 con ácido láctico precipitándose 6.02g de lactato de eritromicina, título HPLC 789 mcg/ml, 4.75 g. Activos, 75% actividad/actividad.

Liberación de eritromicina del lactato de eritromicina.

En un matraz erlenmeyer se suspenden 6.41 g de lactato de eritromicina, HPLC 780 mcg/ml en 60 ml de agua y 60 ml de acetona. Se ajusta el pH a 6.5 con una solución de hidróxido de sodio y se filtran las impurezas. La eritromicina se precipita de la solución a un pH 9.0 con una solución de hidróxido de sodio al 30%. Obteniéndose 5.07 g. de eritromicina seca, título HPLC 938 mcg/mg, 4.76 g. activos. Rendimiento 95% actividad/actividad



Espectroscopia de Eritromicina			S. Masas		IR		
Posición	¹ H	¹³ C					
1		175.72	<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> <div style="text-align: center;"> <p>Eritromicina $C_{37}H_{67}NO_{13}$ M⁺, m/e 734</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(576) $C_{29}H_{51}O_{11}$</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>$C_8H_{16}NO_2$ deoxi-desosamina (158)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>$C_8H_{16}NO_2$ deoxi-desosamina PB m/e 158</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>$C_{29}H_{51}O_{11}$</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>$C_{29}H_{52}NO_9$ m/e 559</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>Eritromicina $C_{37}H_{67}NO_{13}$ M⁺, m/e 734</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>$C_8H_{15}O_3$ deoxi-clanidosa (159)</p> </div> </div> </div>		Alcohol OH st 3487 cm ⁻¹ C-O(H) 1052 cm ⁻¹		
2	2.89	44.81					Ester C=O st 1735 cm ⁻¹ C-O st 1168 cm ⁻¹
3	4.01	77.94					Cetona C=O st 1720 cm ⁻¹
4		45.14					Alcanos CH st 2974 cm ⁻¹ CH ₂ st 2930 cm ⁻¹ CH ₃ δ as 1461 cm ⁻¹ CH ₂ δ 1461 cm ⁻¹ CH ₃ δ sy 1379 cm ⁻¹
5	3.57	83.46					
6		76.80					
7		39.32					
8	2.70	37.78					
9		221.97					
10	3.02	38.46					
11	3.82	74.61					
12		76.57					
13	5.04	77.42					
13-CH ₂		21.35					
13-CH ₃	0.85	10.63					
2-CH ₃	1.25	11.99					
4-CH ₃	1.11	9.10					
6-CH ₃	1.47	26.93					
8-CH ₃	1.18	18.62					
10-CH ₃	1.16	15.95					
12-CH ₃	1.13	16.14					
1'	4.43	103.11					
2'	3.10	72.56					

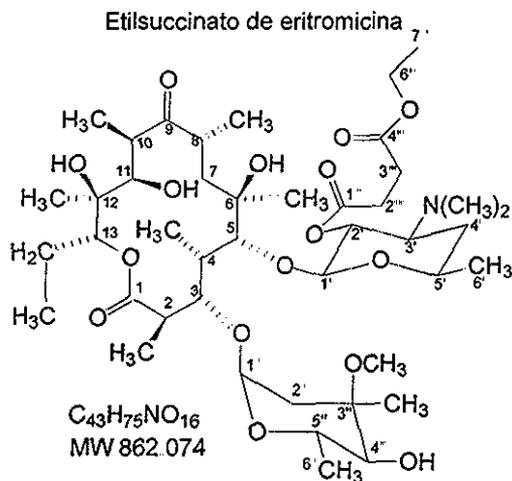
continuación

Posición	Espectroscopia de Eritromicina		S. Masas	IR
	¹ H	¹³ C		
3'	2.52	65.50		
4'		28.68		
5'		70.85		
6' (5'CH ₃)		21.05		
N(CH ₃) ₂	2.35	40.25		
1''	4.89	96.26		
2''		34.91		
3''		74.95		
4''	2.99	79.89		
5''	3.98	68.83		
6'' (5''CH ₃)	1.28	18.25		
3''-CH ₃	1.24	21.47		
3''-OCH ₃	3.32	49.46		

Ver espectros de IR, ¹H, ¹³C y Masas en las páginas 74-79.

Preparación de Etilsuccinato de eritromicina

En un matraz bola de 100ml de tres bocas con agitación mecánica y termómetro, se agrega 20 ml de acetona anhidra. Bajo agitación y a temperatura ambiente se disuelven 5.3 g. (5.0 g. activos, HPLC 943 mcg/mg) de eritromicina, adicionándose posteriormente 1.69 g. (1.5 eq/eqEB) de carbonato de potasio. A través de un embudo de adición se agrega gota a gota 1.74 ml del cloruro de etilsuccinoilo (1.8 eq/eqEB). La temperatura de reacción se eleva espontáneamente hasta 35° c. en la adición, una vez concluida ésta, se mantiene la temperatura a 40°c por 30 minutos. La mezcla de reacción se concentra hasta 10 ml y se enfría a temperatura ambiente eliminándose los sólidos por filtración, los cuales se lavan con 2 ml de acetona sobre el büchner. Al filtrado se agregan a 35°C. bajo agitación 60 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 10%, precipitando el etilsuccinato de eritromicina. La suspensión se filtra y seca, obteniéndose 6.21 g. (4.82 g. activos, HPLC 776 mcg/mg) de etilsuccinato de eritromicina. Rendimiento 117% peso/peso, 96.4% actividad/actividad.



Espectroscopia de Etilsuccinato de eritromicina				
Posición	1H	^{13}C	S. Masas	IR
1		175.61	Etilsuccinato de Eritromicina $C_{29}H_{51}O_{11}$ (576) $C_{43}H_{75}NO_{16}^{+}$ \rightarrow $C_{14}H_{24}NO_5^{+}$ (M ⁺)+1, m/e 863 \rightarrow etilsuccinoyl deoxi-desosamina PB m/e 286 \rightarrow $C_8H_{16}NO_2$ deoxi-desosamina (158) $C_{35}H_{59}O_{14}^{+}$ m/e 705 Etilsuccinato de Eritromicina $C_{29}H_{51}O_{11}$ (576) deoxi-clanidosa $C_8H_{15}O_3$ (159) $C_{37}H_{67}NO_{13}^{+}$ \rightarrow $C_{35}H_{60}NO_{13}^{+}$ m/e 705 \rightarrow $C_8H_{15}O_4$ clanidosa (175+1) $C_{35}H_{60}O_{13}^{+}$ m/e 706	Alcohol OH st 3446 cm^{-1} C-O(H) 1053 cm^{-1} Ester C=O st 1737 cm^{-1} C-O st 1168 cm^{-1} Cetona C=O st 1697 cm^{-1} Alcanos CH st 2974 cm^{-1} CH ₂ st 2940 cm^{-1} CH ₃ δ as 1464 cm^{-1} CH ₂ δ 1464 cm^{-1} CH ₃ δ sy 1376 cm^{-1}
2		44.73		
3		77.89		
4		45.01		
5	3.50	83.42		
6		76.80		
7		39.10		
8	3.02	37.79		
9		222.00		
10		38.02		
11		74.57		
12		76.68		
13	5.04	77.32		
13-CH ₂		21.16		
13-CH ₃	.084	10.59		
2-CH ₃		11.99		
4-CH ₃	.094	9.03		
6-CH ₃	1.44	26.86		
8-CH ₃		18.57		
10-CH ₃		15.89		
12-CH ₃		16.26		

Espectroscopia de Etilsuccinato de eritromicina			S. Masas	IR
Posición	¹ H	¹³ C		
1'	4.55	100.77		
2'	3.19	72.64		
3'	2.85	65.57		
4'		29.24		
5'		71.91		
6' (5'CH ₃)		21.04		
N(CH ₃) ₂	2.28	40.59		
1''	4.90	96.07		
2''		34.90		
3''		74.80		
4''		79.75		
5''	3.09	68.38		
6'' (5''CH ₃)		18.15		
3''-CH ₃		21.46		
3''-OCH ₃	3.35	49.39		
1''' C=O		171.10		
2''' CH ₂	2.64	30.06		
3''' CH ₂	2.66	29.46		
4''' C=O		172.20		
5''' CH ₂	4.15	60.55		
5''' CH ₃		14.17		

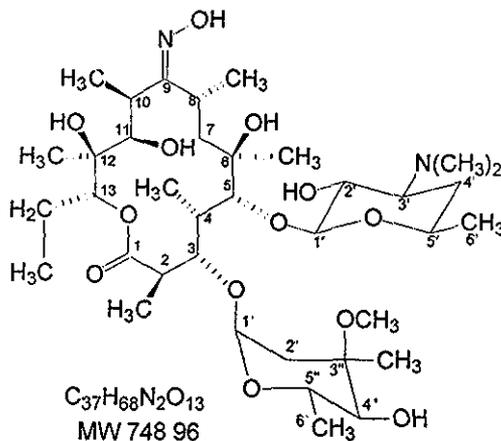
Ver espectros de IR, ¹H, ¹³C y Masas en las páginas 80-85.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Preparación de la Oxima de eritromicina

En un matraz bola de 100 ml con agitador mecánico, columna de reflujo y termómetro, se agregan 20 ml de metanol anhidro. A temperatura ambiente se disuelven 5.38 g. (5 g. activos, HPLC 930 mcg/mg), 6.81 mmol de eritromicina. A temperatura de reflujo a la mezcla de reacción se le adiciona gota a gota una solución metanólica filtrada de hidroxilamina (3.79 g, 54.5 mmol de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 3.1 g, 54.5 mmol de KOH , en 2.5 ml de MeOH) ajustando periódicamente el pH a 6.5 con ácido acético glacial. El curso de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina. La mezcla de reacción se mantiene a reflujo por 20 horas, posteriormente se enfría a temperatura ambiente y filtra. El filtrado es concentrando a la mitad de su volumen, enfriado a 10°C . filtrando el producto sólido. Las aguas madres se concentran a la mitad de su volumen, agregándoles bajo agitación y a temperatura ambiente 20 ml de agua, ajustando el pH a 9.0 con una solución de hidróxido de amonio. Finalmente se filtra, seca y pesa el producto reunido. Obteniéndose 3.58 g, 67% peso a peso activo.

Oxima de Eritromicina



Espectroscopia de la Oxima de Eritromicina				
Posición	1H	^{13}C	S. Masas	IR
1		175.62	<p style="text-align: center;">(592)</p> <p style="text-align: center;">$C_{29}H_{52}NO_{11}$</p> <p style="text-align: center;">Oxima de Eritromicina $\xrightarrow{+}$ $C_8H_{16}NO_2$</p> <p style="text-align: center;">$C_{37}H_{68}N_2O_{13}$ M^+ m/e 750 $\xrightarrow{+}$ deoxi-desosamina PB, m/e 158</p> <p style="text-align: center;">\downarrow</p> <p style="text-align: center;">$C_8H_{16}NO_2$ deoxi-desosamina (158)</p> <p style="text-align: center;">$C_{29}H_{52}NO_{11}$ m/e 592</p> <p style="text-align: center;">Oxima de Eritromicina $\xrightarrow{+}$ $C_{29}H_{52}NO_{11}$ m/e 574</p> <p style="text-align: center;">$C_{37}H_{68}N_2O_{13}$ M^+ m/e 750 $\xrightarrow{+}$ $C_8H_{16}NO_2$ cladinosa (175)</p>	<p>Alcohol</p> <p>OH st 3450 cm^{-1}</p> <p>C-O(H) 1087 cm^{-1}</p> <p>Ester</p> <p>C=O st 1737 cm^{-1}</p> <p>C-O st 1168 cm^{-1}</p> <p>Oxima</p> <p>C=N st 1642 cm^{-1}</p> <p>N-O st 953.5 cm^{-1}</p> <p>Alcanos</p> <p>CH st 2974 cm^{-1}</p> <p>CH₂ st 2939 cm^{-1}</p> <p>CH₃ δ as 1461 cm^{-1}</p> <p>CH₂ δ 1461 cm^{-1}</p> <p>CH₃ δ sy 1378 cm^{-1}</p>
2	2.69	44.69		
3	4.03	77.96		
4	1.92	49.43		
5	3.58	83.43		
6		77.25		
7		35.05		
8		38.87		
9		171.09		
10		37.69		
11		74.65		
12		76.58		
13	5.09	77.43		
13-CH ₂		21.29		
13-CH ₃	0.84	10.60		
2-CH ₃		14.31		
4-CH ₃		9.28		
6-CH ₃	1.50	26.94		
8-CH ₃		18.62		
10-CH ₃		16.19		

continuación

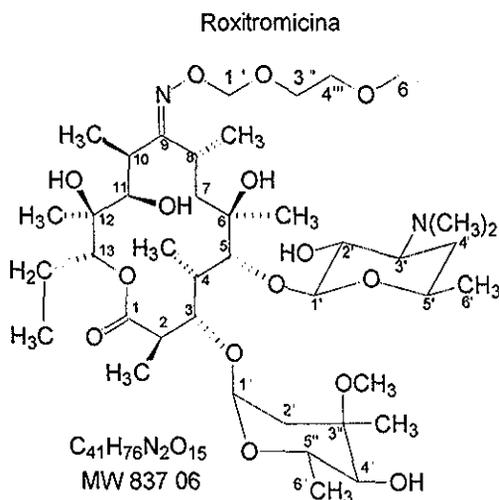
Espectroscopia de la Oxima de Eritromicina			
Posición	¹ H	¹³ C	S. Masas
12-CH ₃		16.32	
1'	4.42	102.90	
2'	3.15	72.67	
3'	2.49	65.53	
4'		29.27	
5'	3.5	71.07	
6' (5'CH ₃)		20.94	
N(CH ₃) ₂	2.32	40.25	
1''	4.93	96.32	
2''		32.63	
3''		75.25	
4''		80.14	
5''	4.04	68.61	
6'' (5''CH ₃)		18.48	
3''-CH ₃		21.44	
3''-OCH ₃	3.32	64.36	

Ver espectros de IR, ¹H, ¹³C y Masas en las páginas 86-91.

Preparación industrial de Roxitromicina

1. En un reactor vidriado, reactor N° 1, se agregaron 2,200 litros de acetona anhidra, 9.8 V Me₂CO/W OEB,
2. Bajo agitación se adicionaron 224.5 Kg (pureza HPLC 81.15%; 182.18 Kg activos, 243 moles) de la Oxima de eritromicina (mezcla de la Oxima de eritromicina E y Z) El Karl-Fischer de la solución debe ser menor o igual a 0.3. Si el K.F. es > a 0.3 adicionar 400 lt de acetona y evaporar a presión normal hasta 2,200 lt.
3. Se enfría el reactor N° 1 a -7 °C.
4. Se adiciona al reactor N° 2, 200 lt de acetona y enfriar a -7 °C.
5. Se agregan 35.2 lt (308.6 moles, 1.27 eq MEMCl/eq OEB) del cloruro de MEM al reactor N° 2
6. Se adiciona al reactor N° 1 bajo agitación una suspensión de KOH al 85% (21.34 Kg de KOH, 1.56 eq KOH/eq OEB y 3.8 lt de agua desionizada)
7. Se pasa la solución de MEMCl:Me₂CO del reactor N° 2 al reactor N° 1, a una velocidad tal que la adición termine en aproximadamente 3 hr., manteniendo la temperatura por debajo de -1° C. El curso de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina.
8. Una vez que la reacción ha concluido, se ajusta el pH a 8.0 con una solución de ácido acético al 90%
9. Se adicionan 8.74 Kg de acetato de potasio, elevando la temperatura a 20° C. Ajustando nuevamente el pH entre 8.0 y 8.5.
10. La mezcla de reacción se filtra a través de un filtro "Sparkler", lavando el filtro con 50 lt de acetona
11. La mezcla de reacción filtrada se concentra al vacío hasta un volumen aproximado de 400 lt., cuidando que la temperatura del reactor no exceda de 35° C.

12. Adicionar 500 lt. de etanol y continuar la destilación a presión atmosférica, hasta que la temperatura alcance 70° C
13. Enfriar la mezcla de reacción a 65° C. y agregar aproximadamente 400 lt de agua desionizada hasta observar turbidez.
14. Calentar la mezcla de reacción a temperatura de reflujo, permitir que la misma alcance la temperatura ambiente y después enfriar hasta 5° C. durante una hora.
15. Filtrar sobre büchner, lavando la suspensión con 60 lt de una mezcla EtOH-H₂O 1:1 a 0° C.
16. El producto se seca a 65° C., obteniéndose un peso de Roxitromicina de 152.7 Kg act. 75% act/act de Roxitromicina.



Espectroscopia de Roxitromicina			S. Masas	IR
Posición	¹ H	¹³ C		
1		175.18		
2		40.19		Alcohol
3	3.97	77.92	Roxitromicina	OH st 3425 cm ⁻¹
4		44.66	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅ ⁺	C-O(H) 1076 cm ⁻¹
5		83.62	M ⁺ m/e 837	
6		76.80		Ester
7		37.30		C=O st 1728 cm ⁻¹
8	2.91	32.92	C ₈ H ₁₆ NO ₂ ⁺	C-O st 1170 cm ⁻¹
9		172.61	deoxi-desosamina (158)	
10		26.87	C ₃₃ H ₆₀ NO ₁₃ ⁺	Oxima
11		74.20	m/e 680	C=N st 1636 cm ⁻¹
12		76.68		N-O st 957 cm ⁻¹
13	5.11	77.32		
13-CH ₂		21.32	Roxitromicina	Alcanos
13-CH ₃	0.84	10.50	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅ ⁺	CH st 2981 m ⁻¹
2-CH ₃		14.69	M ⁺ m/e 837	CH ₂ st 2939 m ⁻¹
4-CH ₃	1.04	9.07		CH ₃ δ as 1464 cm ⁻¹
6-CH ₃	1.50	26.71		CH ₂ δ 1464.9 cm ⁻¹
8-CH ₃		18.64		CH ₃ δ sy 1373 cm ⁻¹
10-CH ₃		16.08		
12-CH ₃		16.15		
1'		102.98	C ₃₇ H ₆₇ N ₂ O ₁₂ ⁺	
2'		72.56	m/e 732	
3'		65.37		
4'		28.60		
5'		71.72		
6' (5'CH ₃)		21.00		
N(CH ₃) ₂		38.84		
1''		97.32		
2''		34.92		
3''		74.70		

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Continuación

Posición	Espectroscopia de Roxitromicina			IR
	¹ H	¹³ C	S. Masas	
4''		80.03		
5''		70.22		
6'' (5''CH ₃)		18.45		
3''-CH ₃		21.39		
3''-OCH ₃		49.38		
1'''		96.07		
3'''		70.91		
4'''		68.16		
6'''		58.96		

Ver espectros de IR, ¹H, ¹³C y Masas en las páginas 92-97.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo experimental fue posible:

- 1) Desarrollar una metodología alterna de aislamiento y purificación de la eritromicina obtenida de un caldo de fermentación.
- 2) Optimizar la técnica de preparación del etilsuccinato de eritromicina para uso pediátrico.
- 3) Se desarrolló el proceso a escala de laboratorio y planta industrial para la producción de MEM-Cl.
- 4) Se llevó a planta la metodología de laboratorio de la preparación de Roxitromicina a partir de eritromicina

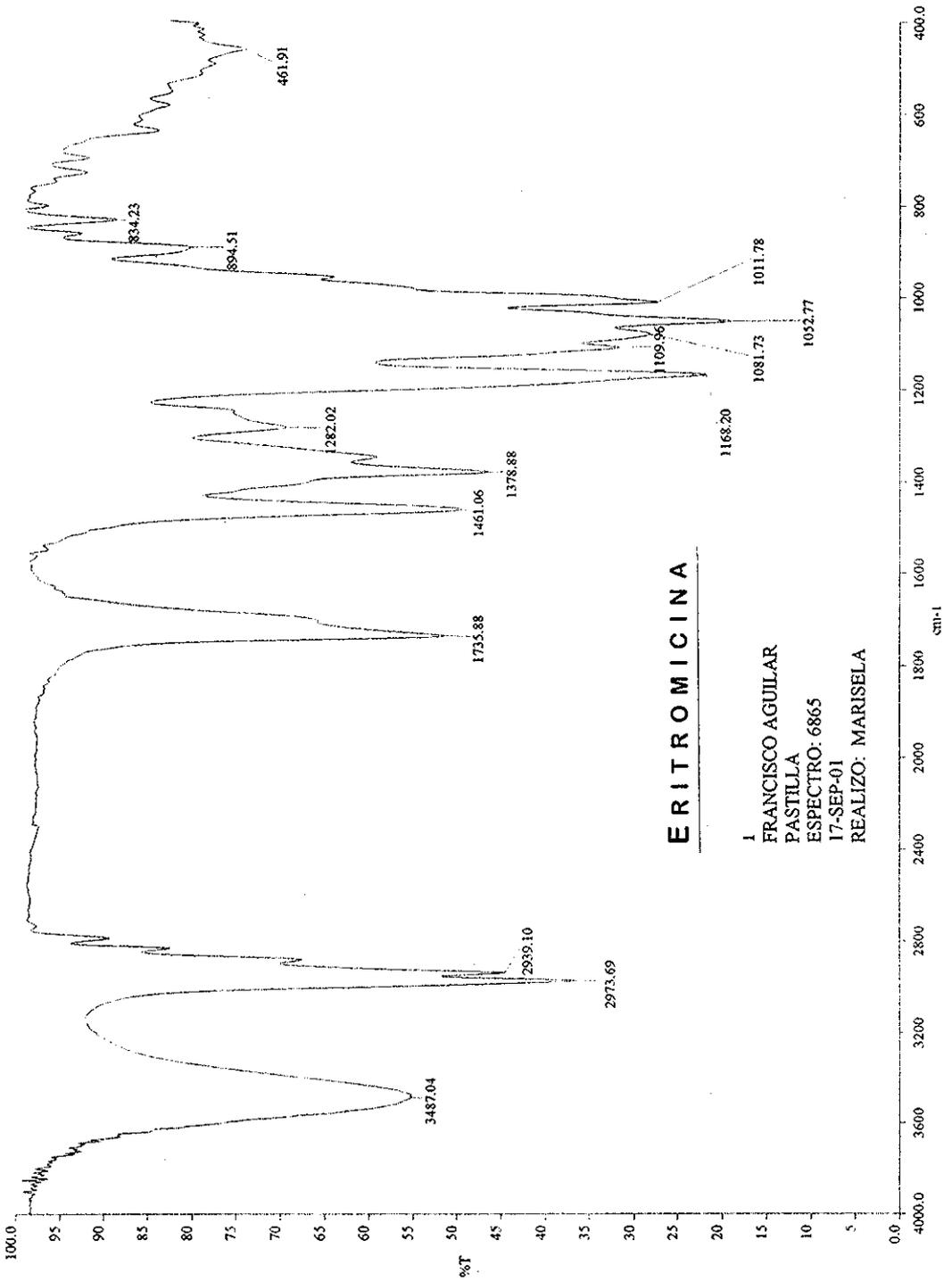
7. BIBLIOGRAFÍA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Alfred Goodman Gilman, Theodore W. Rall, Alan S. Nies, Palmer Iylor, *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 8ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, págs 1095-1101.
- 2 Chemical & Engineering News, October 30, 2000, págs. 38-66.
- 3 Chemical & Engineering News, September 18, 2000, pág 15
- 4 Indicadores de Actividades Científicas y Tecnológicas, 2001, <http://www.siicyt.com.mx>
- 5 Phillip Kotler, *Dirección de la Mercadotecnia, Análisis, Planeación, Implementación y Control*, Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., págs : 349-389.
6. Dewnis G. Peters, John M. Hayes, Garg M. Hieftje, *Chemical separations and measurements, Theory and practice of Analytical Chemistry*, pág 485
7. R. A Day, Jr, A. L. Underwood, *Química Analítica Cuantitativa*, Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., 1989, pág. 529.
8. Robert L Bunch, James M. McGuire, *Erythromycin, its salts, and method of preparation*, U.S. Patent 2,653,899.
9. M Valcárcel Cases, A. Gómez Hens, *Técnicas Analíticas de Separación*, Editorial Reverté S.A., 1988, pág 53.
- 10 Jerry March, *Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, 1992, pág. 879.
- 11 Stanley R. Sandler, Wolf Karo, *Organic Chemistry, Volume I*, Academic Press Inc. 1983, pág. 289.
12. A. I. Vogel, *J. Chem Soc.*, 1948, 624, 644, 674.
13. Edwin Haslam., *Tetrahedron*, 1980, 36, 2409.
- 14 William P. Jencks., *J Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 475.
- 15 Jack Hine, R. C Dempsey, R. A. Evangelista, et. al, *J. Org. Chem.*, 1977, 42, 1593

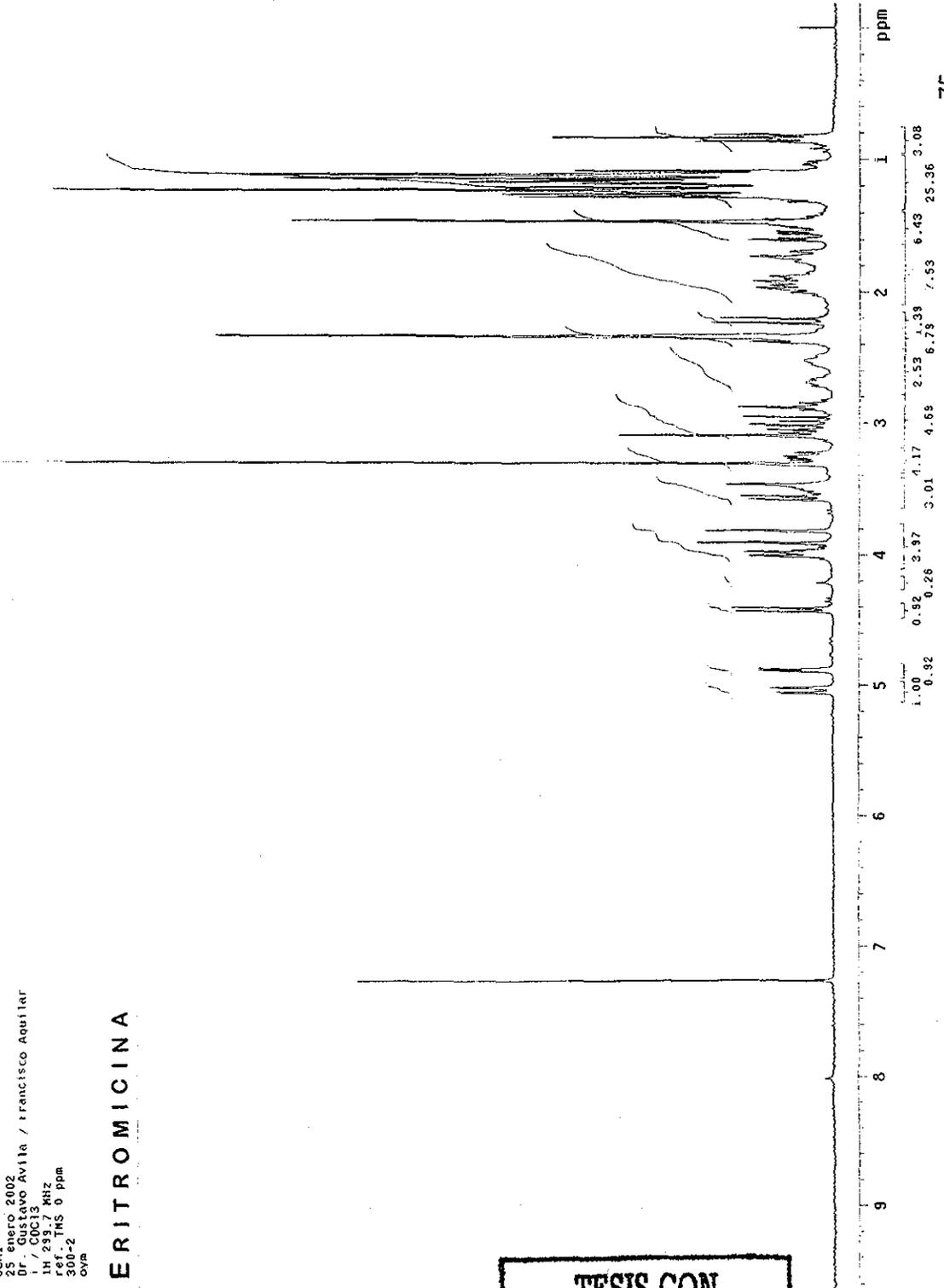
16. Thomas H. Lowry, Kathleen Schueller Richardson, *Mechanism and Theory In Organic Chemistry*, Second Edition, Harper & Row, Publisher, New York 1981, págs. 635-642
17. Samuel R. Maynez, *J. Org. Chem.*, 1975, 40, 3302.
18. Jessica E. Reimann, William P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 3973.
19. Eberhard Buehler, *J. Org. Chem.*, 1967, 32, 261.
20. Peter A S Smith, Jerry E. Robertson, *J Am Chem Soc.*, 1962, 84, 1197.
21. E. J. Corey, J L. Gras, and P. Urlich, *Tetrahedron. Lett.*, 1976, 809.
22. Mitsuiro Yoshimatsu, I. Sato, M. Hori, and T. Kataoka, *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 1011.
23. Solange Gouin d'Ambrieres, André Lutz, Jean-Claude Gasc, *Novel Erythromycin a derivatives*, U. S. Patent 4,349,545.
24. *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Merck & Co., Inc., Twelfth Edition, 1989, págs 625-627.

8. ESPECTROSCOPIA



USAI
25 enero 2002
Dr. Gustavo Avila / Francisco Aguilar
I. / C0C13
IN / 293.7 Khz
SOL. THS 0 ppm
OVR

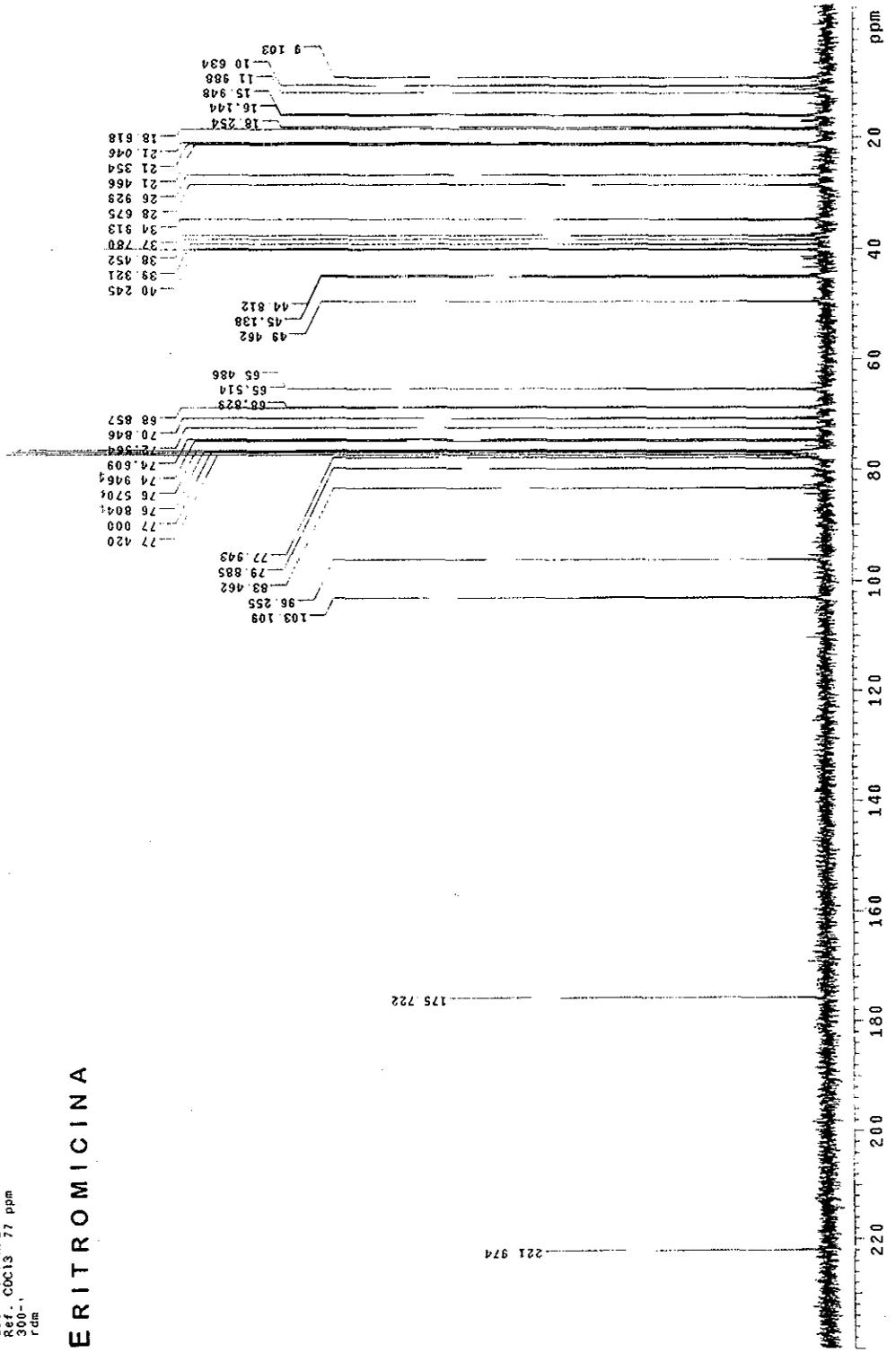
ERITROMICINA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

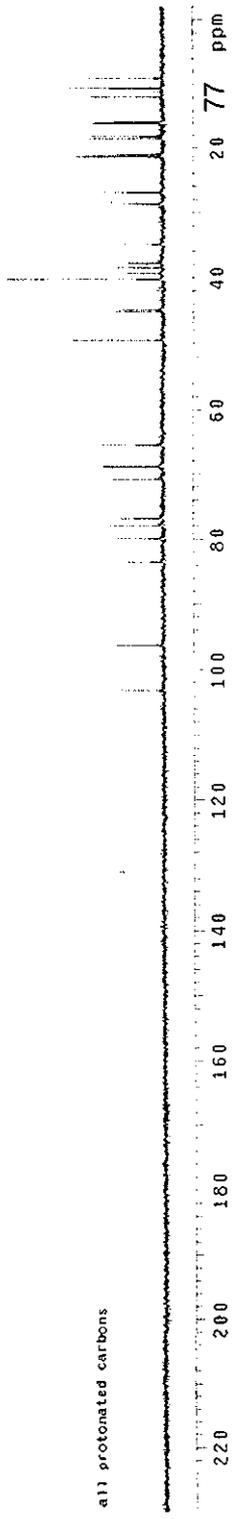
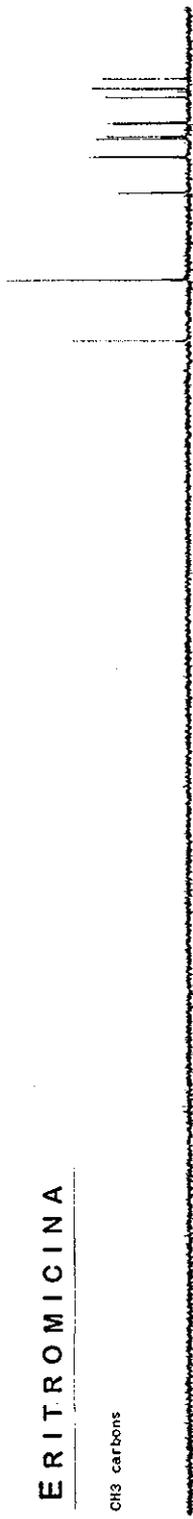
USAT
01/FEVERO/2002
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilar
I/COC13
13C 75.5 MHZ
Ref. COC13 77 ppm
300-1
rdm

ERITROMICINA



USAI
01/FEBRERO/2002
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilar
1/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
Fdm

ERITROMICINA

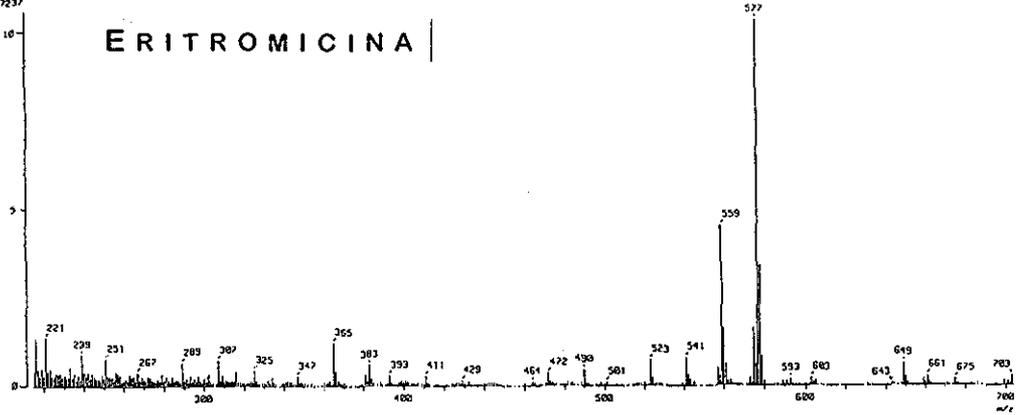


[Mass Spectrum]
RT : 1.31 min
Ion Mode : FRB
1787237

Scan : (8,12)
Int. : 1559,98

Temp : 5.4 deg C

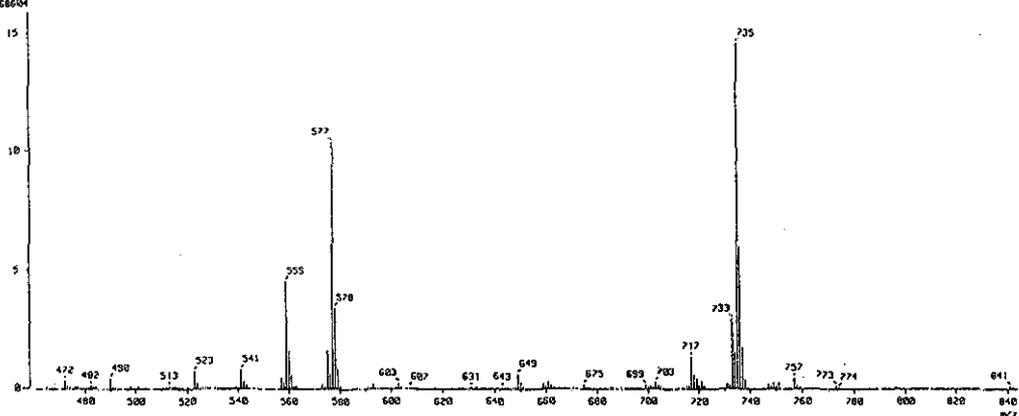
ERITROMICINA



[Mass Spectrum]
RT : 1.31 min
Ion Mode : FRB
2668604

Scan : (8,12)
Int. : 1559,98

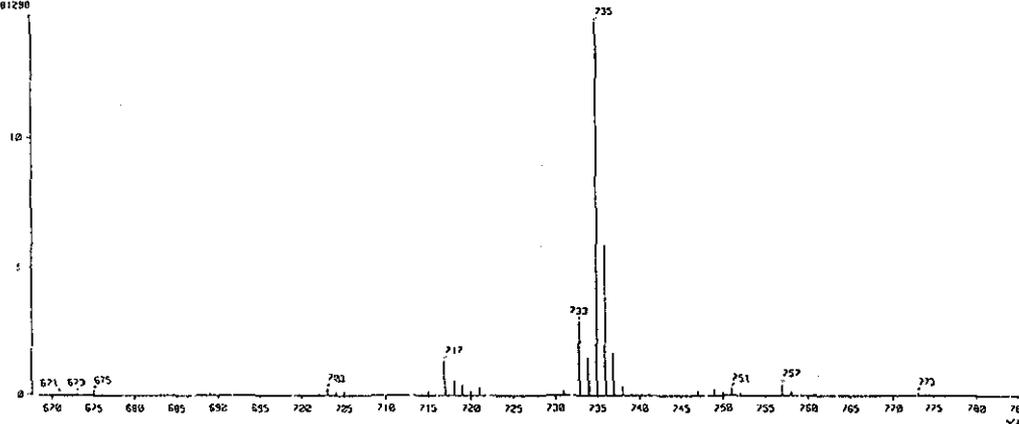
Temp : 5.4 deg C



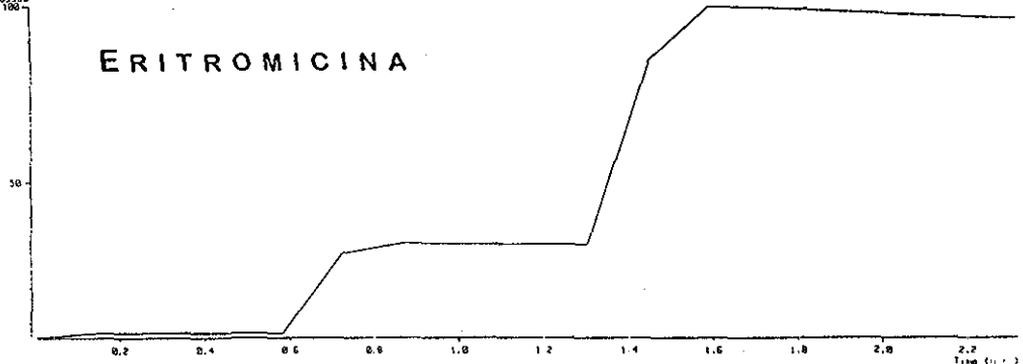
[Mass Spectrum]
RT : 1.31 min
Ion Mode : FRB
2481280

Scan : (8,12)
Int. : 1559,98

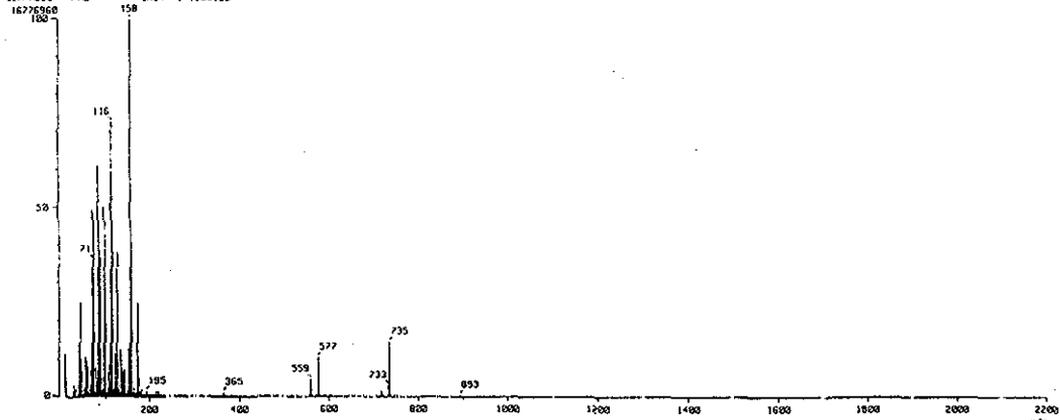
Temp : 5.4 deg C



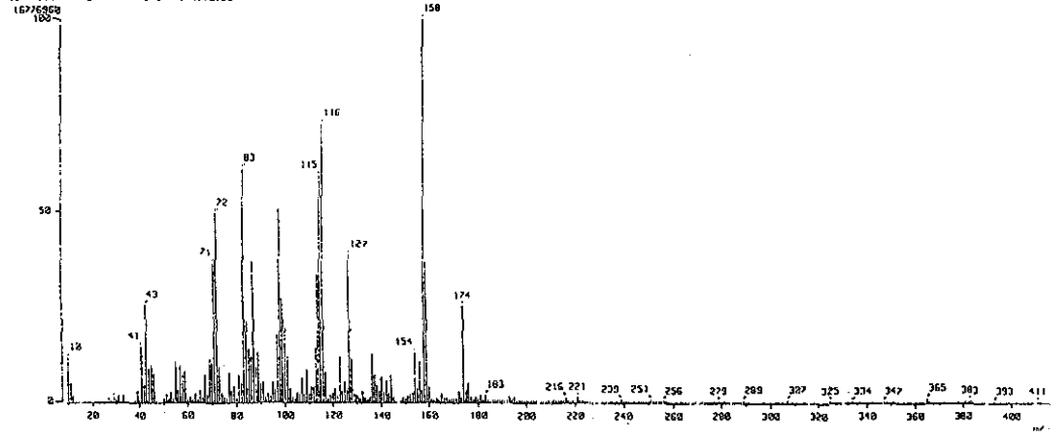
[TIC]
 Date : 01-Feb-1992 09:24
 Sample: MR1R1Z.F00
 Note: Unidad de Servicio de Apoyo: a la Investigación (USAI) F.O. UNAM
 Inlet: Direct Ion Mode: FID
 Ion Source: Heated Ion (FID) Ion Mode: FID
 TIC Range: m/z 18 to 2200 Output RT Range: 0.00 to 2.32 min
 24465560



[Mass Spectrum]
 RT: 1.31 min Scan#: (8,12) Temp: 5.4 deg C
 Ion Mode: FID Int.: 1599.98

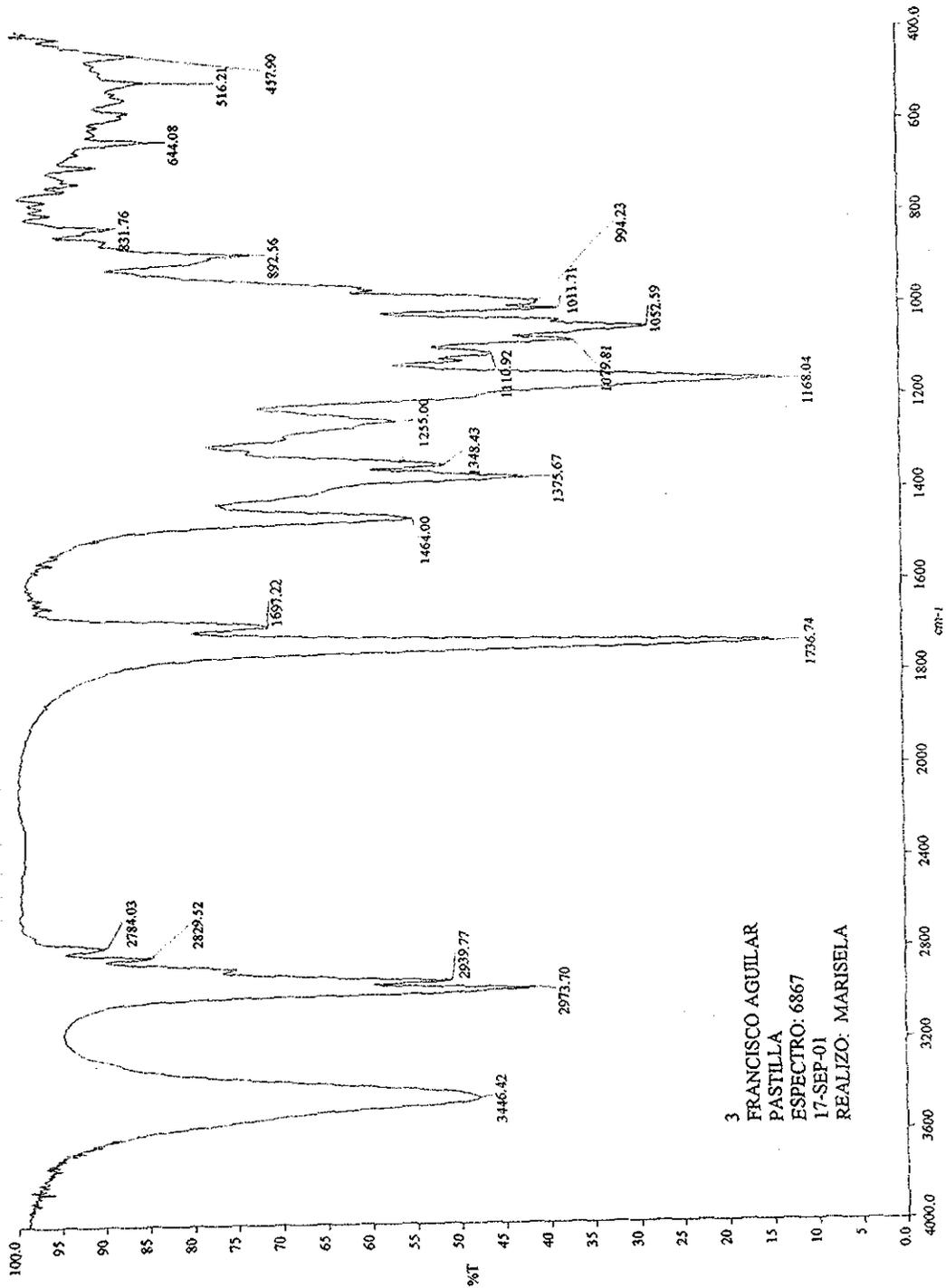


[Mass Spectrum]
 RT: 1.31 min Scan#: (8,12) Temp: 5.4 deg C
 Ion Mode: FID Int.: 1599.98



ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

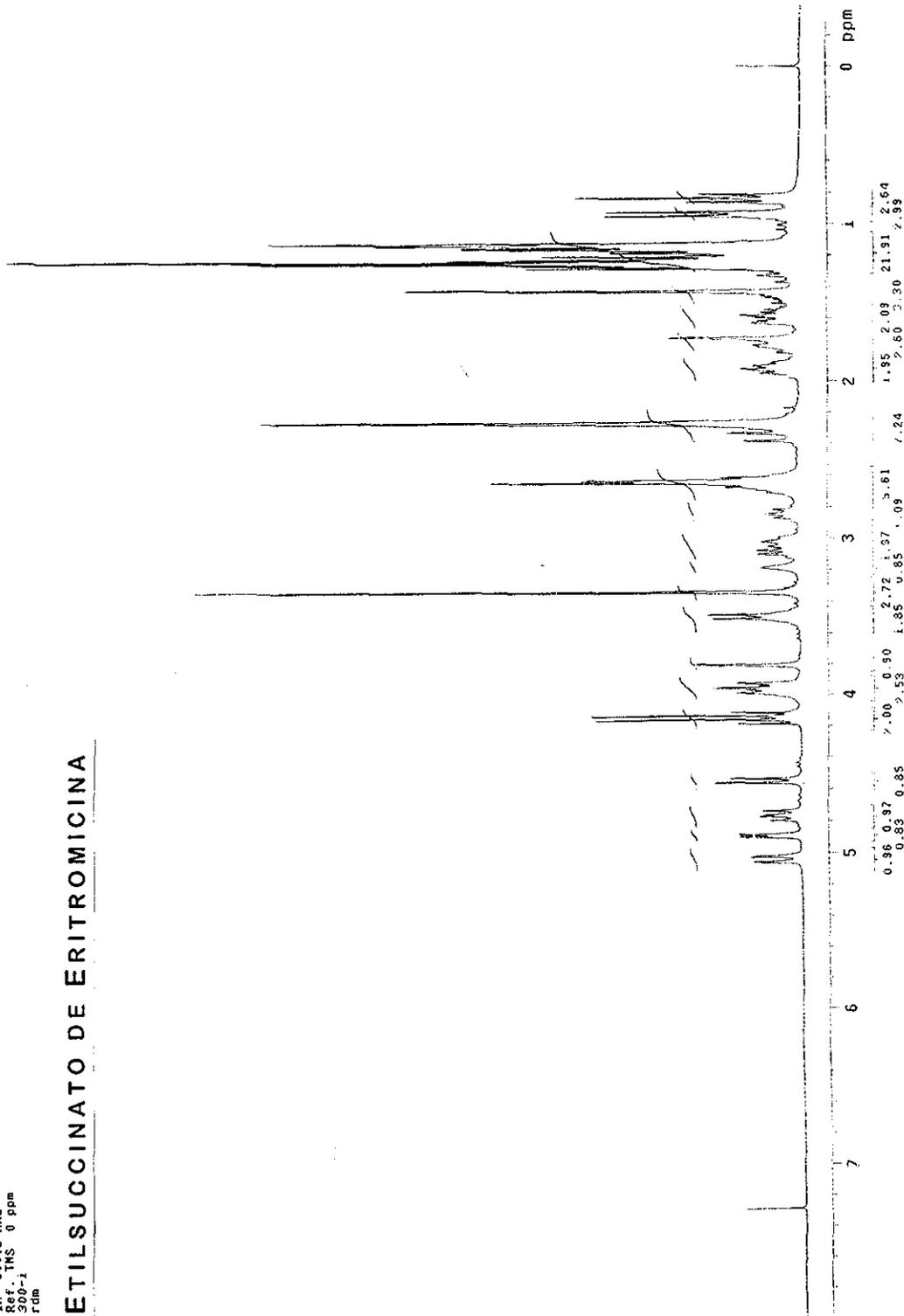
ETILSUCCINATO DE ERITROMICINA



3 FRANCISCO AGUILAR
PASTILLA
ESPECTRO: 6867
17-SEP-01
REALIZO: MARISELA

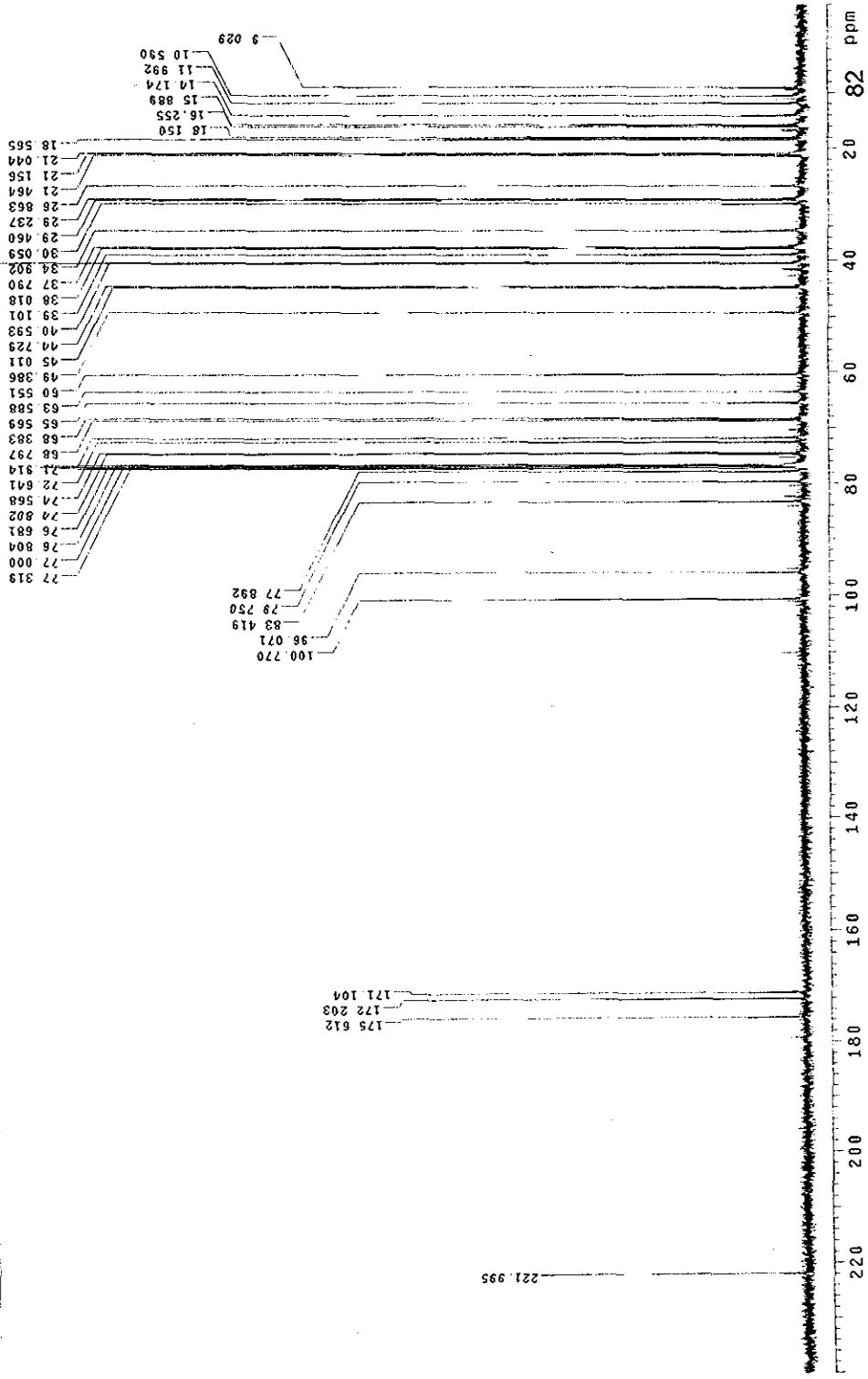
USAI
25/SEPTIEMBRE/2001
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguiar
3/CDC13
IH 300.2 MHZ
Ref. TMS 0 ppm
300-1
FDM

ETILSUCCINATO DE ERITROMICINA



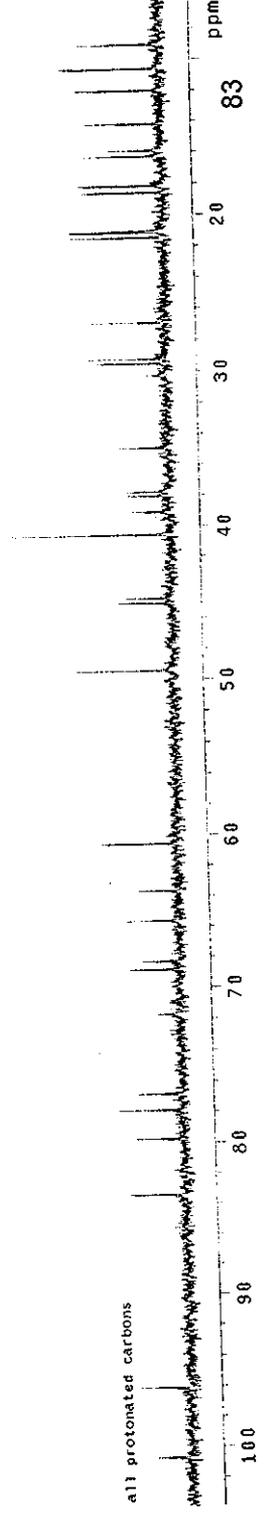
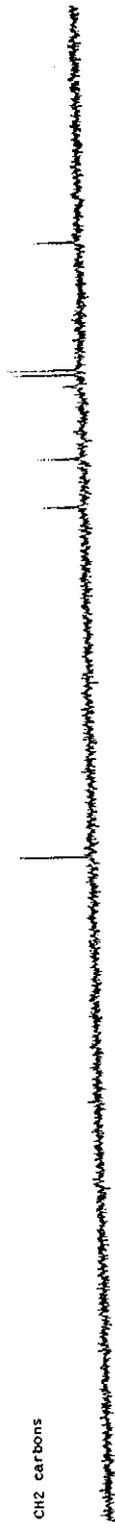
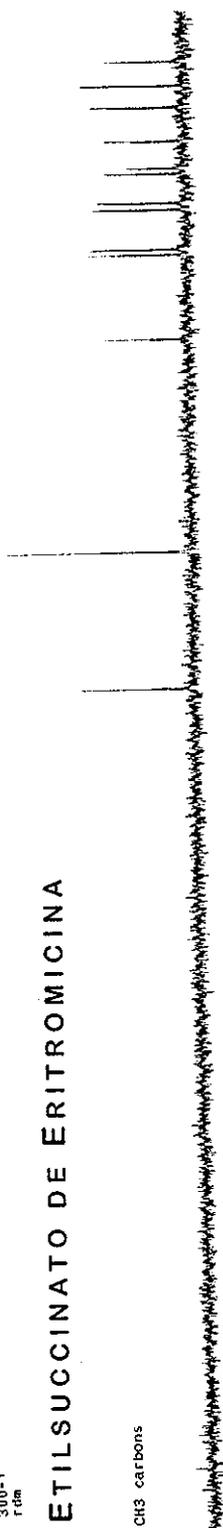
USAI
06/FEBRERO/2002
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilera
3/CDC13
13C 100 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
Tom

ETILSUCCINATO DE ERITROMICINA



USA1
22/MARZO/2002
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilar
3/CDC13
13C 75.5 MHZ
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
r dm

ETILSUCCINATO DE ERITROMICINA

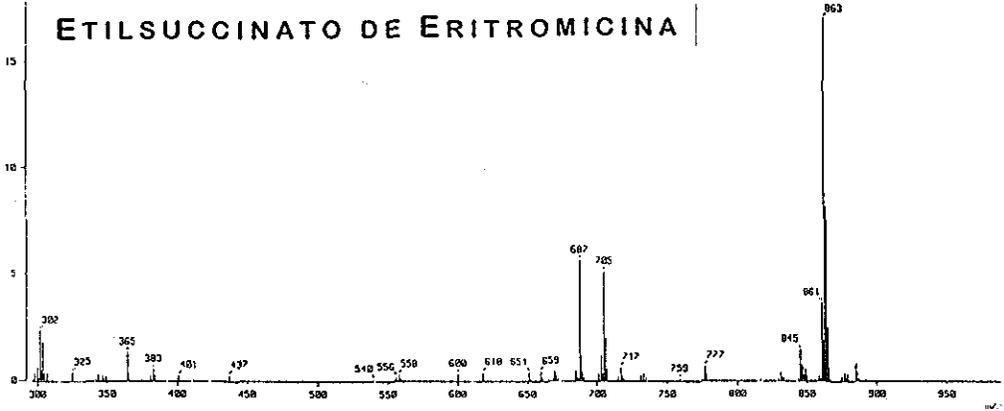


[Mass Spectrum]
RT : 2.17 min
Ion Mode : FID

Scan# : (14,10)
Int. : 1022.15

Temp : 6.4 deg C

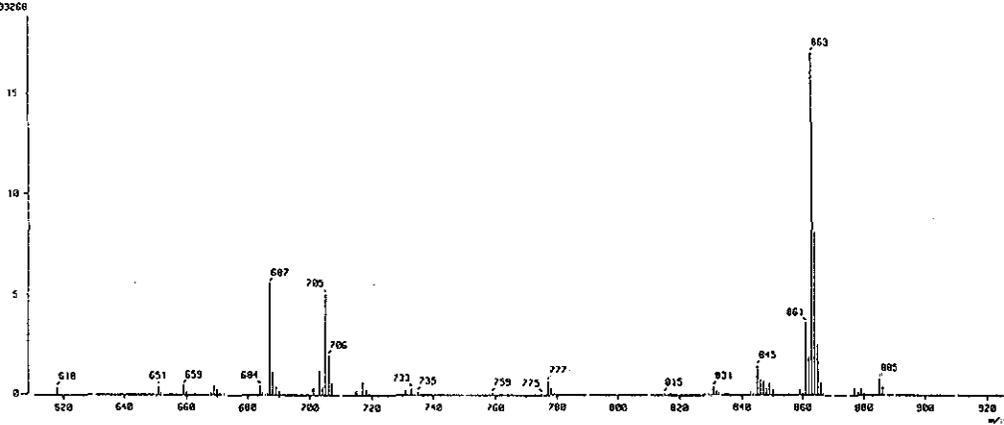
ETILSUCCINATO DE ERITROMICINA



[Mass Spectrum]
RT : 2.17 min
Ion Mode : FID

Scan# : (14,10)
Int. : 1022.15

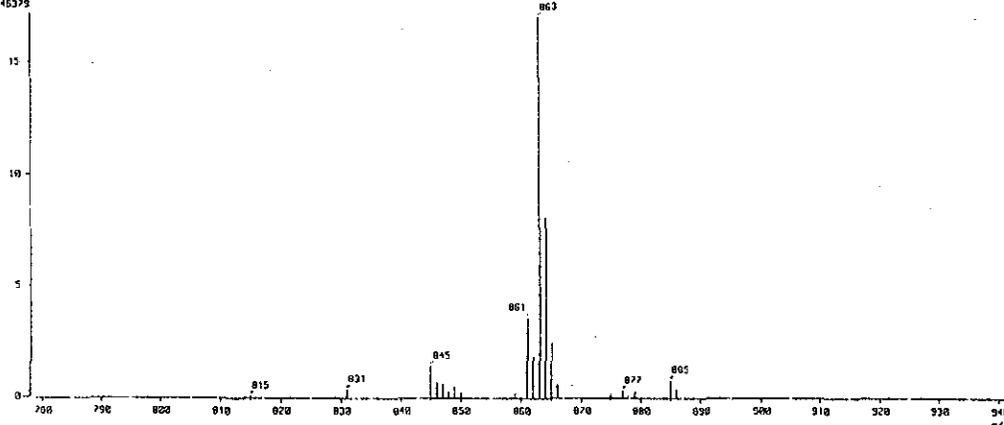
Temp : 6.4 deg C



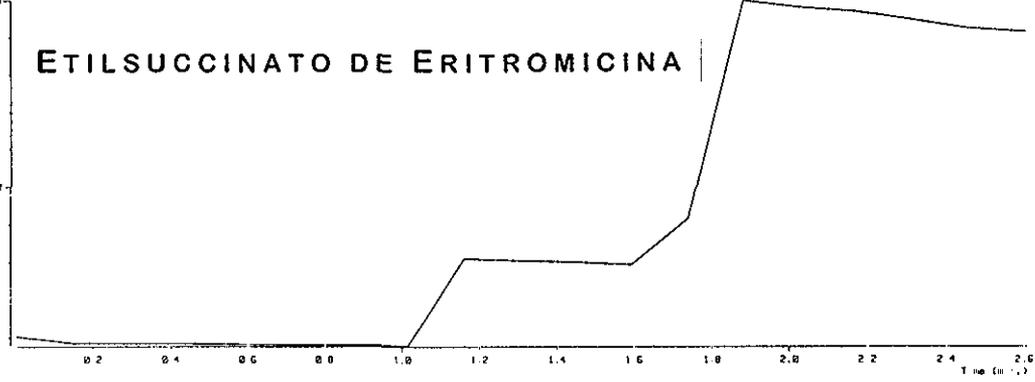
[Mass Spectrum]
RT : 2.17 min
Ion Mode : FID

Scan# : (14,10)
Int. : 1022.15

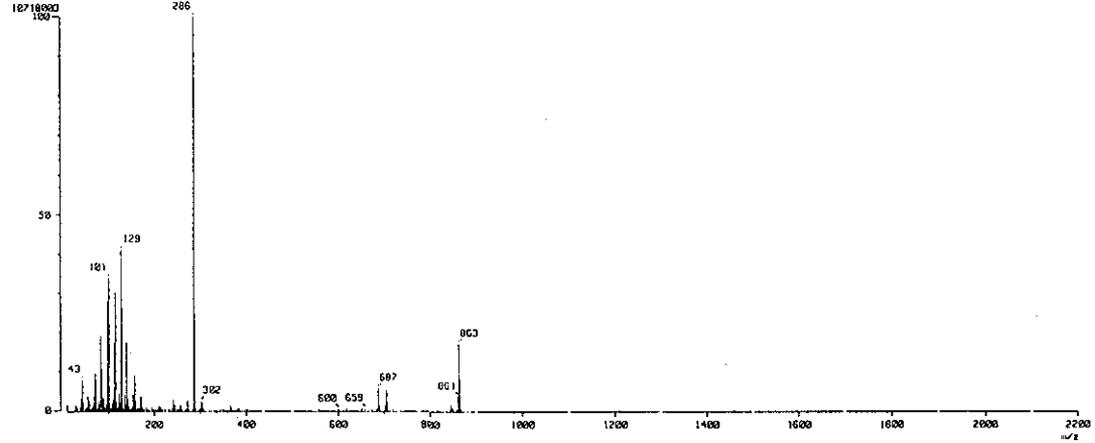
Temp : 6.4 deg C



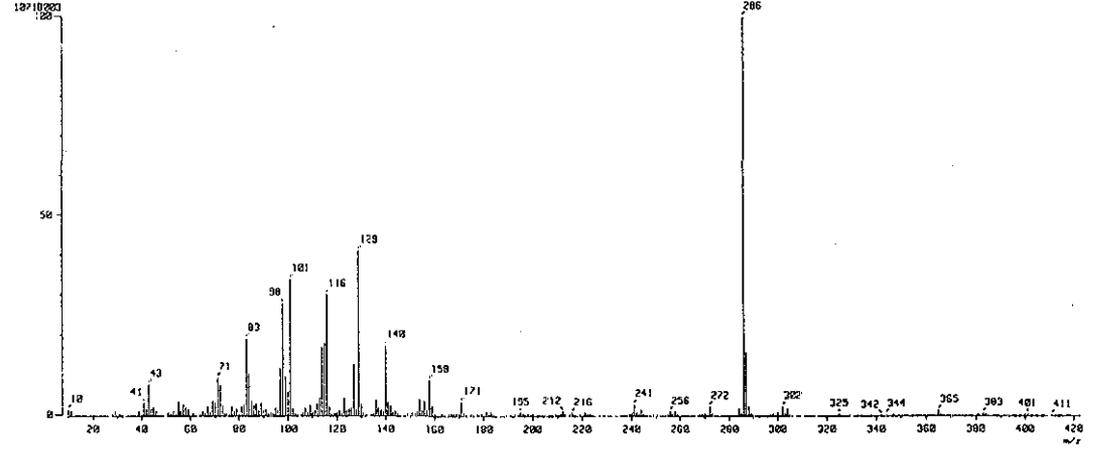
[TIC]
 Date : 014245-9-ERITR-ETILSUCCIN Date : 01-Feb-1992 18:24
 Sample: MTR12.FIN
 Note : Unidad de Servicio de Referencia de la Invencción (USRI) F.O. LAMM
 Inlet : Direct Ion Mode : FID
 Ion Source : Normal Ion (M⁺-L. res.)
 TIC Range : 4.2 to 22.0 Output RT Range : 8.00 to 2.61 min
 74507128



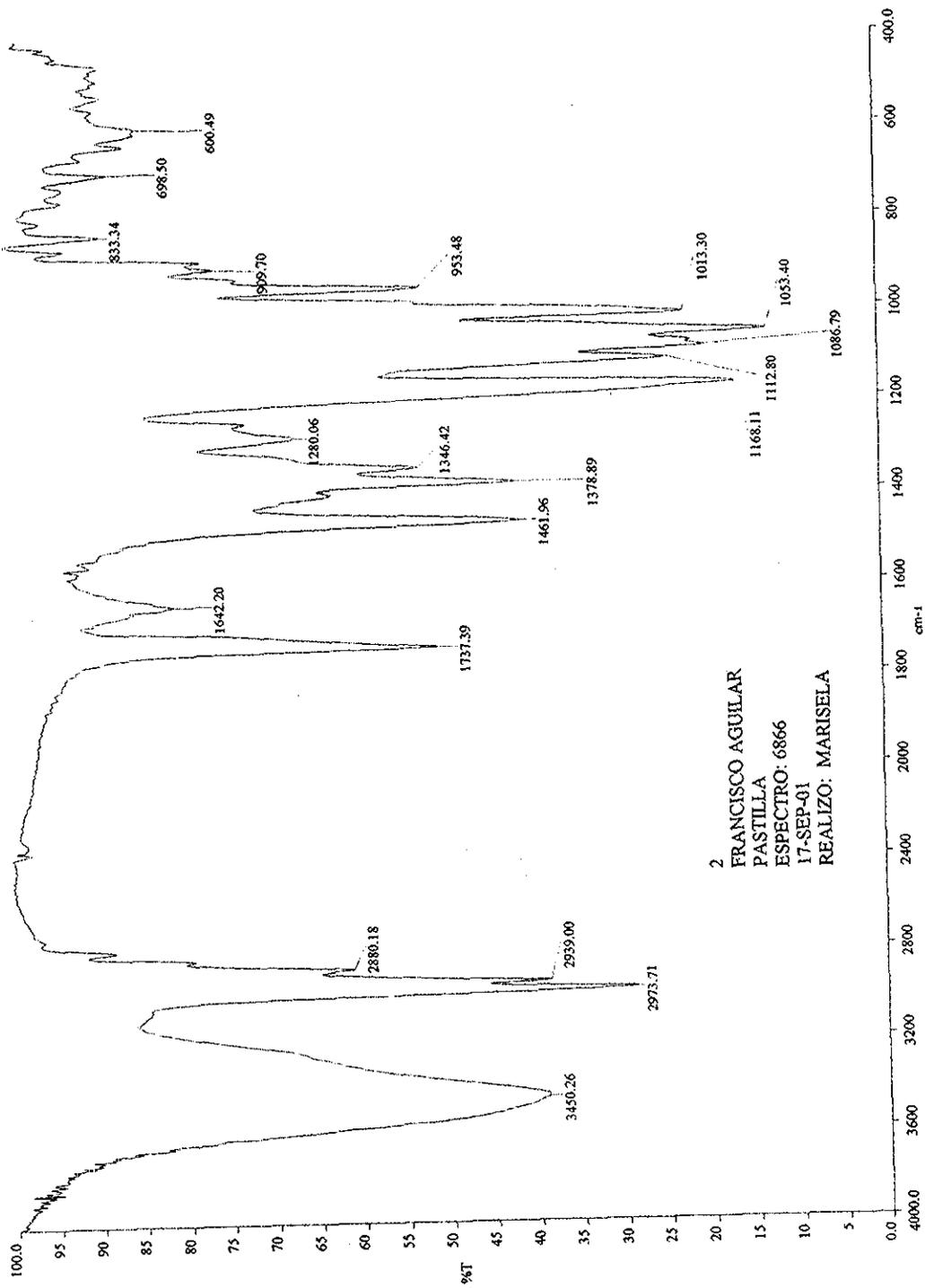
[Mass Spectr.]
 RT : 2.17 min Scan # : (14, 18)
 Ion Mode : FID Int : 1022.15
 Temp : 6.4 deg C



[Mass Spectr.]
 RT : 2.17 min Scan # : (14, 18)
 Ion Mode : FID Int : 1022.15
 Temp : 6.4 deg C



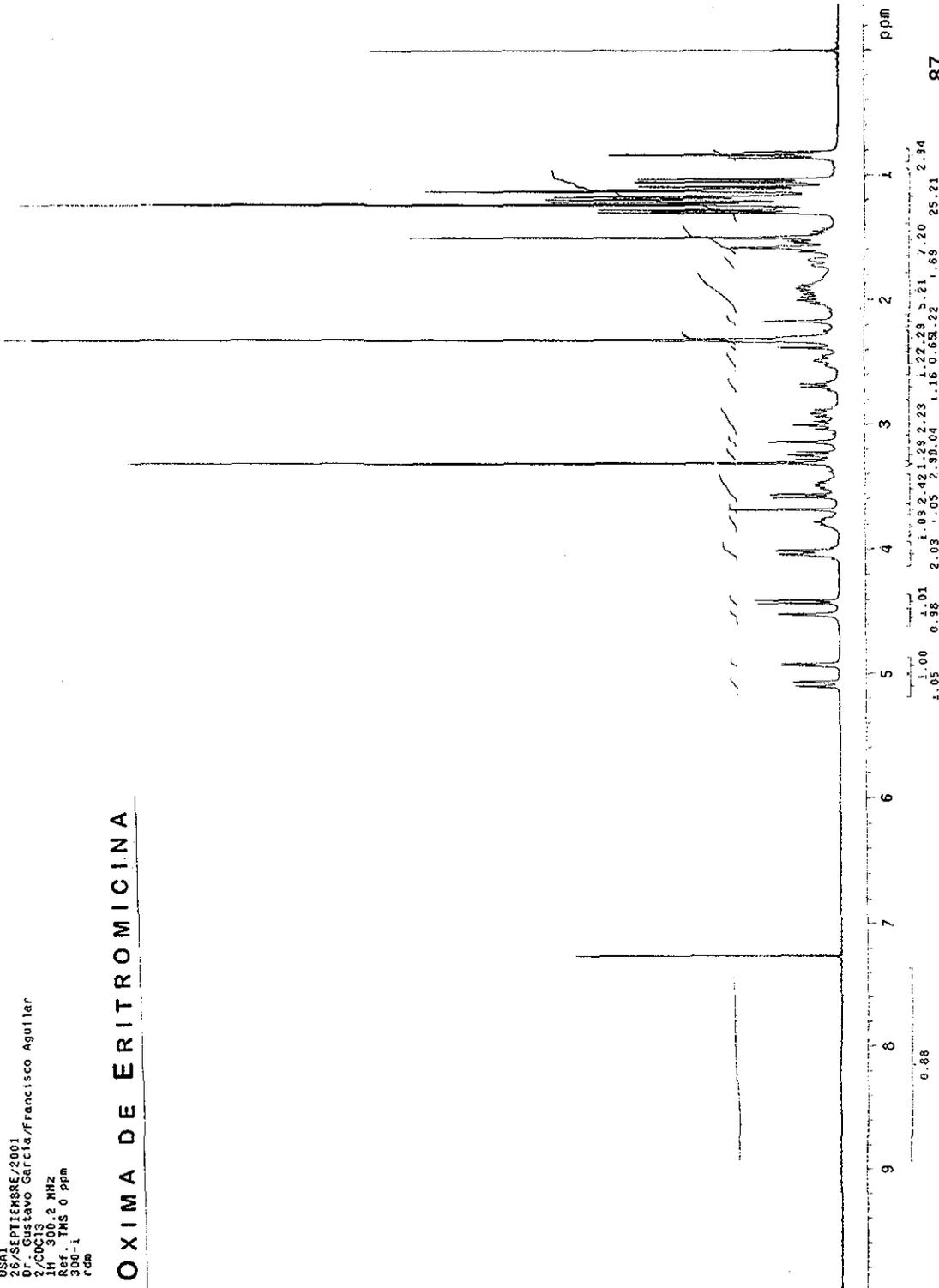
OXIMA DE ERITROMICINA



2 FRANCISCO AGUILAR
PASTILLA
ESPECTRO: 6866
17-SEP-01
REALIZO: MARISELA

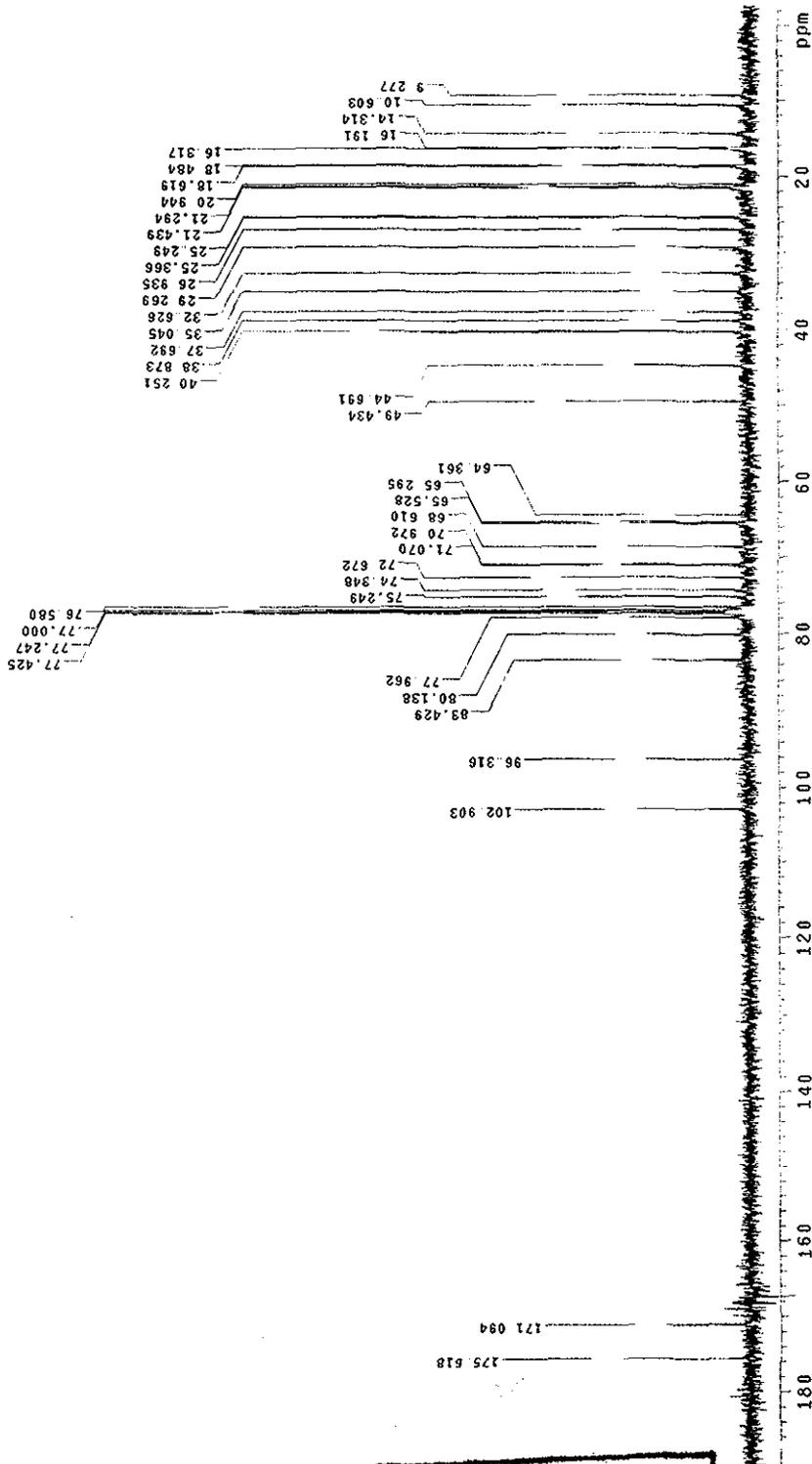
USAI
26/SEPTIEMBRE/2001
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilar
2/CDC18
IH 300.2 MHz
300-1 TMS 0 ppm
rda

OXIMA DE ERITROMICINA



USAI
22 Mayo 2002
Dr. Gustavo Garcia / Francisco Aguilar
2, CQC13
130 75.5 MHz
ref. CQC13 77 ppm
300-;
Ovm

OXIMA DE ERITROMICINA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

USAI
22 marzo 2002
Dr. Gustavo García / Francisco Aguilar
2 / CDC13
13C 75.5 MHz
ref. CDC13 77 ppm
300-1
Oym

OXIMA DE ERITROMICINA

CH3 carbons



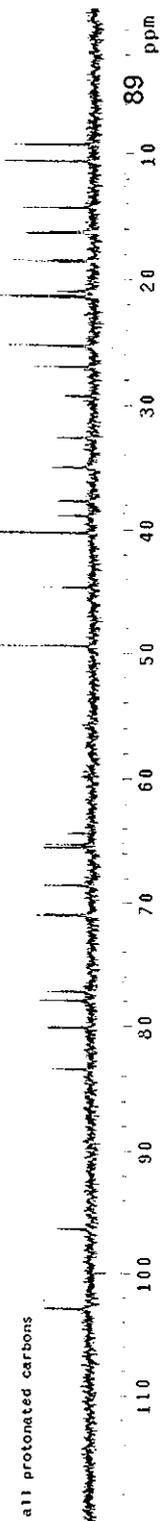
CH2 carbons



CH carbons



all protonated carbons



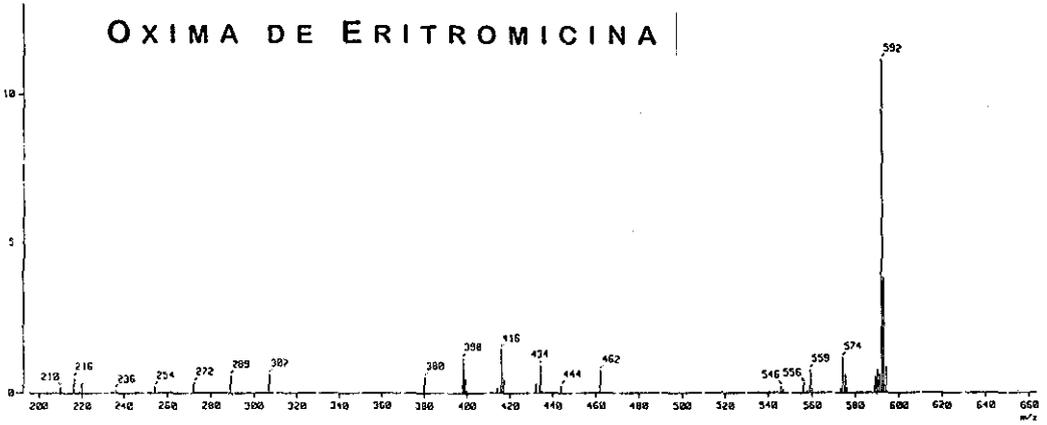
110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 89 ppm

[Mass Spectrum]
RT : 2.03 min
Ion Mode : FAB
728054

Scan# : (10,20)
Int. : 531.67

Temp. : 5.4 deg C

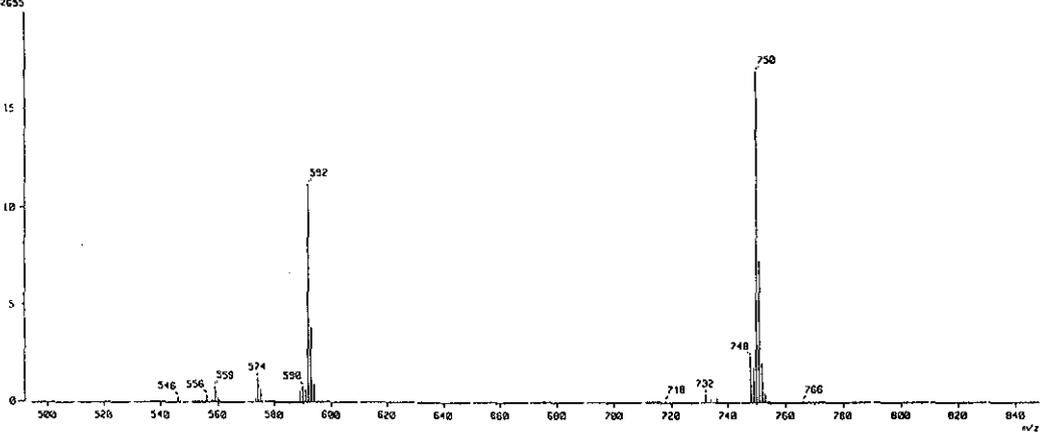
OXIMA DE ERITROMICINA



[Mass Spectrum]
RT : 2.03 min
Ion Mode : FAB
1112655

Scan# : (10,20)
Int. : 531.67

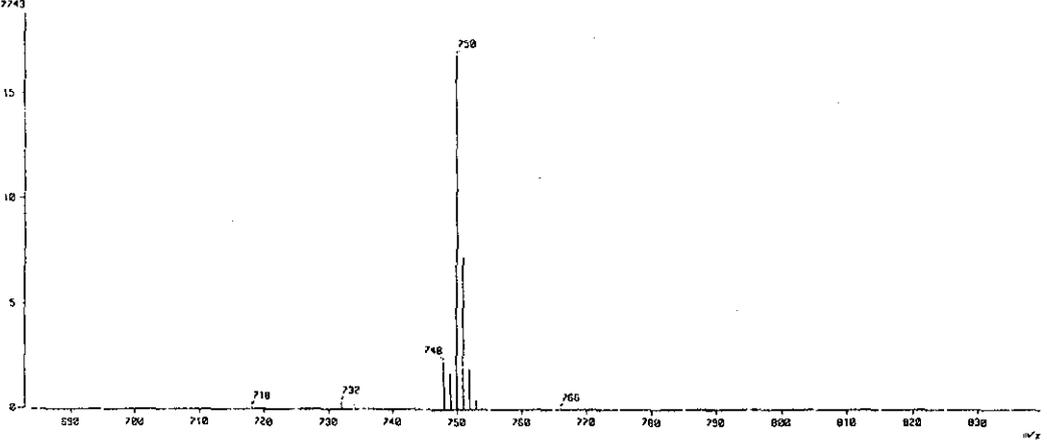
Temp. : 5.4 deg C



[Mass Spectrum]
RT : 2.03 min
Ion Mode : FAB
1042743

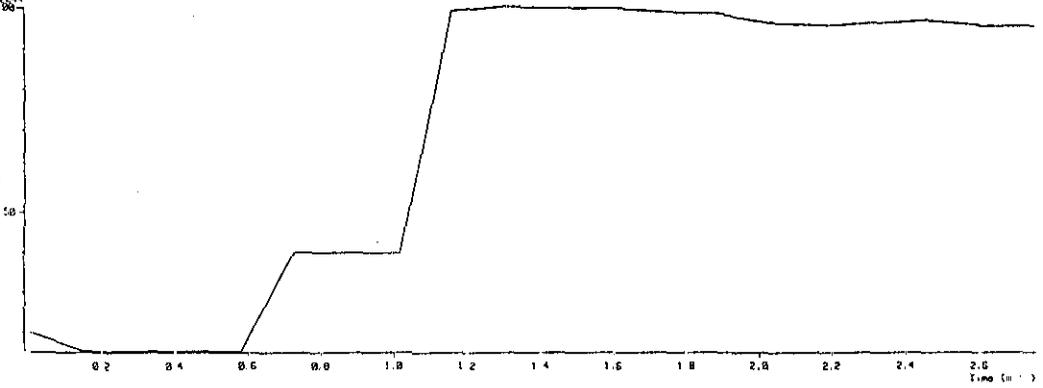
Scan# : (10,20)
Int. : 531.67

Temp. : 5.4 deg C

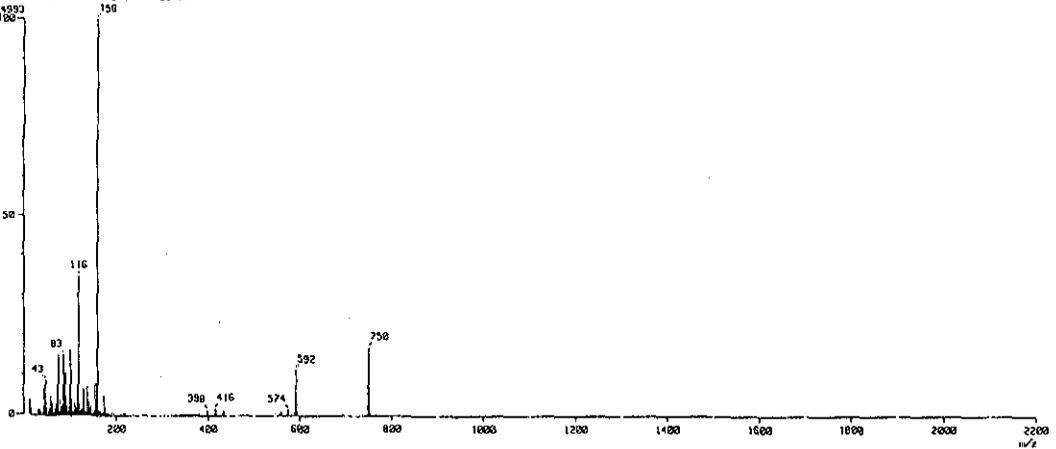


(TIC)
 Data : 014245-2-DR1TR-OX(19)_001 Date : 01-Feb-102 09:41
 Sample: HSTRIZI090
 Note : Unidad de Servicio de Análisis de Inveniente (USAI) F. Q. UNFM
 Intal : Direct
 Ion Species : Normal Ion (M+L) (m/z)
 TIC Range : m/z 10 to 2200 Output RT Range : 0.00 to 2.75 m
 2963224

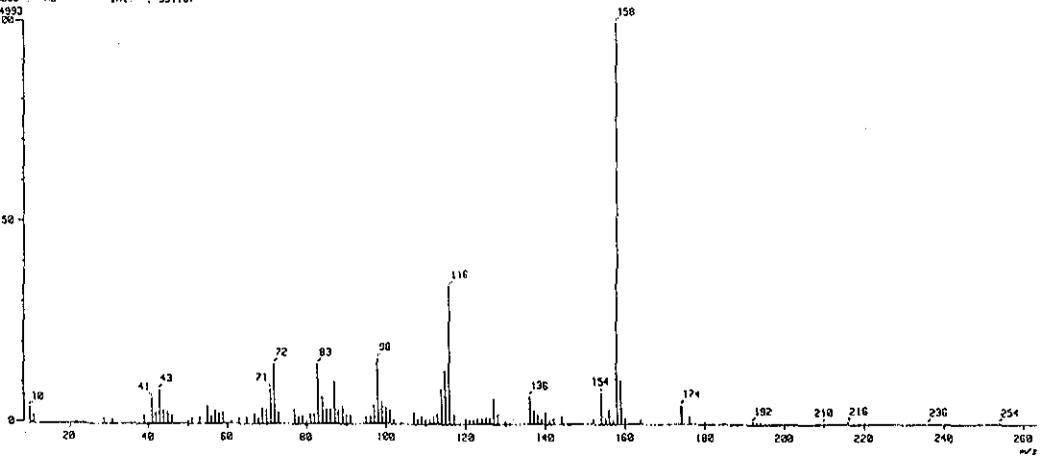
OXIMA DE ERITROMICINA

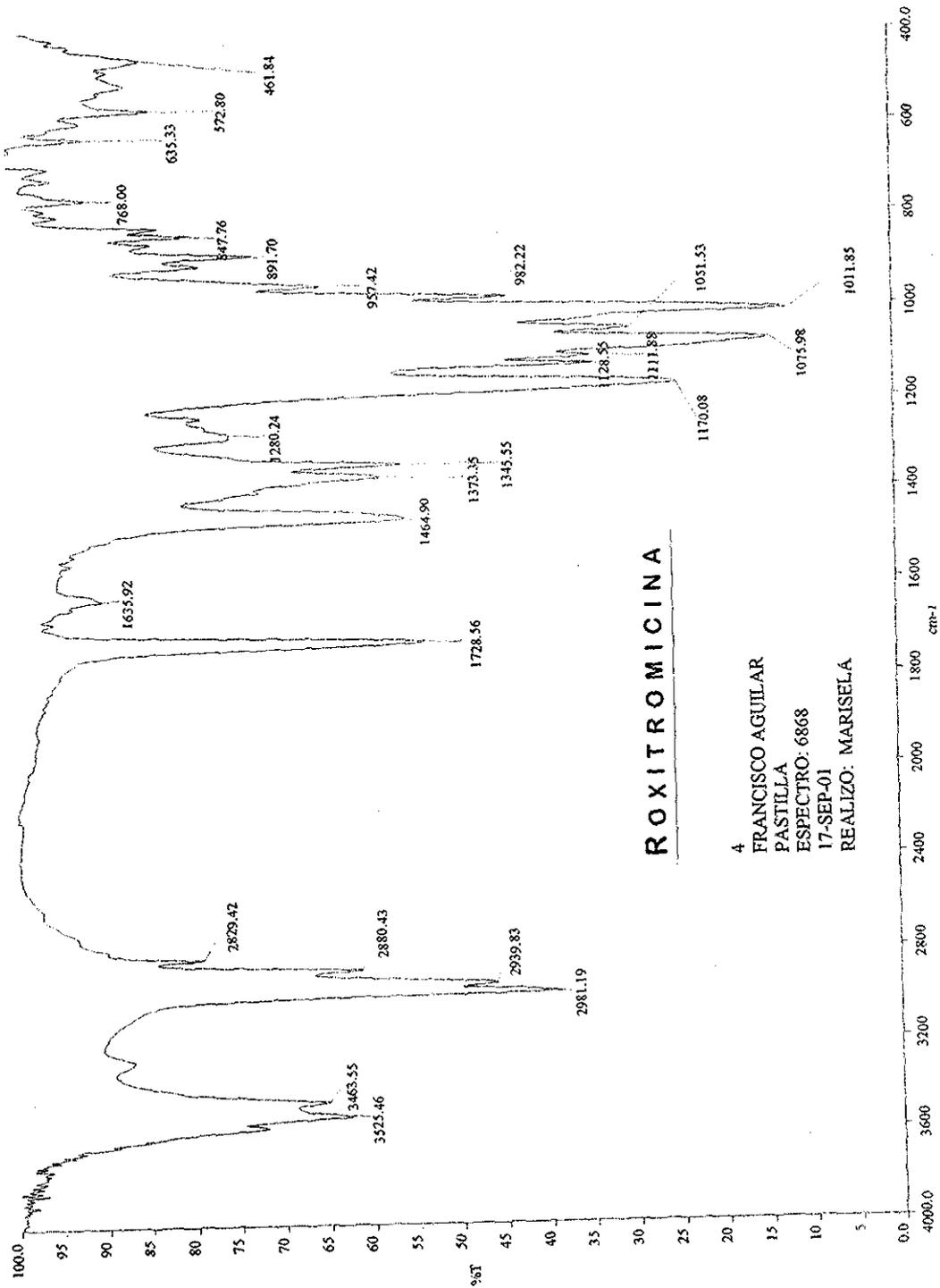


[Mass Spectrum]
 RT : 2.03 min Scan# : (10,20)
 Ion Mode : FID Int : 531.67
 557493



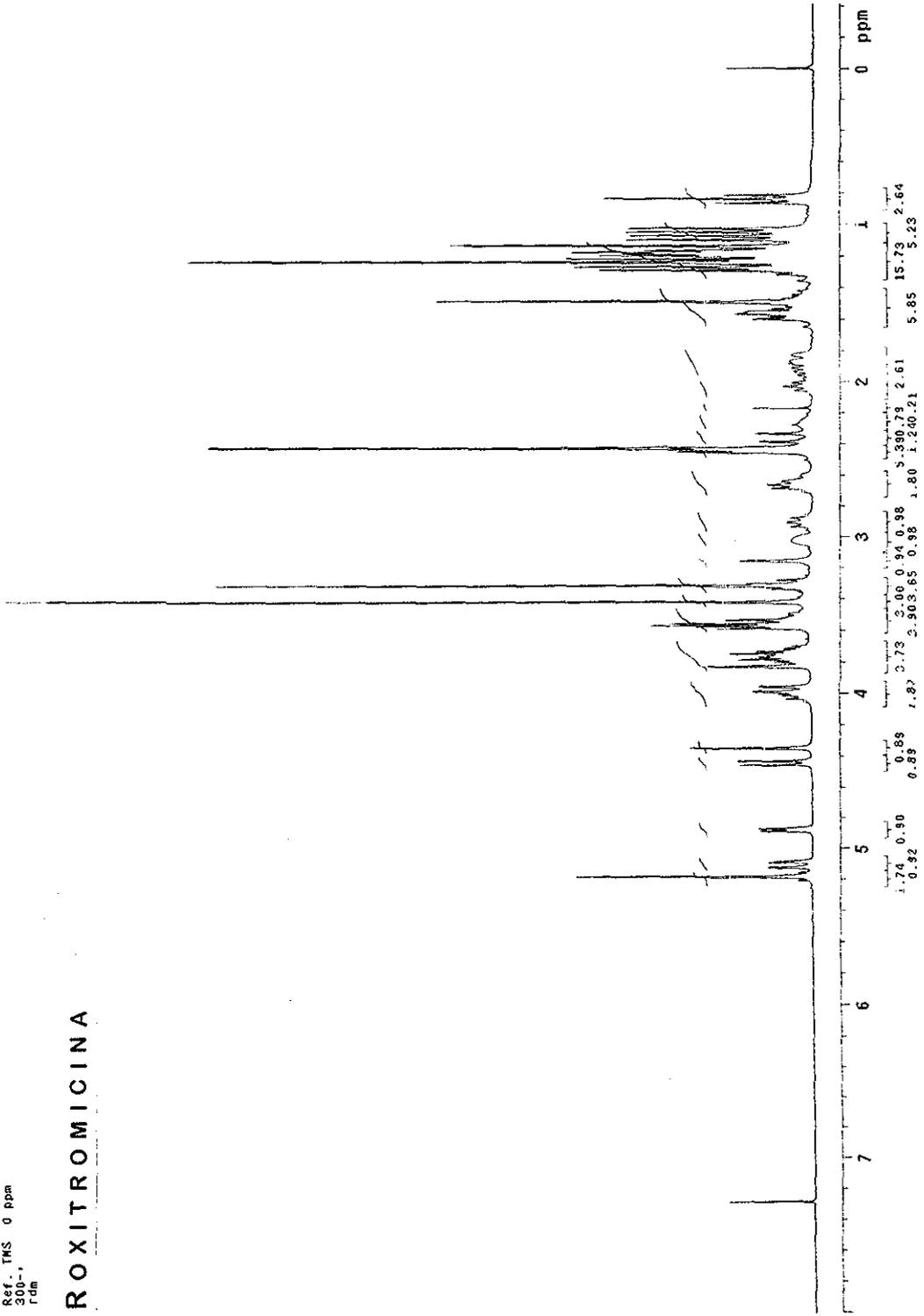
[Mass Spectrum]
 RT : 2.03 min Scan# : (10,20)
 Ion Mode : FID Int : 531.67
 557493





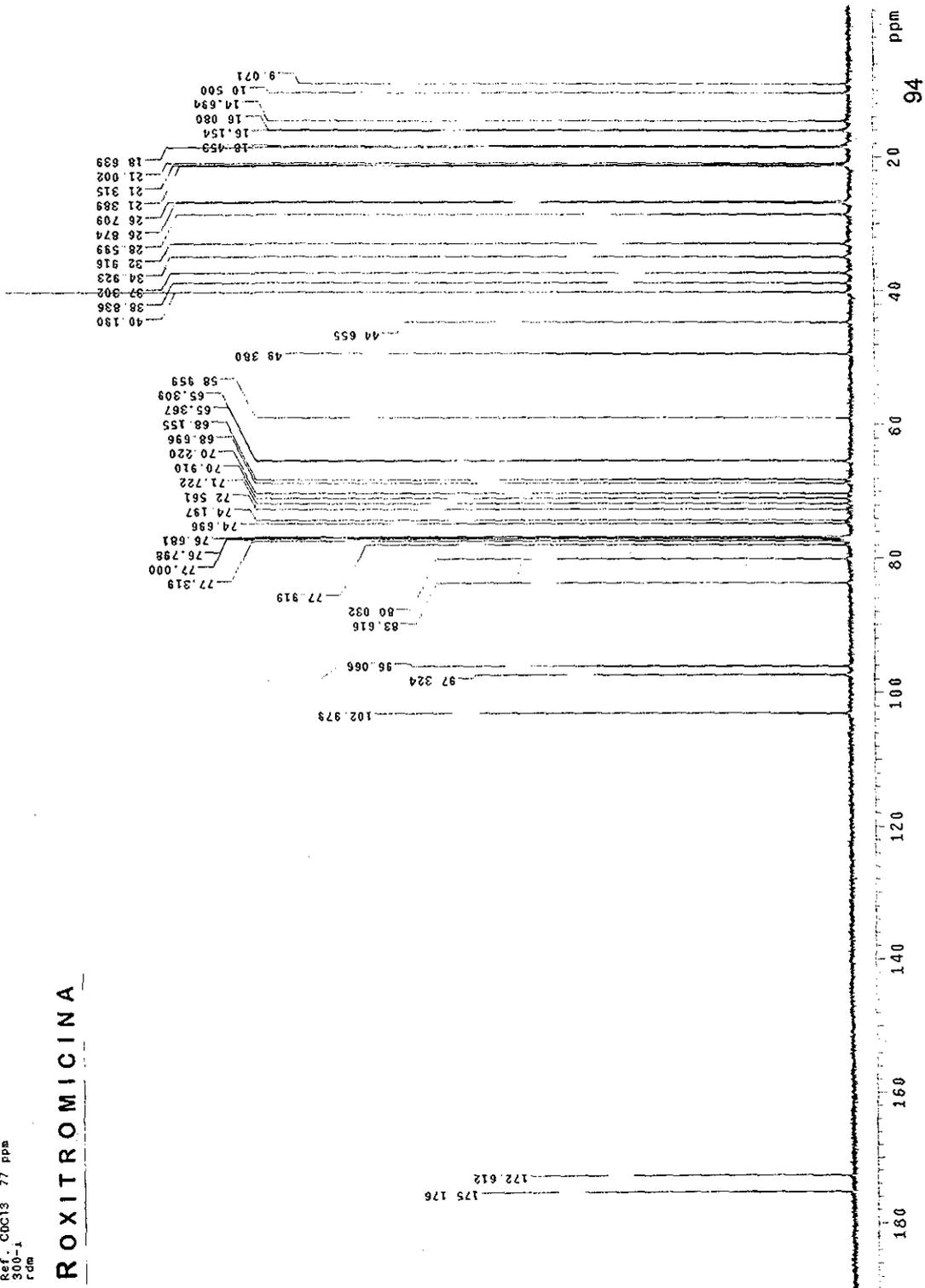
USAT
25 SEPTIEMBRE/2001
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilar
4/CDC13
1H 300.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-
rdm

ROXITROMICINA



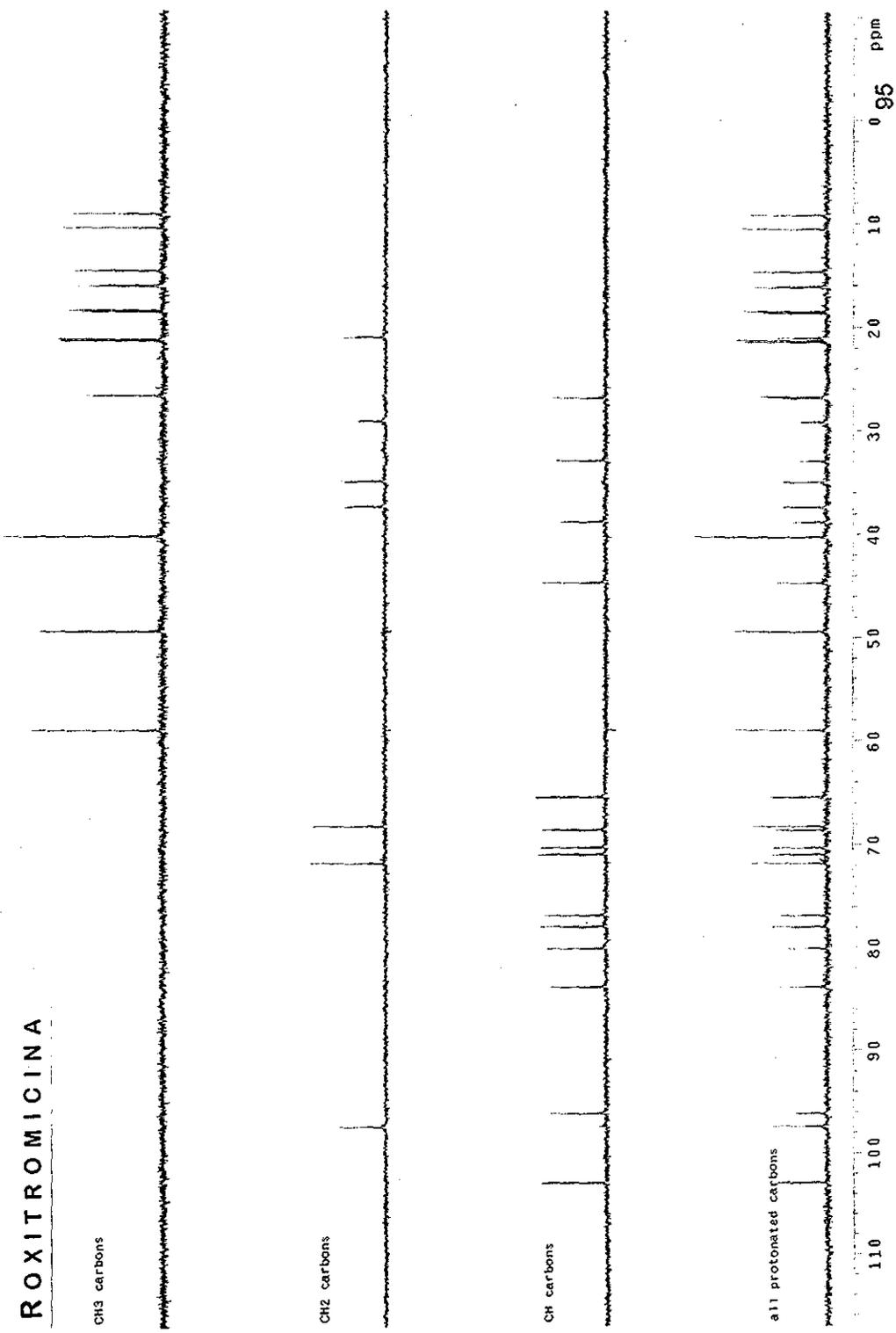
USAI
 06/FEBRERO/2002
 Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilar
 4/CDC13
 13C 100 MHz
 Ref.: CDC13 77 ppm
 300-1
 Tom

ROXITROMICINA



USAI
19/MAR20/2002
Dr. Gustavo Garcia/Francisco Aguilar
4/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-
rdm

ROXITROMICINA

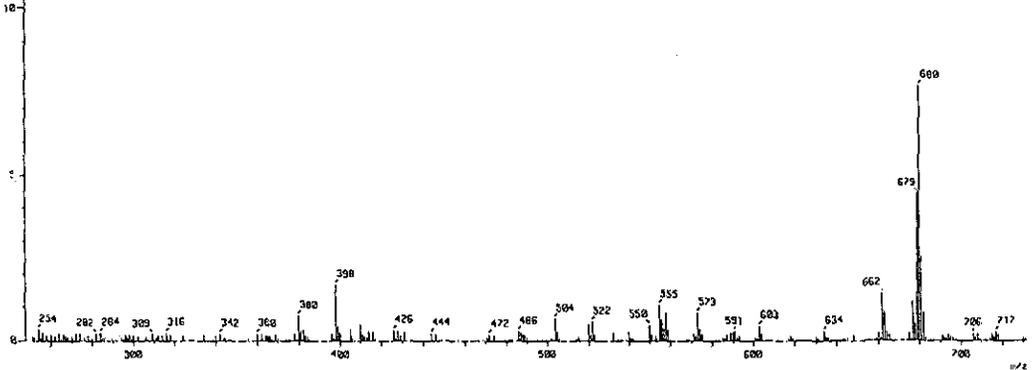


[Mass Spectr.]
RT : 3.19 min
Ion Mode : FIB
1979470

Scan# : (21,25)
Int. : 1599.98

Temp : 6.4 deg C

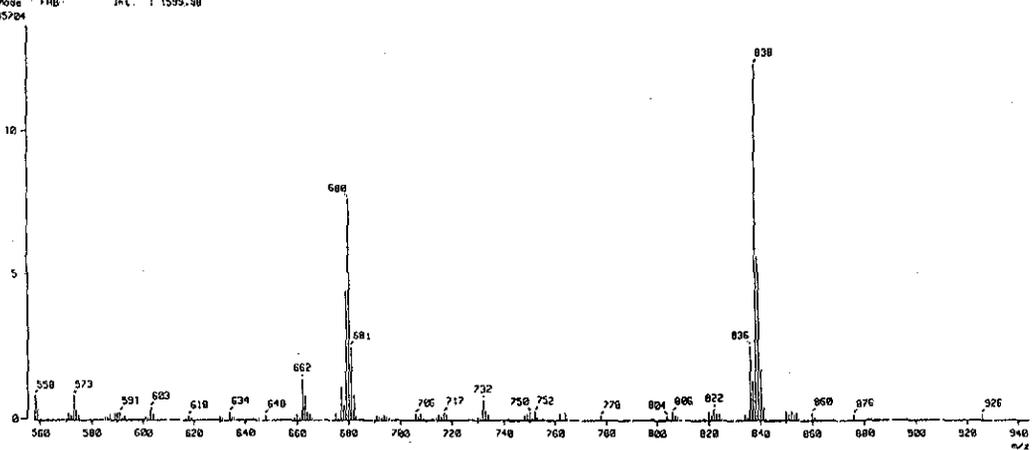
ROXITROMICINA



[Mass Spectr.]
RT : 3.19 min
Ion Mode : FIB
2285704

Scan# : (21,25)
Int. : 1599.98

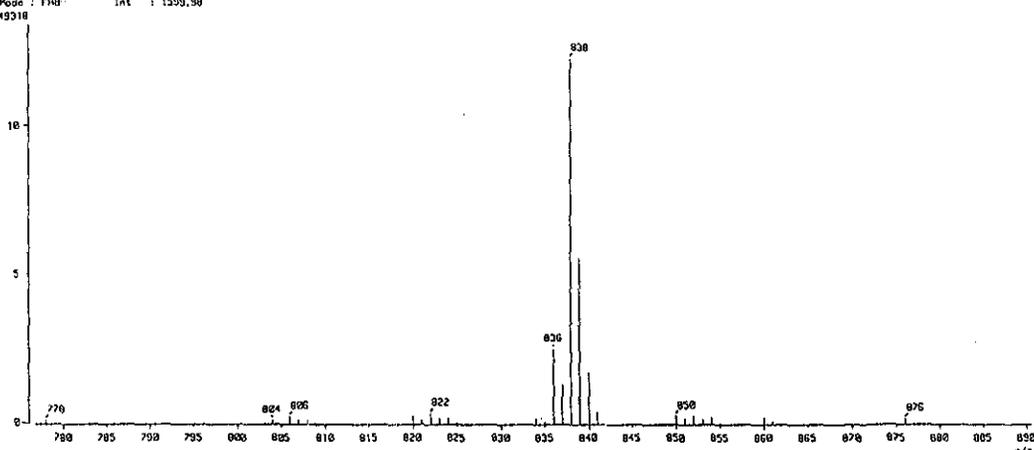
Temp : 6.4 deg C



[Mass Spectr.]
RT : 3.19 min
Ion Mode : FIB
2249318

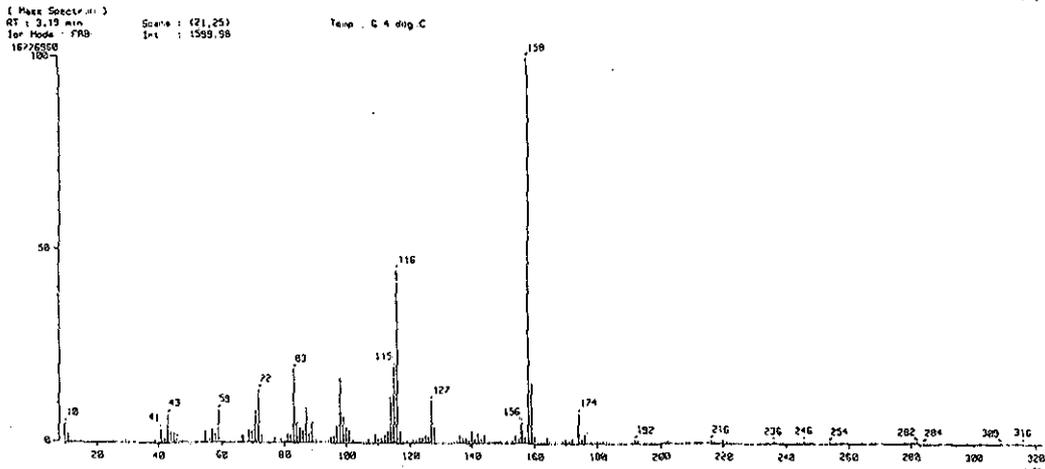
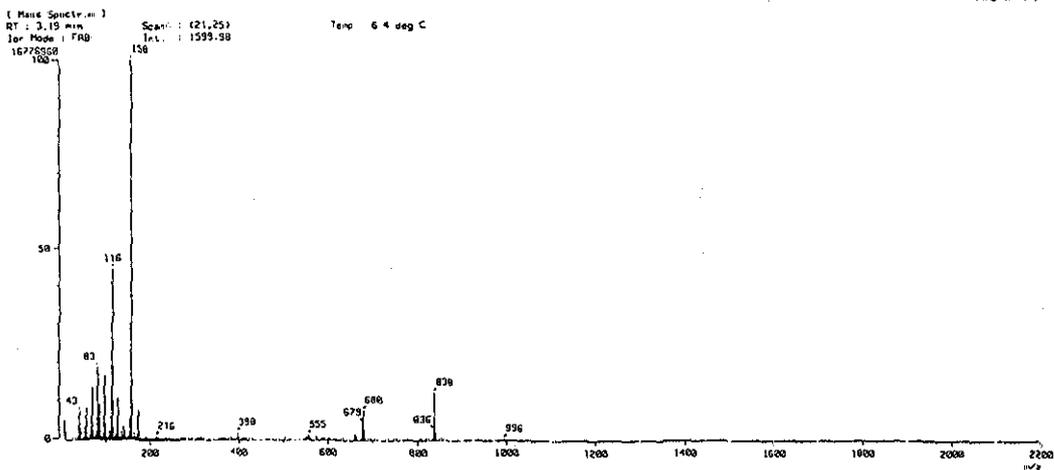
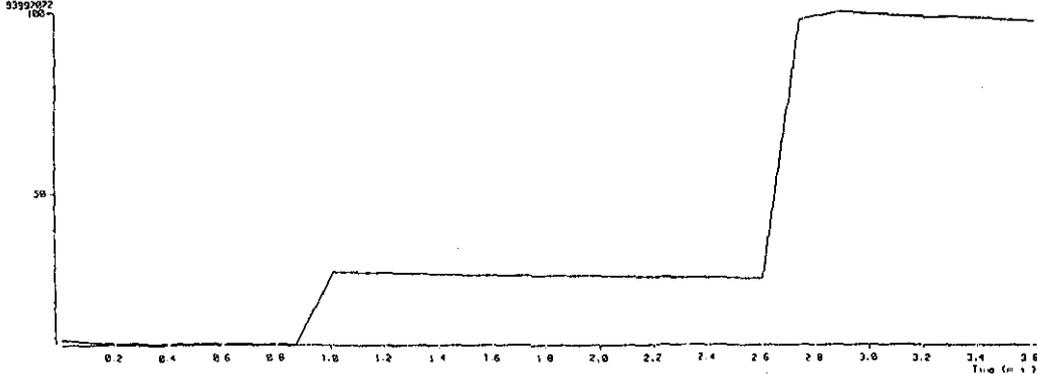
Scan# : (21,25)
Int. : 1599.98

Temp : 9.0 deg C



ROXITROMICINA

(TIC)
 Date : 07/24/99-ROXITROMICINA.D01 0:30 01-Feb-102 10:30
 Sample: ROXITROMICINA
 Note : Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (LQRI) F.O. UNFM
 Inlet : Direct Ion Mode : Normal Ion (M+, No...) Ion Mode : FFB+
 TIC Range : m/z 10 to 2200 Output RT Range : 0.00 to 3.62 m



**TESIS CON
 FALT A DE ORIGEN**