



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

“CARACTERIZACIÓN DE TRES DIFERENTES  
POLIMORFOS DEL ANTIBIÓTICO  
AZITROMICINA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERA QUÍMICA**

P R E S E N T A:

**MARTÍNEZ GARCÍA ROSALIA DE MONTSERRAT**

ASESORES: DR. JOSÉ MANUEL FRANCISCO LARA OCHOA  
M. en C. GEORGINA ENRIQUETA ESPINOSA PÉREZ



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

**Caracterización de tres diferentes polimorfos del antibiótico azitromicina**

Que presenta la pasante: **Rosalía de Montserrat Martínez García**  
Con número de cuenta: **30420799-4** para obtener el Título de: **Ingeniera Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Noviembre de 2012.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Manuel Francisco Lara Ochoa	
<b>VOCAL</b>	Dr. René Miranda Ruvalcaba	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. José Luis Arias Téllez	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>2do SUPLENTE</b>	QFB. Luis Antonio Martínez Arellano	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

*Gracias DIOS por ser mi guía y darme la oportunidad de vivir, acompañarme y brindarme una familia maravillosa, por darnos felicidad y salud.*

*Con todo mi amor dedico mi Tesis y mi vida entera a mi Familia que son las personas que más amo, a mis Padres les quiero dar las gracias por estar conmigo en todo momento, por apoyarme, guiarme, corregirme, por todo su esfuerzo , comprensión, dedicación y por brindarme su amor incondicional. A mis hermanos por su amor incondicional, por estar siempre presentes, gracias por su apoyo.*

*Gracias a todas aquellas personas que contribuyeron para que pudiera llegar este momento, a mi tío Maximino, a mi Abuelita Rosa y a mi tía Luisa<sup>†</sup> por su cariño.*

*Agradezco de manera muy especial y sincera a la M. en C. Georgina Espinosa Pérez por la confianza, apoyo, paciencia y dedicación de tiempo. Al Dr. Francisco Lara Ochoa por aceptarme para realizar esta Tesis bajo su dirección. Ambos han compartido conmigo sus conocimientos, me dieron la oportunidad de crecer y aprender cosas nuevas, gracias por brindarme la oportunidad de desarrollar mi Tesis en el Instituto de Química. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta Tesis, sino también en mi formación personal, gracias por facilitar siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades durante el desarrollo de este trabajo.*

*No puedo desperdiciar la oportunidad para agradecer todo lo que la Universidad Nacional Autónoma de México ha hecho por mí y mi familia. Educación, orgullo, pasión, entrega, compromiso, amistad, alegrías, la mejor y más hermosa casa de estudios, los más grandes recuerdos, una parte de la historia de mi vida como alumna; pero sobre todo, gracias por el espíritu universitario.*

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
1. Objetivo.....	2
1.1 Hipótesis.....	2
2. Antecedentes.....	3
3. Metodología de investigación.....	13
3.1 Equipo empleado para la caracterización de los polimorfos.....	15
3.2 Preparación de los polimorfos de azitromicina.....	16
3.3 Cálculos teóricos.....	17
4. Resultados.....	18
5. Discusión de resultados.....	21
6. Conclusiones.....	39
7. Referencias.....	40
Anexo 1.....	43

## ABREVIATURAS

API	Ingrediente Farmacéutico Activo, por sus siglas en inglés
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Centre
DRX	Difracción de Rayos X
DRX-monocristal	Difracción de Rayos X por el método de monocristal
DRX-polvo	Difracción de Rayos X por el método de polvo
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido, por sus siglas en inglés
E	Energía Kcal/mol
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier, por sus siglas en inglés
HSM	Microscopía de Fase Caliente, por sus siglas en inglés
IR	Infrarrojo
KFT	Valoración de Karl Fischer
Ltd.	Compañía de Responsabilidad Limitada, por sus siglas en inglés
R	Configuración <i>Rectus</i> , en sentido de las manecillas del reloj
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Configuración <i>Sinister</i> , al contrario de las manecillas del reloj
S.A.	Sociedad Anónima
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido, por sus siglas en inglés
Sintón	Fragmento imaginario con el que se explican los puentes de hidrógeno
TGA	Termogravimetría
US	Estados Unidos, por sus siglas en inglés
WO	Organización Mundial, por sus siglas en inglés

## **1. OBJETIVO**

Identificación y caracterización de tres polimorfos del fármaco azitromicina, empleando técnicas espectroscópicas y métodos fisicoquímicos, para determinar el más estable.

### **1.1 HIPÓTESIS**

Si modificamos las condiciones experimentales bajo las que cristaliza el antibiótico azitromicina, como temperatura, presión, disolvente, etc. se podrán obtener diferentes polimorfos. Por lo tanto, es posible elegir las condiciones que nos permitan obtener el polimorfo deseado ya que cada forma presenta propiedades físicas y químicas diferentes.

## 2. ANTECEDENTES

El término «polimorfismo», se deriva del griego “poly, πολυ” (mucho/muchos) y “morphé, μορφη” (forma).<sup>1</sup>

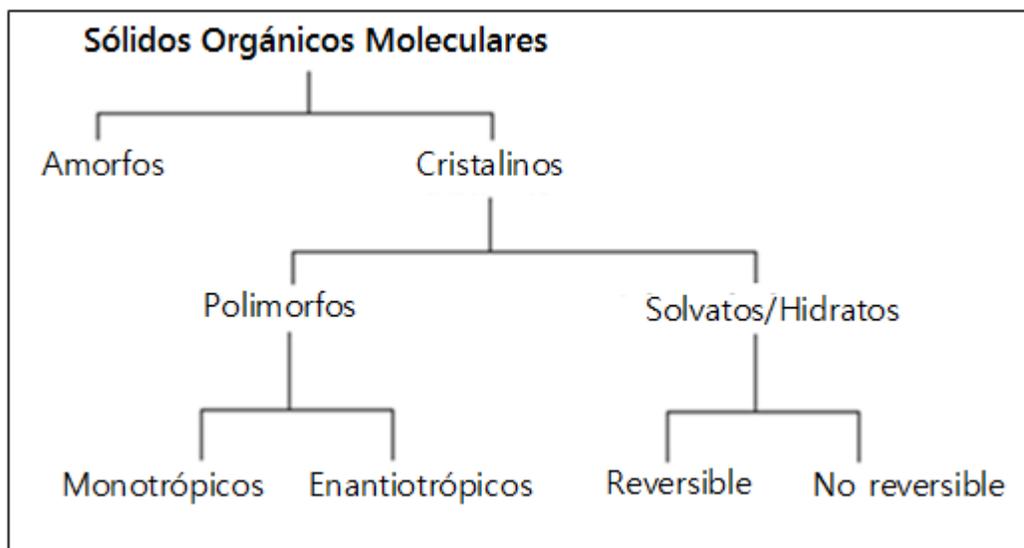
Históricamente, Klaproth en 1788 reporta por primera vez el polimorfismo, identificando dos formas distintas para el carbonato de calcio. En 1821, se describen dos formas cristalinas para el fosfato de sodio, y en 1832 por primera vez se estudia la cristalinidad para una sustancia orgánica, la benzamida. En el área farmacéutica, la historia del polimorfismo comienza en 1967, cuando Aguiar y colaboradores inician los estudios del palmitato de cloranfenicol como una sustancia policristalina. Los autores demostraron la existencia de diferentes estructuras cristalinas que no sólo mostraban diferentes cinéticas de disolución, sino que también involucraban diferentes parámetros de biodisponibilidad.<sup>2</sup>

El polimorfismo es un área actual de investigación dada su gran relevancia en la Ingeniería de Cristales, Química Supramolecular y Desarrollo de nuevos medicamentos.

Existen dos tipos de polimorfismo: *enantiotrópico* y *monotrópico*; en el caso de los polimorfos *monotrópicos*, la transición exotérmica sólido-sólido de la forma metaestable a la estable sólo ocurre en una dirección y no es reversible; sin embargo en los polimorfos *enantiotrópicos* esta transición es reversible. (figura 2.1).

Los polimorfos presentan las mismas propiedades en estado líquido o gaseoso, pero se comportan de forma distinta en estado sólido. El polimorfismo se define como la capacidad de una sustancia de existir en dos o más formas cristalinas que tienen diferentes arreglos y/o conformación de las moléculas en el cristal, lo que repercute en sus propiedades fisicoquímicas, por ejemplo: la densidad, la dureza, su tendencia higroscópica, la velocidad de solubilización, la estabilidad térmica o el comportamiento en suspensión, hecho que puede dar lugar a diferencias importantes en la eficacia de un producto farmacéutico, además de requerir diferentes condiciones y parámetros de formulación, proceso y estabilidad, tanto del fármaco como de los excipientes. Estos cambios pueden ser ventajosos en las

formulaciones farmacéuticas, al poder seleccionar el fármaco que presenta mejores propiedades tecnológicas.<sup>2</sup>



**Figura 2.1** Mapa conceptual de los Sólidos Orgánicos Moleculares<sup>2</sup>

El número de polimorfos en el que un compuesto es capaz de cristalizar es variable. Así, a mayor flexibilidad molecular, mayor número de posibilidades de conformación. La flexibilidad molecular se refiere a la capacidad molecular para adoptar distintas formas en sucesivos instantes que depende de ciertas condiciones experimentales. La eficacia del fármaco depende de la solubilidad en la sangre o en el tracto gastrointestinal. La solubilidad y la velocidad de disolución pueden variar entre varias formas cristalinas.

Los estudios acerca del polimorfismo permiten concluir que tanto compuestos orgánicos como inorgánicos pueden cristalizar en diferentes formas sólidas.

En el polimorfismo diferentes interacciones inter e intramoleculares se encuentran presentes, tales como interacciones de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , por mencionar algunas que podrán generar distintos arreglos cristalinos, pero que tendrán la misma composición química.

Las diferentes formas cristalinas de un mismo compuesto presentan propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas variables, que pueden modificar el desarrollo de un producto, pero que a su vez representan una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de un fármaco, ya que las formas amorfas, los polimorfos metaestables y los solvatos presentan una solubilidad significativamente mayor.

El fenómeno del polimorfismo tiene importantes implicaciones en la industria farmacéutica: en primer lugar, puede afectar a la estabilidad química del principio activo, ya que al tener propiedades físicas diferentes, los polimorfos pueden ser más o menos inertes a diferentes condiciones de humedad y temperatura. La aplicación farmacéutica de un principio activo en una única forma polimórfica depende de una serie de factores: que el polimorfo en cuestión sea suficientemente estable, soluble y que no cambie de forma a las condiciones de procesado y fabricación del comprimido sin experimentar ninguna transformación polimórfica. Por tanto, para poder evaluar estos factores es necesario conocer el número de polimorfos del principio activo, la estabilidad relativa de todos ellos y si las formas metaestables pueden ser estabilizadas. La solubilidad y la velocidad de disolución son factores cruciales en la elección de una forma cristalina para la formulación de un fármaco. Estos dos factores tienen un papel importante en la determinación de la biodisponibilidad de una sustancia. La absorción fisiológica de una forma sólida suele implicar la disolución del sólido en el estómago, siendo a menudo su velocidad y extensión los factores limitantes en dicho proceso.

El polimorfismo se presenta como un gran desafío al sistema internacional de patentes. Debido al hecho de que diferentes modificaciones cristalográficas de una sustancia corresponden a diferentes estructuras cristalinas con propiedades potencialmente diferentes, el descubrimiento y la preparación de nuevas formas cristalinas ofrece una oportunidad de reivindicación de una invención que, potencialmente, puede ser reconocida con la concesión de una patente.<sup>3</sup>

El polimorfismo es muy común en los fármacos, en donde el 90% aproximadamente son moléculas orgánicas pequeñas, de peso molecular por

debajo de  $600 \text{ g mol}^{-1}$  y entre el 56 al 87% tienen más de una forma sólida incluyendo los solvatos.<sup>1</sup>

La mayoría de los medicamentos se administran en formas de dosificación oral, siendo las formas orales las más populares, frecuentemente almacenadas en forma de sólidos que se disuelven antes de su uso ya que en general la estabilidad química de una molécula en la forma sólida es mucho mayor que en solución.<sup>1</sup>

El polimorfismo farmacéutico es la capacidad de los principios activos para adoptar diferentes conformaciones espaciales. Estas variaciones en las formas del empaquetamiento molecular tienen su origen en las condiciones fisicoquímicas específicas en las que se realiza la síntesis en el laboratorio. Su importancia trasciende el tema de las aplicaciones terapéuticas por sus repercusiones farmacocinéticas y afecta al mundo de la industria, donde genera un número importante de patentes y conflictos derivados de ellas.

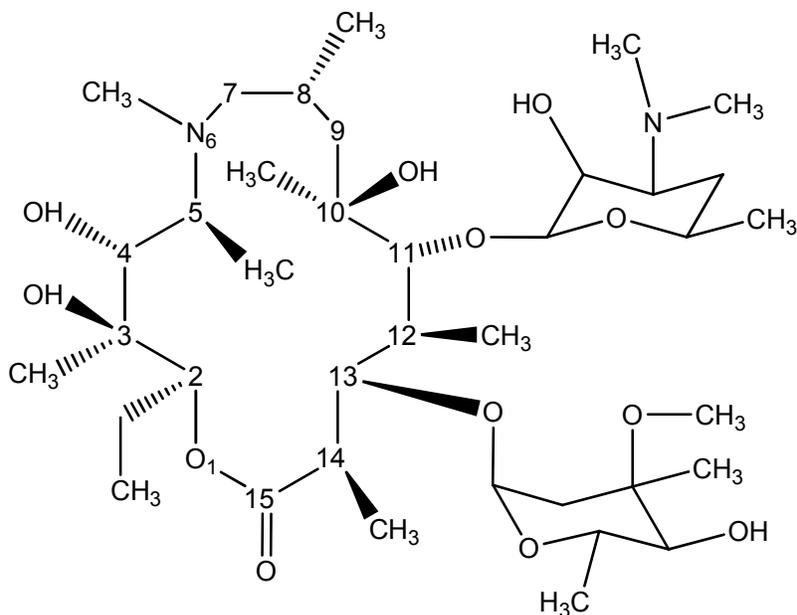
Un polimorfo puede presentar algunas propiedades indeseables respecto a sus otras formas posibles, que pueden imposibilitar la adecuada preparación industrial de los medicamentos. Aspectos como el grado de solubilidad, fluidez, compresibilidad e higroscopicidad pueden imposibilitar operaciones tecnológicas de compresibilidad, pulverización/molienda, liofilización, secado, etc.

Las formas polimórficas de un fármaco pueden tener diferentes propiedades químicas y físicas, incluyendo el punto de fusión, la reactividad química, solubilidad aparente, velocidad de disolución, ópticas y mecánicas, la presión de vapor y la densidad. Estas propiedades pueden tener un efecto directo sobre la capacidad de proceso y/o fabricación del principio activo y el medicamento, la disolución y biodisponibilidad. Por lo tanto, el polimorfismo puede afectar la calidad, seguridad y eficacia del medicamento.

La biodisponibilidad es la cantidad de fármaco que pasa inalterada al torrente sanguíneo para posteriormente fijarse a sus receptores diana y ejercer la acción farmacológica.<sup>4</sup>

Como ya se mencionó anteriormente las propiedades de estado sólido de un fármaco pueden tener una influencia significativa en la solubilidad de éste, esto conlleva a que las formas polimórficas difieran en su estructura interna en estado sólido. Un fármaco que existe en varias formas polimórficas pueden tener diferentes solubilidades acuosas y velocidades de disolución.<sup>5</sup> Uno de los propósitos principales en la caracterización de las formas polimorfas de un compuesto en la industria farmacéutica es para identificar la forma termodinámicamente más estable de un ingrediente farmacéutico activo (API) y para asegurar su forma reproducible en producción, evitando cambios de biodisponibilidad. El principal factor que influye en diferencias de la biodisponibilidad es la solubilidad de las formas polimorfas.<sup>6</sup>

Por otro lado, la azitromicina (9-desoxo-9-aza-9-homoeritromicina A) es un antibiótico macrólido (figura 2.2) sintetizado por primera vez por S. Djokic y G. Kobrehel.<sup>7, 8, 9</sup> A partir de eritromicina, el primer paso de la síntesis consiste en la formación y aislamiento de la oxima de eritromicina A. Esta oxima, por un reordenamiento de Beckmann forma el respectivo iminoéter, que con borohidruro de sodio, se reduce a azaeritromicina A. Esta amina secundaria es sometida a una metilación reductiva para obtener finalmente la azitromicina. Mediante el procedimiento reportado por Djokic y Kobrehel, para aislar la azitromicina sintetizada, se recuperó una forma amorfa y altamente higroscópica.<sup>7</sup> Debido a esta alta higroscopicidad, el compuesto era inestable e inadecuado para la elaboración de preparados farmacéuticos.



**Figura 2.2** Estructura química de azitromicina. Formula condensada:  $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$

Desde la década de 1970, PLIVA (Empresa farmacéutica, con sede en Zagreb, Croacia) con su equipo de investigación, dirigido por el Dr. Slobodan Djokic, había estado trabajando en el área de los antibióticos macrólidos. En 1981, su equipo de investigadores, Gabrijela Kobrehel, Zrinka Tamburasev y Gorjana Radobolja-Lazarevski, sintetizaron un nuevo antibiótico llamado azitromicina, el primer miembro de una nueva clase de antibióticos macrólidos, llamados azalidos. La azitromicina dihidrato se obtuvo de la molécula de eritromicina y se demostró que tiene propiedades superiores, fue patentada en 1981, y más tarde fue sintetizada por los científicos de Pfizer. En 1986 el laboratorio PLIVA y el laboratorio Pfizer firmaron un acuerdo de licencia que le dió los derechos exclusivos a Pfizer para la venta de la azitromicina en el oeste de Europa y Estados Unidos. PLIVA llevo la azitromicina al mercado en Europa central y oriental bajo el nombre de marca de Sumamed en 1988, y Pfizer bajo el nombre de Zithromax en 1991.<sup>10</sup>

Debido a sus excepcionales propiedades terapéuticas, la azitromicina ha revolucionado el tratamiento con antibióticos y se convirtió en uno de los medicamentos de mayor éxito en todo el mundo. Desde sus primeros ensayos, la

azitromicina resultó ser un antibiótico muy eficiente, con actividad antibacteriana amplia y mejorada con una baja incidencia de efectos secundarios gastrointestinales en comparación con otros antibióticos similares.

En 1993 Gingras B. y Jensen J.<sup>11</sup> citan que la azitromicina, es un análogo de la eritromicina con un átomo de nitrógeno que se inserta en el anillo de los macrólidos. Como resultado, existe una mayor penetración del fármaco en los macrófagos, fibroblastos y neutrófilos, lo que conlleva a una ampliación desde 1.5 horas de vida media de la eritromicina a 68 horas para azitromicina<sup>11</sup>. Se acumula en el hígado, el tejido renal, del bazo y pulmonar<sup>12</sup> y poco a poco se filtra al torrente sanguíneo durante un periodo de una semana. En 1987 se lleva a cabo la farmacocinética y estudios *in vivo* con azitromicina, con una vida media prolongada y excelente distribución tisular<sup>13</sup>, se absorbe bien tras la administración oral en ratones, ratas, perros y monos cynomolgus. Este compuesto mostró una eliminación uniforme, larga vida media y se distribuyó excepcionalmente bien en todos los tejidos. En modelos de ratones, fué 10 veces más potente que la eritromicina y otros cuatro antibióticos contra una infección anaeróbica producida por *Fusobacterium necrophorum*. La azitromicina es el primer azalido en el mercado y muestra la mejor actividad antibacteriana entre los miembros de su familia.

En comparación con la eritromicina, las propiedades benéficas de la azitromicina se derivan del aumento de la biodisponibilidad oral, vida media más larga, mayor concentración intracelular y una mayor actividad antibacteriana.<sup>14</sup>

Se sabe que en solución la azitromicina (en el anillo de aglicona) puede existir en dos conformaciones importantes denominadas *plegada hacia afuera* y *plegada hacia adentro*.<sup>15</sup>

La conformación *plegada hacia afuera* se basa en la estructura cristalina de la eritromicina A dihidrato yodhidrato<sup>16</sup>, y la conformación *plegada hacia adentro* se basa en la estructura cristalina de diritromicina<sup>17</sup>.

En la literatura se indica que, la conformación que adoptan los antibióticos en solución depende solamente de la polaridad del disolvente<sup>18, 19</sup> en el que se disuelve, por lo que la conformación *plegada hacia afuera* es típica de disolventes polares, como H<sub>2</sub>O [ $\mu=1.85$  D] ó (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO [ $\mu=2.88$  D], mientras que la conformación *plegada hacia adentro* es típica de disolventes de baja polaridad, como CHCl<sub>3</sub> [ $\mu=1.01$ D].

Los resultados de Lazarevski<sup>18</sup> apoyan aparentemente que *la azitromicina en el cristal conserva la conformación de solución*, por lo tanto, *la estructura cristalina final parece ser condicionada por el disolvente (polaridad) en el cual este antibiótico se cristaliza*, por lo tanto, conociendo la polaridad del disolvente, se puede deducir qué pseudopolimorfo se obtendrá.

Con el fin de obtener una forma estable de azitromicina el laboratorio farmacéutico Pfizer comenzó una búsqueda de formas pseudopolimórficas. El primer pseudopolimorfo reportado en patente US 4474768, se debió a G.N. Bright<sup>20</sup> y correspondió con una forma de monohidrato. Este pseudopolimorfo resultó ser altamente higroscópico y por lo tanto no era apropiado para elaborar composiciones farmacéuticas. No obstante, el 31 de julio de 2001, D.J.M. Allen y K.M. Nepveux<sup>21</sup>, reportaron una forma dihidratada, que a pesar de no ser lo suficientemente estable a la humedad era lo suficientemente estable para la elaboración de comprimidos y suspensiones, que son las presentaciones comerciales regulares.

En búsquedas posteriores, el laboratorio Pfizer<sup>22</sup> reportó un nuevo proceso para obtener azitromicina monohidrato con contenido de agua de 2.26 % y del que argumentaban que no era higroscópico. El 28 de agosto de 2003, Pfizer publicó<sup>23</sup> datos de rayos X cristalográficos de un monohidrato de azitromicina hemi-etanol, con un contenido de agua entre 2 a 5 % y el contenido de etanol entre 1 a 4 %, que eran diferentes a los anteriormente reportados<sup>22</sup>. Esta patente fue concedida el 20 de diciembre de 2005, con número US 6977243<sup>24</sup>. Sin embargo, independientemente de que otros dieciséis pseudopolimorfos adicionales se

registraron en esta misma patente sólo se reclamó la forma G, que es una forma sesquihidrato aislado a partir de mezclas de metanol-agua o agua-acetona. Más tarde, utilizando ésta misma patente reclamaron<sup>25a</sup> el 30 de mayo de 2006 un monohidrato hemi-*n*-propanol y el 18 de diciembre de 2007<sup>25b</sup> el pseudopolimorfo monohidrato hemi-etanol; todo esto, a pesar de que en la solicitud de la patente original del 28 de agosto de 2003, se habían reclamado<sup>23</sup> de forma simultánea 9 de los pseudopolimorfos inventados.

Otros dos laboratorios Teva Pharmaceutical Industries Ltd.<sup>26</sup> y Biochemie S.A.<sup>27</sup> recuperaron monohidratos de soluciones etanol-agua y argumentaron que eran nuevos y estables. Las características estructurales de estas formas sólo fueron apoyadas por los patrones de difracción de rayos X por el método de polvo.

R. Gandhi y su equipo de *colaboradores*<sup>28</sup> en un estudio de hidratos de azitromicina reportaron haber encontrado dos pseudopolimorfos, un monohidrato preparado a partir de una solución de etanol-agua y un polimorfo inestable anhidro preparado al mantener una muestra comercial en pentóxido de fósforo durante la noche. Determinaron que ambos polimorfos eran altamente higroscópicos y se transformaban por hidratación a una forma dihidratada, que resulto ser el polimorfo más estable entre ellos.

Montejo-Bernardo<sup>29</sup> y *colaboradores* realizaron y reportaron un estudio cristalográfico de azitromicina monohidrato, a partir de las condiciones experimentales de la patente US 4474768 del laboratorio Pfizer<sup>20</sup> obtuvieron un monohidrato higroscópico, de la patente US 6245903 del laboratorio Apotex<sup>30</sup> prepararon un monohidrato isopropanol clatrato, de la patente US 6365574 del laboratorio Teva<sup>26</sup> prepararon un monohidrato etanolato y de la patente WO 0100640 del laboratorio Biochemie<sup>27</sup> prepararon un monohidrato estable. Con estas muestras, Montejo-Bernardo determinó y comparó<sup>29</sup> los perfiles de difracción de rayos X de polvo de los cuatro monohidratos preparados. Además, cristalizó el

monohidrato estable reportado por el laboratorio Biochemie<sup>27</sup> y determinó el patrón de monocristal por difracción de rayos X de este pseudopolimorfo.

Con el fin de encontrar otras formas polimórficas, que podrían resultar ser más estables que las formas existentes, se inició el presente estudio utilizando diferentes tipos de solventes y condiciones físico-químicas para cristalizar nuevos polimorfos de azitromicina.

### 3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Cualquier propiedad física o química puede, *a priori*, variar entre los polimorfos de un material, dado que éstos consisten en diferentes estructuras cristalinas. Así, cualquier técnica que mida las propiedades de un material sólido puede, en principio, ser utilizada para la detección del fenómeno de polimorfismo y caracterizar las diferencias entre las estructuras polimórficas. Algunas técnicas son más sensibles a estas diferencias en la estructura cristalina o en el entorno molecular y por tanto son más adecuadas. Tradicionalmente, los distintos polimorfos se han caracterizado mediante diversas técnicas, como difracción de rayos X (DRX), Análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopia vibracional, resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido y microscopía.

La difracción de rayos X para monocristal conduce a la elucidación estructural de las moléculas en la red cristalina y por lo tanto proporciona la información clave para la identificación de los polimorfos. De hecho, el criterio definitivo para la aceptación de la existencia de polimorfismo es la demostración de estructuras cristalinas no equivalentes. Sin embargo, un factor limitante de esta técnica es la necesidad de disponer de monocristales de un tamaño adecuado para el análisis. Por otro lado, la técnica de difracción de rayos X por el método de polvo permite distinguir fases sólidas partiendo de muestras microcristalinas.

Los métodos de análisis termogravimétrico y en particular la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), son los principales métodos utilizados en los estudios de polimorfismo ya que proporcionan datos útiles tanto para la identificación como para la caracterización de las especies polimórficas. La técnica de DSC mide la potencia calorífica absorbida o generada por una muestra mientras se le aplica una diferencia de calor entre la muestra y una de referencia que es medida como una función de la temperatura. La respuesta térmica más relevante en este contexto es la fusión ya que cada polimorfo presenta diferente punto de fusión. La fusión es un proceso termodinámico y depende únicamente de la temperatura a una presión determinada.

La técnica de TGA permite determinar la pérdida de masa de una muestra al ser sometida a un programa de calentamiento en una atmósfera determinada (aire o nitrógeno). Esta técnica es útil en el estudio de hidratos y solvatos, también denominados pseudopolimorfos. Los métodos espectroscópicos vibracionales incluyen la espectroscopia de infrarrojo (IR) y Raman. Estas técnicas se complementan, ya que la espectroscopia de IR permite observar los modos vibracionales que cambian el momento dipolar, mientras que la espectroscopia de Raman lo hace con los modos vibracionales que cambian la polarizabilidad. Los espectros vibracionales son especialmente sensibles al entorno molecular y a las conformaciones y por tanto, pueden distinguir diferentes formas polimórficas.

La resonancia magnética nuclear en estado sólido está siendo usada cada vez con mayor frecuencia en la identificación de polimorfos. Es una técnica no destructiva y analiza toda la muestra simultáneamente, eliminando el inconveniente de analizar sólo una porción de la muestra. Esta técnica es útil en el estudio del polimorfismo ya que pequeños cambios en la conformación y/o en la estructura local electrónica ocasionan diferencias de desplazamientos químicos apreciables. Diferentes formas cristalinas pueden dar lugar a diferentes desplazamientos químicos de algunos átomos de carbono.

Es necesario mencionar también que diferentes formas sólidas poseen diferentes propiedades ópticas (índice de refracción, color, ángulo de extinción y dispersión óptica) que pueden determinarse a través de métodos ópticos cristalográficos. La termomicroscopía es especialmente útil en la observación de fenómenos inducidos de manera térmica, como fusiones transformaciones polimórficas, desolvataciones y sublimaciones.<sup>3</sup>

### 3.1 EQUIPO EMPLEADO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMORFOS

#### CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Se aplicó calorimetría diferencial de barrido, con un equipo marca Mettler Toledo, modelo 821<sup>e</sup>, con STAR software versión 8.1.

#### ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

El análisis termogravimétrico se llevo a cabo con un equipo marca Mettler Toledo, modelo 851<sup>e</sup>, con STAR software versión 8.1.

#### ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

Los espectros se registraron es un espectrofotómetro FT-IR, marca Bruker, modelo tensor 27.

#### RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (sólido)

La RMN se realizó en un equipo Varian Unity 75.4 MHz para <sup>13</sup>C en estado sólido, por la técnica CPMAS, velocidad de giro entre 4-6 KHz, rotor de 7 mm.

#### DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO (DRX-Polvo)

El análisis de difracción de rayos X por el método de polvo se realizó con el difractómetro SIEMENS D5000, utilizando radiación K $\alpha$  de Cu ( $\lambda=1.5406$  Å; a 35 kV, 30mA).

#### DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONOCRISTAL (DRX-Monocristal)

Los datos de los cristales se recogieron a 293 (2) K utilizando los difractómetros Siemens P4/PC con radiación de Cu y Bruker P4 con radiación de Mo. La estabilidad del cristal fue monitoreada por reflexiones de medición estándar.

### 3.2 PREPARACIÓN DE LOS POLIMORFOS DE AZITROMICINA

a) Azitromicina dihidratada

El dihidrato de azitromicina puede ser preparado a partir de azitromicina monohidrato y también a partir de la azitromicina anhidra, el procedimiento consiste en disolver algún polimorfo de azitromicina en metanol (5 ml/g) a 25°C y con agitación se agregó lentamente agua (3 ml/g) y se dejó agitando durante 3 horas, la suspensión formada se filtró y el precipitado se lavó con una solución de metanol-agua al 50%, se secó al vacío y se pesó, obteniéndose el polimorfo dihidrato en rendimiento de 79 %. Punto de fusión 126 °C.

b) Azitromicina cristalina recuperada de una solución etanol-agua

En un matraz de una boca con 50 ml de etanol absoluto se calentó a 40°C con agitación. Se agregó 40 g de azitromicina dihidrato en porciones, mientras se fue logrando disolución completa de ella. Se suspendió el calentamiento y se agregó de manera goteada 9.2 ml de agua agitándose por 18 horas. Se formó un precipitado blanco que se filtró y el sólido aislado se lavó con 30 ml de una mezcla de agua-etanol (1:1.2). Se secó al vacío 1 hora sin calentar. Se obtuvo 20.9 g de cristales blancos con punto de fusión de 134-136°C.

c) Azitromicina cristalina recuperada de una suspensión de hexano

250 g de azitromicina dihidrato se suspendieron en 830 ml de hexano (3.32 ml/g de azitromicina) y con una agitación vigorosa se calentó la mezcla hasta reflujo del hexano (60-62°C) durante 90 minutos. Enseguida se enfrió la mezcla a 25° C y se obtuvo una suspensión la cual se filtró y el filtrado se lavó con 175 ml de hexano, obteniéndose 214.6 g de azitromicina anhidra, con punto de fusión 186°C.

### 3.3 CÁLCULOS TEÓRICOS

Los cálculos de densidades potenciales se realizaron utilizando el método Hartree Fock, con una base 3-21-G del paquete Spartan versión 8.<sup>6</sup>

Una vez establecido que los átomos están implicados en puentes de hidrógeno, responsables de la estabilización de la celda cristalina, se procedió a calcular la fuerza de cada uno de los puentes de hidrógeno para cada sintón, usando el mismo método de cálculo.

El cálculo para cuantificar la similitud de empaquetamiento molecular entre las estructuras de los cristales se realizó utilizando el programa asistente de forma sólida Mercury 3.0<sup>31</sup>.

#### 4. RESULTADOS

Con el fin de caracterizar los nuevos polimorfos se hicieron análisis de estas formas cristalinas por DSC, TGA, FT-IR, RMN de sólido, rayos X de polvo y difracción de rayos X de monocristal, que se compararon con la forma dihidratada, que también se determinó en el presente trabajo, y con otros datos de la literatura. Los espectros correspondientes para cada caso se muestran en el anexo 1.

En la espectroscopia infrarroja observamos que la banda correspondiente al grupo carbonilo en el polimorfo dihidrato se ubica en  $1720.4\text{ cm}^{-1}$ , en la zona de hidroxilos muestra dos bandas, una ancha con picos en  $3559.9\text{ cm}^{-1}$ ,  $3492.2\text{ cm}^{-1}$  y  $3254\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, en  $2970.7\text{ cm}^{-1}$  y en  $1667.6$  las bandas correspondientes a una amina terciaria protonada.; para el polimorfo monohidrato la banda que corresponde al grupo carbonilo se localiza en  $1726.52\text{ cm}^{-1}$ , una banda ancha en la zona de hidroxilos con un valor de  $3372.88$ , otra banda intensa en  $2968.73\text{ cm}^{-1}$  así como otra banda en  $1647.51\text{ cm}^{-1}$  corresponden a una amina terciaria protonada ; en el caso del polimorfo anhidro se observa la banda para carbonilo en  $1727.5\text{ cm}^{-1}$ , las bandas en  $2970.1\text{ cm}^{-1}$  y  $1630\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a una amina terciaria protonada, las bandas correspondientes a los hidroxilos en  $3388.0\text{ cm}^{-1}$  y  $3595.4\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros se realizaron utilizando el método de pastilla en KBr en la región de  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ . (Figura 5.5, Anexo 1).

Para el caso del análisis termogravimétrico (TGA) se pesó la muestra, en paneles de alúmina abiertos, calentando en un intervalo de  $25$  a  $190^{\circ}\text{C}$ , con rampa de calentamiento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Se determinó el % de pérdida ó ganancia de peso a diferentes temperaturas de inflexión. Se observó en el termograma para el polimorfo dihidrato una pérdida de masa del  $4.4004\%$  que equivale a  $0.2246\text{ mg}$ , lo que sugiere una pérdida de agua (figura 5.2a, Anexo 1). En el polimorfo monohidrato durante el análisis hubo tres pérdidas que suman una pérdida de  $4.8170\%$  que equivalen a  $0.2537\text{ mg}$  (figura 5.2b, Anexo1). El polimorfo anhidro solo muestra una pérdida de masa de  $1.8485\%$  que equivale a  $0.1582\text{ mg}$  (figura 5.2c, Anexo1).

En el análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizaron dos pruebas una con cápsula con orificio y cápsula sin orificio, el rango de temperatura fue de 25 a 190 °C, con rampa de calentamiento de 10 °C/min., se determinaron las temperaturas de transición. Para el polimorfo anhidro, cuando la muestra se analiza con cápsula con orificio comienza a fundir en 186.84°C y con cápsula sin orificio comienza en 184.84°C (figura 5.4, Anexo1). En el caso del polimorfo monohidrato la muestra comenzó a fundir en 136.14°C con cápsula con orificio y 144.41°C con cápsula sin orificio, (figura 5.3, Anexo1). Y para el polimorfo dihidrato con cápsula con orificio comenzó a fundir en 109.7°C y 126.46°C con cápsula sin orificio, (figura 5.1, Anexo1)

Los resultados experimentales de resonancia magnética nuclear por el método de sólido de  $^{13}\text{C}$  para el polimorfo dihidrato muestran un valor de 182.34 ppm y 180.973 ppm correspondiente al grupo carbonilo y 37.956 ppm para los metilos sustituidos en la amina, (figura 5.13a, Anexo1). El polimorfo monohidrato muestra dos señales para el grupo carbonilo en 182.34 y 181.4 ppm y para el grupo amina muestra una señal en 39.324 ppm, (figura 5.13b, Anexo1). En el anhidro a diferencia de los otros dos polimorfos solo se observa una señal para el grupo carbonilo en 182.768 ppm y para la amina una señal en 38.726 ppm. (Figura 5.13c, Anexo1)

Los resultados de difracción de rayos X por el método de polvo se determinaron en un intervalo angular de 2 a 60°  $2\theta$ , a una velocidad de 1° ( $2\theta$ /min) en un intervalo de tiempo de 58 minutos. Las intensidades más representativas para el polimorfo dihidrato se localizan en valores  $2\theta$  de 7.9(11.21), 9.2(9.502), 9.9(8.962), 11(7.341), 13(6.779), 15.5(5.679), 16.7(5.400), 17.5(5.056), 18.8(4.735), 20(4.480), 20.9(4.256), 21.6(4.116) (figura 5.12a, Anexo1). El polimorfo monohidrato muestra las intensidades más representativas en valores  $2\theta$  de 6.8(11.22), 9.9(8.978), 11.2(7.866), 12.5(7.055), 14(6.318), 14.5(5.955), 15(5.754), 17(5.177), 18.9(4.648), 20(4.438), 20.4(4.327), 20.8(4.216) (figura 5.12b, Anexo1). El polimorfo anhidro muestra las intensidades más representativas en valores  $2\theta$

#### 4. RESULTADOS

de 8.5(10.58), 11.2(8.506), 12.2(7.151), 13(6.856), 13.8(6.434), 15.1(5.884), 17(5.227), 17.9(5.026), 18.9(4.749), 19.3(4.603), 20.3(4.376), 20.2(4.017) (figura 5.12c, Anexo1).

Con la difracción de rayos X por el método de monocristal se determinó la estructura de las moléculas, el sistema cristalino y los parámetros de la celda unitaria.

La Tabla 4.1 muestra la comparación de los resultados del estudio por difracción de rayos-X de monocristal de los tres polimorfos.

**Tabla 4.1** Valores de los parámetros de la estructura cristalina para los polimorfos de azitromicina.

	<b>Dihidrato</b>	<b>Monohidrato</b>	<b>Anhidro</b>
Fórmula	C <sub>38</sub> H <sub>76</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>39</sub> H <sub>77</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13.50</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>
Peso molecular	785.01	790.04	748.98
Descripción de cristal/color	Prisma/sin color	Prisma/sin color	Prisma/sin color
Sistema cristalino	ortorrómbico	Monoclínico	tetragonal
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P 2 <sub>1</sub>	P 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
a(Å)	14.749 (1)	16.270(2)	14.452 (1)
b(Å)	16.889 (1)	16.300 (2)	14.452 (1)
c(Å)	17.855 (1)	18.51 (2)	41.645 (2)
α	90	90	90
β	90	109.378(11)	90
γ	90	90	90
Volumen (Å <sup>3</sup> )	4447.61	4633.04	8697.99
Z	4	4	8
T (K)	293 (2)	296(1)	293(2)
F (000)	1720	1732	3280
ρ <sub>(cal)</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	1.172	1.133	1.144
μ (mm <sup>-1</sup> )	0.726	0.084	0.686
Tamaño del cristal (mm <sup>3</sup> )	0.20 x 0.20 x 0.04	0.6 x 0.4 x 0.2	0.4 x 0.2 x 0.2
Reflexiones colectadas	3337	14560	3412
Única reflexión (Rint)	3337	8458	3412
GOOF onF2	0.933	1.060	0.954
R1 (I > 2σ(I))	0.0503	0.0954	0.0811
wR2 (todos los datos)	0.1214	0.1417	0.1405
mayor diferencia de características del plano (e Å <sup>-3</sup> )	0.220/-0.227	0.431/-0.280	0.175/-0.194
Tipo de radiación	CuKα	MoKα	CuKα
Tipo de dispositivo de medición	Siemens P4/PC	Bruker P4	Siemens P4/PC

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El polimorfo cristalino dihidrato preparado en este estudio se analizó por calorimetría diferencial de barrido (DSC), a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El termograma mostró un único proceso endotérmico, con un punto de inicio en 126 °C +/- 1 °C (figura 5.1a), que corresponde aproximadamente con los datos reportados en la literatura.<sup>21</sup> Cuando por DSC fue analizado este polimorfo, en una capsula con orificio, se observó sólo un proceso endotérmico localizado en 109 °C +/- 1 °C (figura 5.1b), que probablemente corresponde con la pérdida de agua de hidratación. La falta de una endoterma, correspondiente a la de fusión del compuesto puede explicarse teniendo en cuenta que por la pérdida de agua de hidratación se genera una inestabilidad del cristal y una transición al estado amorfo. Esta explicación se hizo evidente mojando la muestra dentro de la capsula después de la fusión y de nuevo la exploración en una capsula cerrada, donde se observó una sola endoterma situada en 126 °C. La endoterma situada en 109 °C corresponde a moléculas de agua que se perdió, corroborando esta información por un análisis TGA barrido en el intervalo de 250-190 °C en el que se observó (figura 5.2a) una pérdida de peso de 4.4% que corresponde aproximadamente con el peso de dos moléculas de agua.

La forma azitromicina, aislada de la solución de etanol-agua, fue analizada por DSC a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y utilizando una capsula sin orificio. Sólo se observa una endoterma con un inicio en 144.41 °C (fig. 5.3a). Cuando el termograma se repite, pero usando una capsula con orificio, la aparición de la endoterma se encuentra a 136 °C (figura 5.3b). El correspondiente TGA de este nuevo polimorfo muestra una pérdida de peso de 0.2537 mg en el rango de 25-190 °C (figura 5.2b), que puede ser atribuido a la pérdida de dos moléculas de agua y una de etanol. Este comportamiento, en relación con los pseudopolimorfos de azitromicina etanol-agua, es similar a la reportada por Bright<sup>20</sup>, aunque no coinciden con otros resultados en la literatura.<sup>28</sup>

La forma de azitromicina aislada de la suspensión de hexano, fue analizada por DSC a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y usando una capsula sin perforar. En este termograma se observó una endoterma con un inicio en 184.84 °C (figura 5.4a). Cuando el experimento se realizó usando una cápsula con orificio el proceso endotérmico se efectuó a 186.84 °C, casi a la misma temperatura que el observado utilizando la cápsula sin orificio (figura 5.4b). Esta observación sugiere que el nuevo compuesto no libera agua o moléculas de disolvente. Para corroborar esta observación, un análisis de TGA se realizó a una velocidad de barrido de 10 °C/min en el intervalo de 25-400 °C. Los resultados mostraron una pérdida de peso de 0.1582 mg equivalente a 1.8% en el intervalo de 80-150 °C (figura 5.2c) y que fue interpretado como una pérdida de humedad, corroborando las evidencias de que el nuevo compuesto corresponde con una forma anhidra y cristalina.

A partir de los datos calorimétricos anteriores se deduce que el polimorfo recuperado de la solución de etanol-agua corresponde con una forma que contiene una proporción de dos moléculas de agua y una de etanol por dos moléculas de azitromicina y lo llamaremos polimorfo monohidrato. En el caso del polimorfo recuperado de la suspensión de hexano, corresponde con una forma cristalina anhidra y lo llamaremos polimorfo anhidro.

El espectro FT-IR de la forma aislada de la solución de agua-etanol (figura 5.5b, anexo 1) muestra en la región de O-H un estiramiento en aproximadamente 3372  $\text{cm}^{-1}$  una banda ancha que se puede explicar por los puentes de hidrógeno establecidos por cada uno de los O-H de las dos moléculas de azitromicina no equivalentes en la celda unitaria de este pseudopolimorfo. El N-H se protona para todos los polimorfos, y se encuentra alrededor de 2968  $\text{cm}^{-1}$  y 1647.5  $\text{cm}^{-1}$ . El carbonilo C=O presenta un estiramiento en la banda de 1726.52  $\text{cm}^{-1}$ , indicando que la proximidad del carbonilo al protón del hidroxilo de una molécula de azitromicina que es huésped de una molécula de agua es diferente de la molécula de azitromicina que aloja una molécula de etanol. (Ver Tabla 5.1)

**Tabla 5.1** Absorciones representativas de FT-IR de los polimorfos aislados

IR $\nu$ $\text{cm}^{-1}$			
	Lactona	-N <sup>+</sup> -H	-N- /OH
Anhidro*	1727.5	2970, 1630.0	3595.4, 3383.0
Monohidrato*	1726.52	2968, 1647.5	3372.88
Dihidrato*	1720.4	2970.7, 1667.6	3559.3, 3490.2, 3254

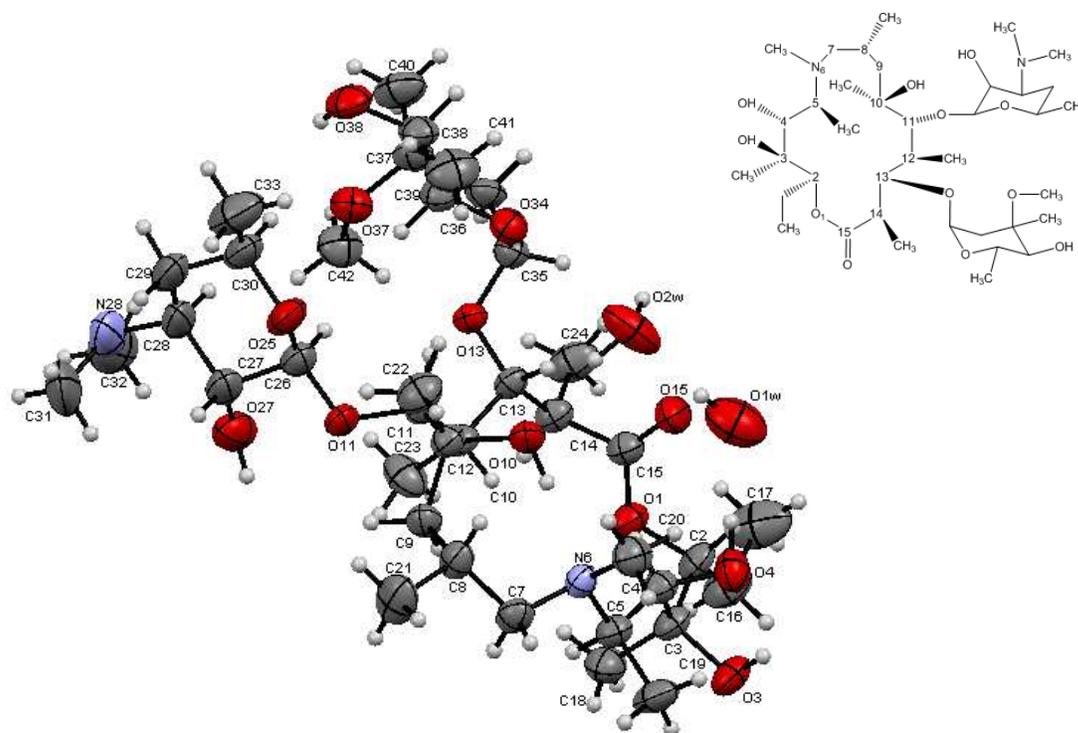
\*Los espectros de infrarrojo se encuentran en el Anexo 1

La forma cristalina anhidra establece interacciones similares, pero los puentes de hidrógeno con las moléculas de agua de hidratación se sustituyen por las interacciones con los átomos de las moléculas vecinas. Por ejemplo, el puente de hidrógeno O<sub>6</sub>-H en esta molécula se ha establecido con O<sub>8</sub> en el resto de ribosa de una molécula vecina. Entonces, el espectro FT-IR de la forma anhidra (figura 5.5c, Anexo1) es similar a la del dihidrato, con pequeños cambios en algunas bandas dependiendo de los puntos fuertes de las interacciones de puentes de hidrógeno. Sin embargo, en este caso el carbonilo de la lactona establece un solo puente de hidrógeno y entonces la banda de estiramiento del C=O se localiza en 1727.5  $\text{cm}^{-1}$ . (Ver Tabla 5.1)

La estructura cristalina obtenida por difracción de rayos X para monocristal de la forma dihidrato que se determinó por primera vez por Djokic nos muestra una estructura ortorrómbica, con grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> y parámetros de celda que coinciden con los reportados<sup>7</sup>. Los datos obtenidos de las colecciones de datos se muestran en la Tabla 5.2. Para determinar la configuración absoluta del polimorfo dihidrato se tomo de referencia la asignación de los centros estereogénicos para la eritromicina<sup>32</sup>.

En la figura 5.6, se muestra la estructura del polimorfo dihidrato con la siguiente configuración absoluta 2R, 3S, 4R, 5R, 8R, 10R, 11R, 12S, 13S, 14R. En la posición 11 se encuentra sustituida a través de un enlace  $\beta$ -glucosídico el azúcar

$\beta$ -D-desosamina y en la posición 13 de la macrolactona se encuentra sustituido el azúcar  $\alpha$ -L-cladinoso. Figura 5.6



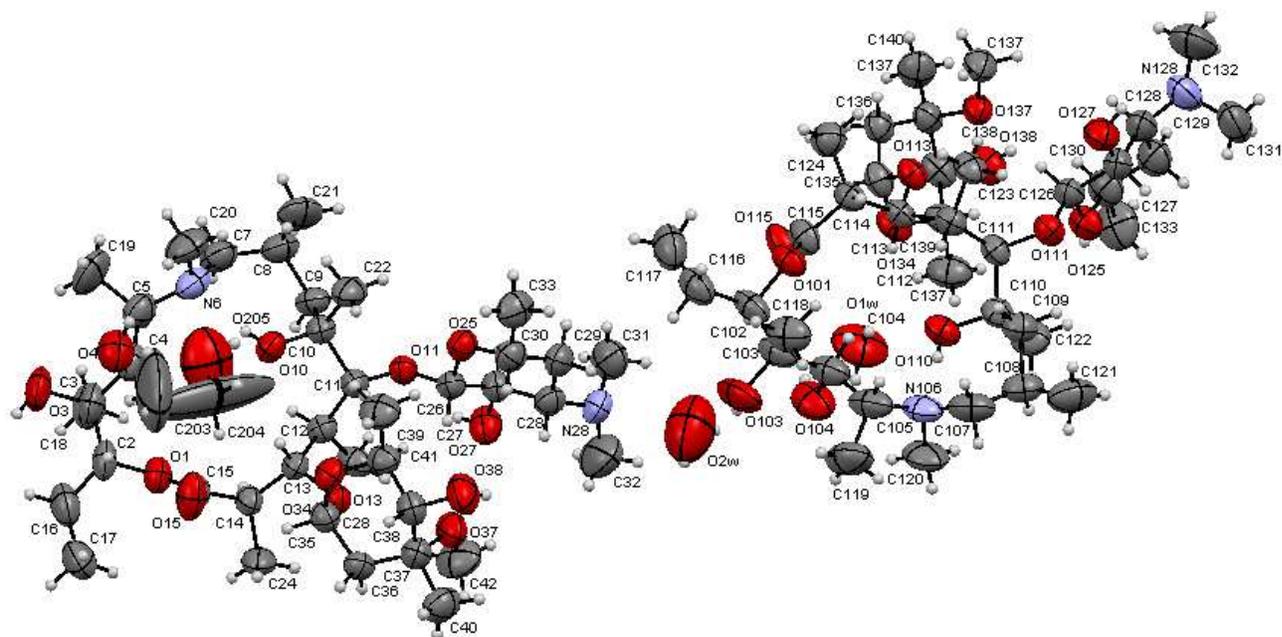
**Figura 5.6** Estructura de rayos X de la forma dihidratada de azitromicina determinada en el presente estudio, que coincide con el reportado<sup>7</sup> por Djokic y colaboradores, teniendo como base la configuración absoluta de la eritromicina<sup>32</sup>. Configuración absoluta 2R, 3S, 4R, 5R, 8R, 10 R, 11R, 12S, 13S, 14R.

La estructura obtenida por difracción de rayos X para monocristal para el polimorfo aislado de la solución de etanol-agua corresponde con un cristal monoclinico, con grupo espacial  $P2_1$  y nos indica que esta forma tiene dos moléculas de azitromicina, dos moléculas de agua de hidratación y una molécula de etanol para la unidad asimétrica. Los datos obtenidos de las colecciones de datos se muestran en la Tabla 5.2 y en la figura 5.7 se muestra la estructura molecular de este polimorfo.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

**Tabla 5.2** Valores de los parámetros de la estructura cristalina para los polimorfos de azitromicina.

	<b>Dihidrato</b>	<b>Monohidrato</b>	<b>Anhidro</b>
Fórmula	C <sub>38</sub> H <sub>76</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>39</sub> H <sub>77</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13.50</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>
Peso molecular	785.01	790.04	748.98
Descripción de cristal/color	Prisma/sin color	Prisma/sin color	Prisma/sin color
Sistema cristalino	ortorrómbico	Monoclínico	tetragonal
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P 2 <sub>1</sub>	P 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
a(Å)	14.749 (1)	16.270(2)	14.452 (1)
b(Å)	16.889 (1)	16.300 (2)	14.452 (1)
c(Å)	17.855 (1)	18.51 (2)	41.645 (2)
α	90	90	90
β	90	109.378(11)	90
γ	90	90	90
Volumen (Å <sup>3</sup> )	4447.61	4633.04	8697.99
Z	4	4	8
ρ <sub>(cal)</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	1.172	1.133	1.144
R1 (I > 2σ(I))	0.0503	0.0954	0.0811
Tipo de dispositivo de medición	Siemens P4/PC	Bruker P4	Siemens P4/PC



**Figura 5.7** Estructura de rayos X del pseudopolimorfo aislado de la solución de etanol-agua de azitromicina, con la correcta configuración absoluta. La unidad asimétrica muestra dos moléculas de azitromicina unidas por una molécula de agua a través de puentes de hidrógeno. La molécula de la izquierda hospeda una molécula de etanol, la molécula de la derecha hospeda una molécula de agua.

La única estructura cristalográfica de rayos X disponible para el polimorfo aislado de etanol-agua se puede encontrar como publicación complementaria No. 211997, en el Cambridge Crystallographic Data Centre, determinado por J. Montejo-Bernardo y *col.*<sup>29</sup>. Laboratorios Pfizer, en la patente US 7309782<sup>25</sup>, sólo reporta los parámetros cristalográficos, pero no reporta las coordenadas de la estructura cristalina. Con el fin de hacer una comparación del monohidrato obtenido por nosotros con el obtenido por Montejo-Bernardo y *col.*<sup>29</sup>, se usó el programa Mercury (3.0), que cuantifica similitud en el empaquetamiento molecular entre estructuras cristalinas. Por este medio se encontró que la estructura de Montejo-Bernardo fue construida con una configuración absoluta diferente<sup>29</sup>. En nuestro caso, la configuración absoluta se determina teniendo en cuenta la estructura de la forma dihidratada que se determinó con base en la configuración asignada por Djokic y Kobrehel, y que se basa en la configuración absoluta de la eritromicina<sup>32</sup>, como se había comentado anteriormente.

Entonces, la configuración absoluta correcta es la que se muestra en la figura 5.7. En el trabajo publicado por Montejo-Bernardo y *col.*<sup>29</sup>, la molécula de etanol se encuentra desordenada por lo que no fue posible determinar su posición de este disolvente así como las posibles interacciones que presentaría con la molécula de azitromicina.

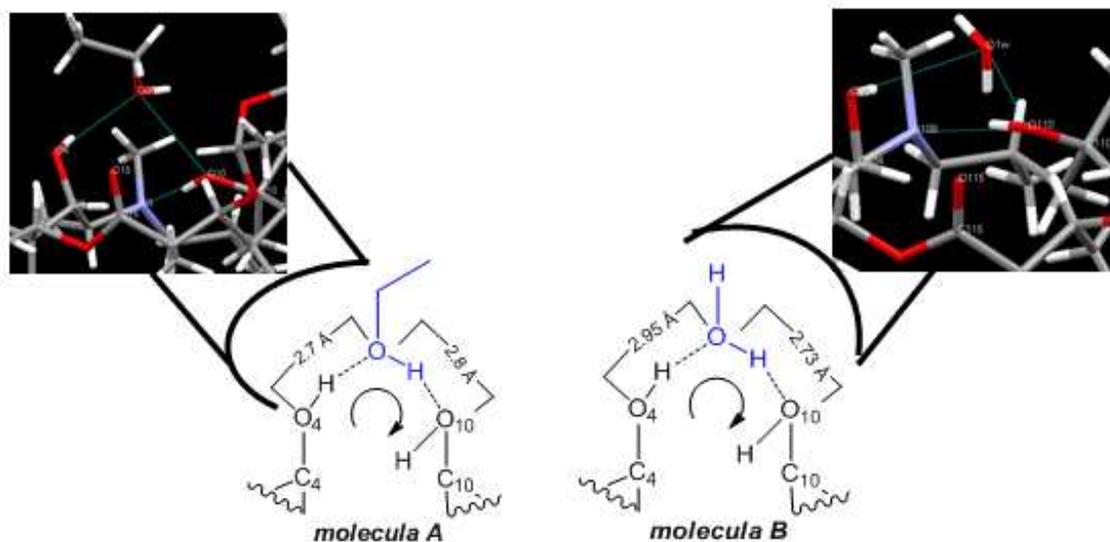
En nuestro caso, hemos sido capaces de establecer la posición del etanol huésped y las moléculas de agua de hidratación, que nos permiten conocer las interacciones de puentes de hidrógeno que establecen con las moléculas de azitromicina hospederas. Además, hemos sido capaces de conocer la organización de estas moléculas en la red cristalina y podemos conocer así los puentes de hidrógeno establecidos por las moléculas, permitiéndonos de esta forma saber si el polimorfo que presentamos se ha reportado anteriormente o es una nueva forma estructural.

De la estructura espacial mostrada en la figura 5.7 se observa que el polimorfo obtenido a partir de la solución de etanol-agua muestra dos tipos de moléculas de

azitromicina en la unidad asimétrica y que haremos referencia a ellas como *moléculas A y B*.

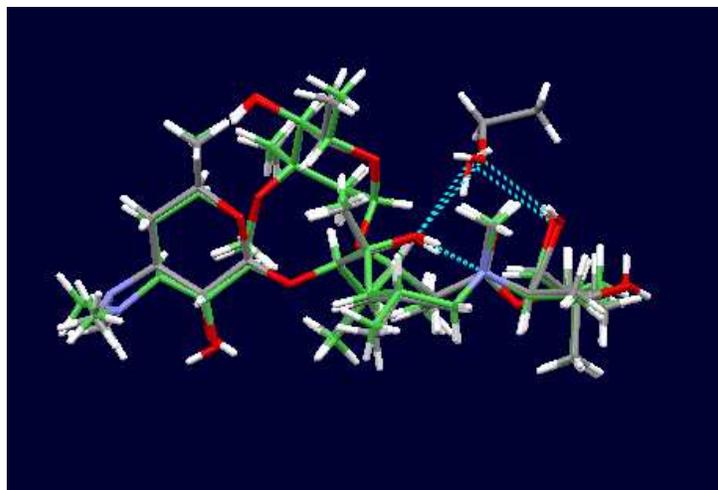
La *molécula A*, es hospedera de una molécula de disolvente (etanol), cerca del centro del macrociclo lactona, que se estabiliza por un puente de hidrógeno intramolecular con el protón del hidroxilo  $O_4-H$  a una distancia de 2.7 Å y con el oxígeno del hidroxilo  $O_{10}-H$  a una distancia de 2.8 Å, ambos hidroxilos forman parte del anillo macrociclo. El arreglo formado por estos puentes de hidrógeno es de tipo homodrómico y estabilizándose por una energía de -7.58 Kcal/mol. El sintón formado se representa en la figura 5.8a.

La *molécula B*, es hospedera de una molécula de agua, situada también cerca del centro del macrociclo lactona, y también se estabiliza por puentes de hidrógeno intramoleculares con los grupos correspondientes del hidroxilo  $O_{10}-H$  a una distancia de 2.73 Å y el protón del hidroxilo  $O_4-H$  a una distancia de 2.95 Å. En este sintón también se observa un arreglo de tipo homodrómico que se estabiliza con una energía de -4.69 Kcal/mol. (Figura 5.8b)



**Figura 5.8** Se muestran los sintones que forman a) la *molécula A* con etanol y b) la *molécula de azitromicina B*, con agua. La energía de estabilización es de -7.58 y -4.69 Kcal/mol respectivamente.

En nuestro caso, como se puede observar en la figura 5.9 encontramos que cada una de las *moléculas A* y *B*, hospedan una molécula diferente que adopta conformaciones similares y la molécula huésped ocupa exactamente la misma posición relativa en la molécula hospedera (etanol o agua). Esta similitud de los conformeros se estableció por nosotros usando el programa Mercury y cuantificando la similitud en el empaquetamiento molecular entre ellos<sup>31</sup>.

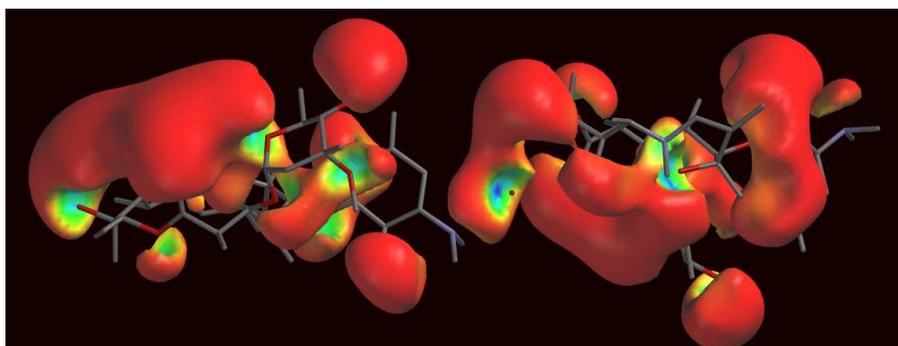


**Figura 5.9** Se muestra el estudio conformacional realizado para comparar la similitud de conformaciones de la *molécula A* que hospeda una molécula de etanol, con la *molécula B* que hospeda una molécula de agua. Ambas moléculas forman parte del polimorfo monohidrato obtenido en el presente trabajo.

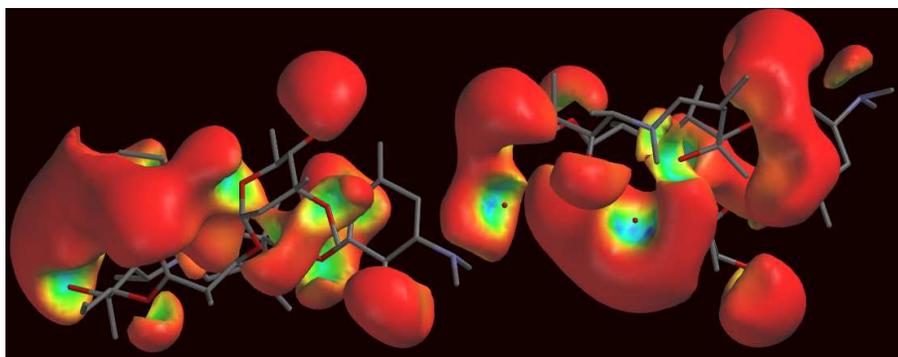
El alojamiento del huésped en la molécula de azitromicina se ve facilitado por las regiones de electrodonador y electroceptor del macrociclo de lactona del hospedero, tal que el protón del hidroxilo  $O_4$  y el hidroxilo  $O_{10}$  del hospedero (figura 5.10) establecen puentes de hidrógeno con  $O_{1w}$  en el caso donde el huésped es agua y con hidroxilo  $O_{205}$  en el caso donde el huésped es etanol. Estas propiedades de electrodonador del macrociclo de lactona se puede observar en el mapa de potencial electrostático mostrado en la figura 5.10. La nube negativa alrededor del macrociclo es la región en la que se fija el huésped, en el interior de una canasta plegada. Este comportamiento se observa que es similar en ambos casos, de agua y de etanol (ver figura 5.10). En a) las superficies electrostáticas en las moléculas vacías son de color azul en algunas partes de la región del macrociclo, indicando la presencia de donadores de puentes de hidrógeno, donde las densidades de potenciales negativas predominan, y también

hay zonas rojas que indican la presencia de aceptores de puentes de hidrógeno, donde la superficie de potencial electrostático negativa potenciales sobresale. En b) la superficie de potencial electrostático ha cambiado y ahora los aceptores de puentes de hidrógeno y los donadores están ubicados en diferentes zonas del macrociclo.

a)



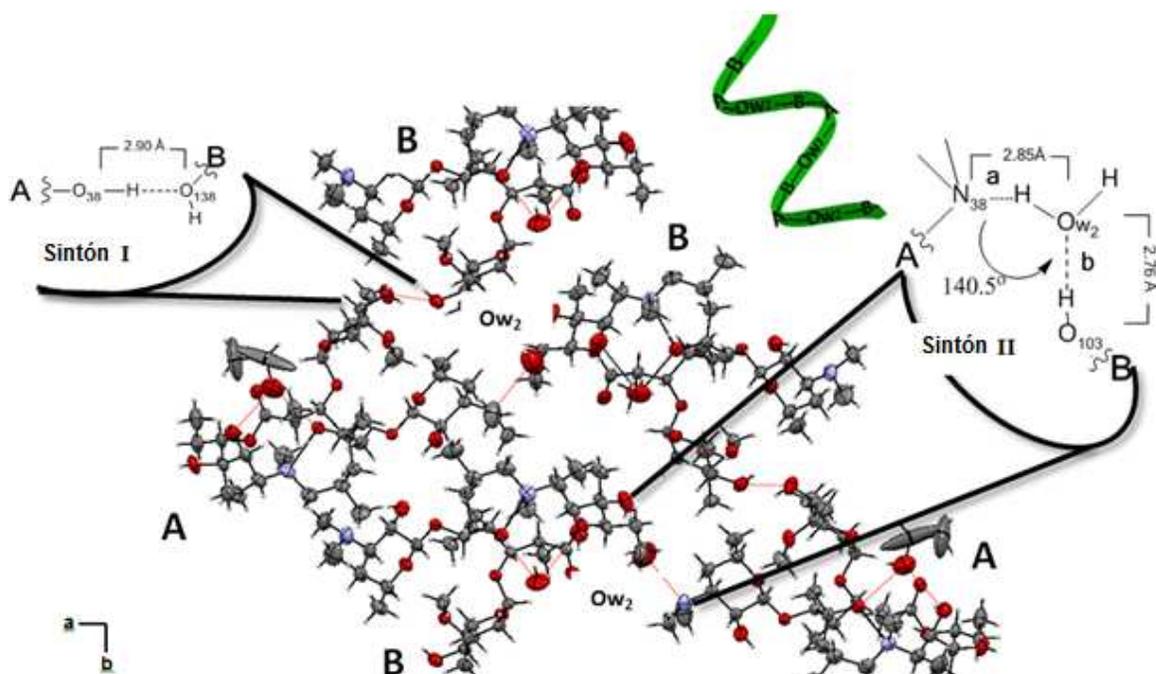
b)



**Figura 5.10** Superficie de potencial electrostático de las *moléculas A* (lado izquierdo) y *B* (lado derecho) para el polimorfo obtenido de la solución etanol-agua. *Molécula A* hospedera de una molécula de etanol y *molécula B* hospedera de una molécula de agua. En la parte superior se muestran las *moléculas A* y *B* sin solutos, en la parte inferior se muestran las moléculas con los solutos huéspedes. Estas dos moléculas se unen a través de una segunda molécula de agua mediante puentes de hidrógeno.

Con respecto a los puentes de hidrógeno intermoleculares que mantienen la celda cristalina, una segunda molécula de agua  $O_{2w}$  establece puentes de hidrógeno con las *moléculas A* y *B*. Con la *molécula A* a través de su  $N_{28}$  del grupo dimetilamina de la azúcar D-desosamina y con la *molécula B* a través de su hidroxilo  $O_{103}H$  de

su L-cladinosa. Estos dos puentes de hidrógeno constituyen uno de los sintones que estabilizan la formación cristalina. (Figura 5.11). Además, el hidroxilo  $O_{38}$  de la L-cladinosa de la *molécula A* es un hidrógeno enlazado con el hidroxilo  $O_{138}$  de la L-cladinosa de una *molécula B* vecina, formando un segundo sintón que estabiliza la red cristalina (figura 5.11). Este esquema se mantiene a lo largo del eje **a** formando un listón con la secuencia A- $O_{2w}$ -B-A hasta que la *molécula A* gira otra vez y crece nuevamente en el sentido correcto a lo largo del eje **a**. Entonces la secuencia A- $O_{2w}$ -B-A se repite a lo largo del eje **b** generando la estructura supramolecular de la red cristalina. A lo largo del eje **c** este listón se repite infinitamente.



**Figura 5.11** Red cristalina del polimorfo monohidrato, obtenido a partir de la solución de etanol-agua, donde se indican los dos tipos de confórmers de azitromicina A y B y las energías calculadas de cada uno de los sintones formados que estabilizan la red cristalina. La energía calculada para el sintón I es de  $E = -10.07$  Kcal/mol y para el sintón II es  $E_a = -3.26$  Kcal/mol y  $E_b = -7.86$  Kcal/mol.

Con el fin de estimar las energías de los puentes de hidrógeno que constituyen los sintones que forman la red cristalina, se realizaron cálculos químico cuánticos. Los valores obtenidos se muestran en la figura 5.11. Así, el confórmero A es

estabilizado por un sintón  $N_{28}-O_{w2}-O_{103}$  (Sintón II) y específicamente por el puente de hidrógeno  $O_{2w}-N_{28}$ , a continuación su energía calculada es  $E_a = -3.26$  kcal/mol. El *confórmero A* está enlazado al *confórmero B* a través de un sintón  $O_{138}-O_{38}$  (Sintón I), su energía calculada es  $E = -10.07$  kcal/mol, que nos da una fuerza total de  $E = -13.33$  kcal/mol (ver figura 5.11). Para el *confórmero B* la energía de estabilización se obtiene por la suma del puente de hidrógeno  $O_{38}-O_{138}$  igual a  $E = -10.07$  kcal/mol y el puente de hidrógeno  $O_{103}-O_{2w}$  igual a  $E_b = -7.86$  kcal/mol que suma  $E = -17.93$  kcal/mol. Esta es la energía de estabilización de cada *confórmero* en el listón supramolecular. La energía de estabilización calculada para el motivo  $A-O_{2w}-B-A$  resulto de  $E = -31.26$  kcal/mol (figura 5.11).

Tal como se ha mencionado anteriormente, en la literatura se han descrito varios monohidratos aislados a partir de soluciones de etanol-agua. Entre ellos, tres monohidratos han sido reportados por Pfizer, uno altamente higroscópico debido a Bright<sup>20</sup>; otro supuestamente estable debido a Allen y Nepveux<sup>22</sup>, y otro debido a Li<sup>25b</sup>. Además, Gandhi y *colaboradores*<sup>28</sup> informaron de una forma higroscópica que fue identificada por DSC, TGA, KFT, XRD, HSM, SEM y FT-IR. El laboratorio Teva Pharmaceutical Industries patentó una forma que argumentó era estable<sup>26</sup>, y el laboratorio Biochemie S.A. patentó<sup>27</sup> también una forma supuestamente estable. Entre todos los monohidratos reportados y patentados, solo Pfizer determinó y reportó los datos cristalográficos para uno de sus monohidratos<sup>25</sup> y J. Montejó-Bernardo y *colaboradores*<sup>29</sup> utilizando el método patentado por Biochemie S.A.<sup>27</sup> obtuvieron una forma monohidratada, de la cual determinaron la estructura por rayos X por el método de monocristal (Datos cristalográficos depositados en forma de publicación complementaria No. 211997 en CCDC). El resto de los informes sobre monohidratos aislados de soluciones de etanol-agua, apoyan la elucidación estructural de sus polimorfos principalmente en rayos X por el método de polvo. Con base en esto J. Montejó-Bernardo y *colaboradores*<sup>29</sup>, compararon y demostraron que los patrones de la difracción de rayos X de polvo de los monohidratos de Teva, Biochemie y Pfizer eran similares, y mencionaron que estos datos pueden ser indexados para dar celdas casi idénticas como los

encontrados por el método de monocristal, llegando a la conclusión de que todos estos datos de difracción de rayos X por el método de polvos deben generar patrones de rayos X de monocristal similares, con datos de parámetros estructurales similares.

En la Tabla 5.3 se comparan los parámetros de las estructuras cristalinas disponibles de los polimorfos aislados a partir de soluciones de etanol-agua, por Montejo-Bernardo<sup>29</sup>, por Pfizer Inc<sup>25</sup> y el obtenido en el presente estudio.

**Tabla 5.3** Valores de los parámetros de la estructura cristalina para azitromicina aislada de soluciones de etanol-agua.

	<b>Pfizer Inc. US 6977243 20.Dic.2005</b>	<b>Montejo-Bernardo Z.Kristallogr. (2003), 218, 703</b>	<b>Presente estudio EtOH/H<sub>2</sub>O</b>
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub>	P 2 <sub>1</sub>	P 2 <sub>1</sub>
a(Å)	16.4069(8)	16.1578(4)	16.270(2)
b(Å)	16.2922(8)	16.1144(5)	16.300 (2)
c(Å)	18.3830	18.3107(4)	18.519 (2)
β	110.212(2)	109.436(1)	109.378(11)
Z	4	4	4
ρ <sub>(cal)</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	1.13		1.133
R	0.0688	0.0625	0.060
Volumen (Å <sup>3</sup> )		4495.9(2)	4632.9(11)

En la patente US 7309782<sup>25</sup> Pfizer reportó dieciséis formas cristalinas diferentes que fueron agrupadas en tres familias isomórficas diferentes que se definen como aquellas formas que cristalizan con el mismo grupo espacial, con pequeñas variaciones de los parámetros de celda. Dado que cristalizan con diferentes disolventes orgánicos pueden tener diferente composición elemental, originada por

las diferencias en la composición química, aunque relacionado químicamente con las estructuras. Se estableció que no es posible concluir similitud en la estructura de moléculas cristalinas sólo por las similitudes en el grupo espacial y/o parámetros de las celdas<sup>25</sup>. No obstante, estos autores sostienen que los isomorfos muestran análogos pero no iguales patrones de DRX de polvos y diferencias claras que se pueden observar en los espectros de RMN de sólido. Eso significa que los grupos espaciales iguales y/o parámetros de la celda no garantizan las mismas estructuras cristalinas, por el contrario, misma difracción de rayos X y mismo espectro de RMN de sólido muy probablemente corresponden con similares grupos espaciales y parámetros de celda. Entonces, por comparación de la difracción de rayos X de polvos de los monohidratos patentados por laboratorios Teva Pharmaceutical Industries Ltd<sup>26</sup>, Biochemie S.A.<sup>27</sup>, Pfizer Inc.<sup>25b</sup>, y Apotex<sup>30</sup> Inc., Montejo-Bernardo concluyó que todos ellos son los mismos polimorfos<sup>29</sup>, y en consecuencia el patrón de la difracción de rayos X de monocristal de los cristales analizados sería similar a las formas reportadas por estos laboratorios.

Por otra parte, diferentes patrones de DRX de polvos y diferentes espectros de RMN de sólido pueden corresponder a estructuras diferentes, independientemente de que se muestren mismos parámetros de celda y similares grupos espaciales<sup>25</sup> (formas isomórficas).

**Tabla 5.4** Comparación experimental y calculada de DRX de polvo representativos de  $2\theta$  para los polimorfos aislados de soluciones de etanol-agua.

Experimento	2 $\theta$													
	Polimorfo monohidrato obtenido experimentalmente	6.23	11.24	11.50	14.0	14.68	14.86	16.17	0	16.62	17.11	0	17.74	21.05
Calculado para el polimorfo obtenido*	6.29	11.21	11.51	14.0	14.68	14.90	16.16	0	16.66	17.15	17.35	17.74	21.08	0
Obtenido por Laboratorio Pfizer/US7309782B2	6.20	11.2	11.40	14.0	14.70	14.80	16.20	0	16.60	17.20	17.30	17.70	21.00	0
Calculado a partir de los datos obtenidos de Montejo <sup>29,*</sup>	6.36	11.39	11.64	0	14.50	14.84	16.03	16.37	16.80	0	17.31	17.73	20.72	21.31

\*Calculado mediante el uso de Mercury 3.0, a partir de los datos experimentales de monocristal obtenidos en el presente estudio. \*\*Para Montejo y col.<sup>29</sup> a partir de datos cristalográficos No. 211997 depositados en CCDC.

Los resultados experimentales de la Difracción de Rayos X por el método de polvo se muestran en las figuras 5.12. (Anexo 1).

La comparación de los patrones de rayos X de polvo reportados por Pfizer para el monohidrato<sup>25b</sup>, con los obtenidos experimentalmente en el presente estudio, con el calculado a partir de la cristalografía reportada por Montejo-Bernardo, y el calculado obtenido a partir de nuestra estructura de monocristal de la forma polimórfica encontrada en el presente estudio, manifiestan ciertas diferencias. En la Tabla 5.4 se comparan los ángulos  $2\theta$  para el intervalo entre 5 y 21; y desde donde puede ser claramente observado que ambos patrones muestran ligeras diferencias.

Para la RMN de sólido, Pfizer asignó como señales representativas de la forma monohidrato a dos desplazamientos químicos en 179.5 ppm y 178.6 ppm, y 5 picos en 10.1, 9.8, 9.3, 7.9 y 6.6 ppm, y señales de etanol en 58.0 +/- 0.5 ppm y 17.2 +/- 0.5 ppm. En nuestro caso estas señales se encuentran en 182.34 y 181.4 ppm y en 12.995, 12.567, 12.140, 10.687, 9.49 ppm (ver figuras 5.13. Anexo 1), que son grandes diferencias con los desplazamientos reportados de Pfizer. Además, el resto de las señales también mostró diferencias significativas con el de Pfizer (ver Tabla 5.5), especialmente las correspondientes con el metilo sustituido en el macrociclo lactámico, que no se reportan ó encontraron por Pfizer (ver Tabla 5.5).

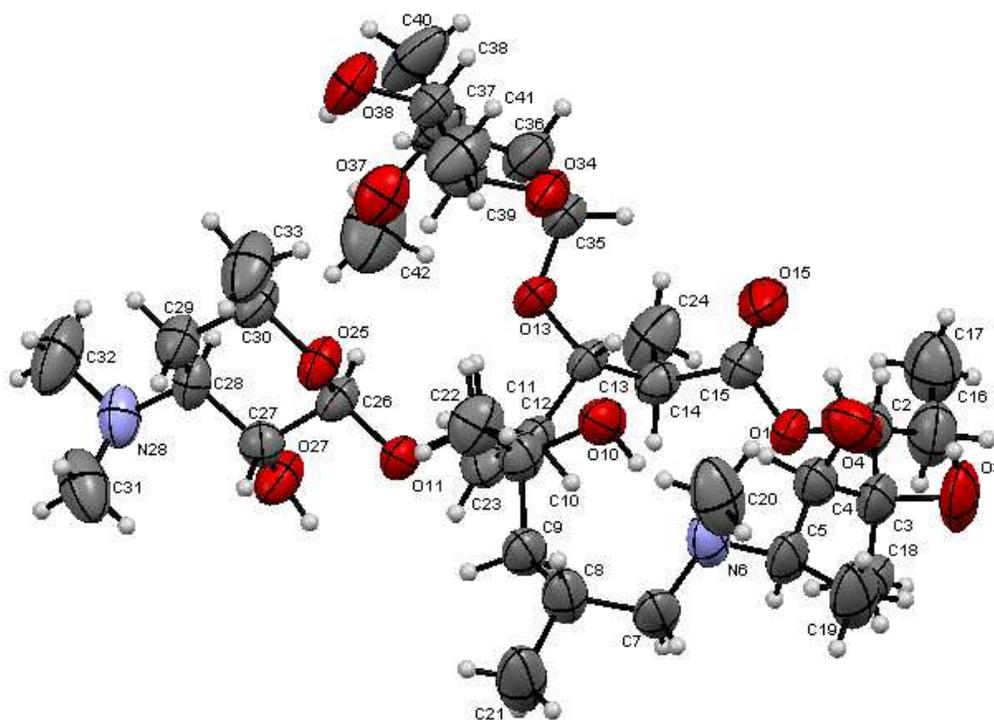
**Tabla 5.5** Desplazamientos representativos de los polimorfos aislados a partir de una solución de etanol-agua.

	Desplazamiento en ppm								
	C=O	C=O	C <sub>a</sub>	C <sub>a</sub>	C <sub>38</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>3</sub>	EtOH
Monohidrato Presente estudio	182.34	181.40	108.31/ 106.25	97.88/ 101.21	82.0/ 82.21	79.38	77.53	72.33	54.96/ 16.07
Laboratorio Pfizer/US7309782B2	179.5	178.6	105.5/103.4	94.9	79.1	78.1	77.9	77.02	58.0/ 17.2

C<sub>a</sub> corresponde al carbón anomérico de D-Desosamina y L-Cladinoso. El metilo sustituido en el macrociclo lactámico en el presente estudio se encuentra en: (C<sub>23</sub>) 9.5/10.0, (C<sub>19</sub>) 13/13.2, (C<sub>17</sub>) 12.4/12.6, (C<sub>24</sub>) 14.2/15.0, (C<sub>18</sub>) 20.3, (C<sub>21</sub>) 23.0/23.6, (C<sub>22</sub>) 27.0 ppm.

Estos resultados sugieren que el polimorfo cristalino aislado de la solución de etanol-agua en el presente estudio podría ser diferente a los publicados en la literatura.

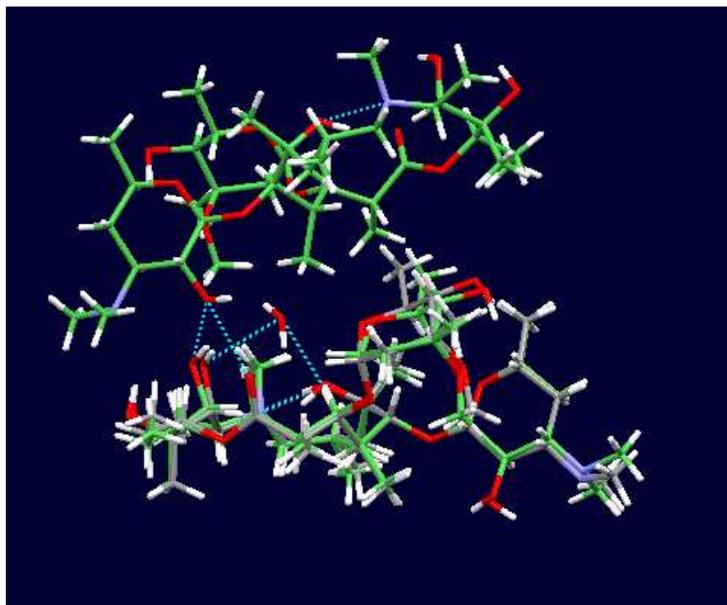
En relación con el polimorfo aislado de la suspensión de hexano, el patrón de rayos X de monocristal muestra que en efecto, tal como se dedujo de los datos calorimétricos, los cristales corresponden con una forma anhidra. Se muestra un sistema cristalino tetragonal con un grupo espacial  $P4_22_12$ . En la Tabla 5.2 los datos cristalográficos obtenidos se comparan con los valores de los parámetros obtenidos para el dihidrato, y para el aislado de la solución de etanol-agua. En la figura 5.14 se muestra la estructura molecular.



**Figura 5.14** Estructura de rayos X del polimorfo de azitromicina aislado de la suspensión de hexano.

Para el polimorfo anhidro, en la unidad asimétrica sólo hay un tipo de confórmero. Este confórmero es similar a los encontrados para el polimorfo de etanol-agua, esto no cambia independientemente de que molécula interactúa con el macrociclo de azalactona de la molécula hospedera. Esto se puede observar en la figura 5.15

en donde se encuentran superpuestos los dos confórmeros de azitromicina-huésped agua (polimorfo monohidrato, *molécula B*) y con azitromicina-huésped azitromicina (polimorfo anhidro)

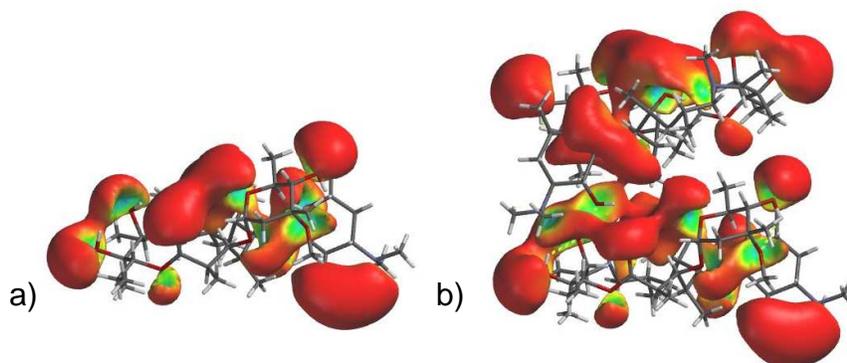


**Figura 5.15** Superposición de confórmero del polimorfo monohidratado (*molécula B*, azitromicina-huésped agua) con el confórmero único del polimorfo anhidro (azitromicina- huésped azitromicina), recreado por el programa Mercury v3.0

Las superficies de potencial electrostático de la molécula para el polimorfo anhidro, son similares a las obtenidas previamente para la azitromicina sola sin solutos interactuando (figura 5.16). Las características de electrodonador del macrociclo lactona se mantienen, y entonces la zona de interacción está ocupada por una molécula vecina *B* de azitromicina colocada cerca del macrociclo en una dirección positiva del eje *a*. En el caso anterior (el polimorfo etanol-agua), las interacciones de la molécula huésped (solute ó moléculas de agua) fueron con  $O_{10}$  y el protón del hidroxilo  $O_3$  de la molécula hospedera.

Ahora, en el caso anhidro, la molécula de azitromicina vecina *B* establece puentes de hidrógeno a través de su hidroxilo  $O_{27}$  con el carbonilo  $O_{15}$  y el hidrógeno del hidroxilo  $O_4$  del macrociclo de lactona de la molécula hospedera *A*. No obstante, cabe señalar que  $O_4$  de la molécula hospedera interactúa con el hidroxilo  $O_{27}$  de la molécula huésped independientemente de que pertenece a otra molécula de

azitromicina, agua o etanol. Esta interacción constituye el sintón III. En el mismo eje *a*, en dirección negativa, la molécula hospedera *A* con su hidroxilo  $O_{27}$  establece puentes de hidrógeno con el carbonilo  $O_{15}$  y con el hidrógeno del hidroxilo  $O_4$  de una molécula huésped vecina *C*. Entonces, se trata de nuevo del sintón III, pero ahora está estructurado en el sentido inverso con otra *molécula C*. En ambos casos la dirección de los puentes de hidrógeno es homodrómica.

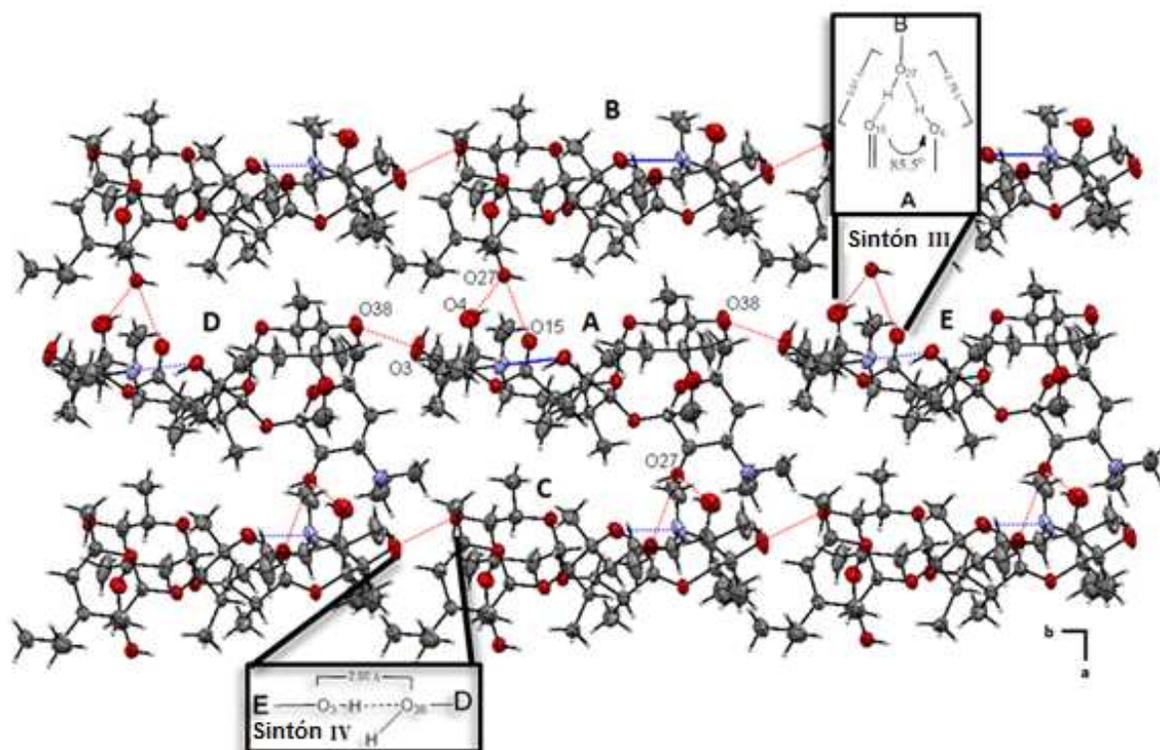


**Figura 5.16** Superficie de potencial electrostático del polimorfo cristalino anhidro. En a) se muestra una sola molécula sin interacciones, entonces las densidades electrostáticas cubren parte de la región del macrociclo y muestran un color rojo muy fuerte, lo que indica un potencial electrostático negativo, característica de aceptores de puentes de hidrógeno. En b) una molécula vecina de azitromicina ha ocupado el nicho en el macrociclo y entonces la superficie de potencial electrostático se ubica en diferentes zonas alrededor del macrociclo y las intensidades han cambiado.

A lo largo del eje *b* la molécula *A* establece puentes de hidrógeno con las moléculas de *D* y *E*, donde el hidrógeno del hidroxilo  $O_3$  de la molécula *A* establece en un lado un puente de hidrógeno con el hidroxilo de  $O_{28}$  de cladinosa de la *molécula D*, y en el otro lado del hidroxilo  $O_{28}$  del resto de la cladinosa de la molécula *A* establece un puente de hidrógeno con el hidroxilo  $O_3$  de la molécula *E*. Este tipo de interacción se expresa como sintón IV.

Estas interacciones forman una red compacta estructurando una red supramolecular similar a una hoja infinita. La red supramolecular se forma por la superposición de láminas a lo largo del eje *c*.

Las características de las distancias intermoleculares, ángulos y energías de puentes de hidrógeno se muestran en la figura 5.17.



E= - 19.94 Kcal/mol

E= -3.32 Kcal/mol

**Figura 5.17** Red cristalina del polimorfo obtenido a partir de la suspensión de hexano, donde se indican los puentes de hidrógeno intermoleculares que estabilizan la red cristalina. También se muestran los dos tipos diferentes de sintones y las energías calculadas de cada uno de los sintones formados que estabilizan la red cristalina.

Siendo este el caso, cada molécula está fijada en una posición espacial por una energía de  $(-3.32 \times 2 = -6.64; -19.94 \times 2 = -39.88; \text{TOTAL} = 46.52) - 46.52$  kcal/mol (ver los valores de energía de cada sintón en la figura 5.17).

## 6. CONCLUSIONES

- 6.1 Se aislaron y caracterizaron dos polimorfos de azitromicina.
- 6.2 A partir de una solución de etanol-agua se aisló un polimorfo al que se le denominó monohidrato, después de haber sido comparado con otros polimorfos reportados en la literatura y en base de datos de patente, se encontró algunas diferencias importantes con ellos, lo que sugiere que es una forma nueva, siendo su punto de fusión de 136°C.
- 6.3 Se logró aislar de una suspensión de hexano una forma cristalina anhidra con punto de fusión 186 °C al cual se le llamo poli morfo anhidro.

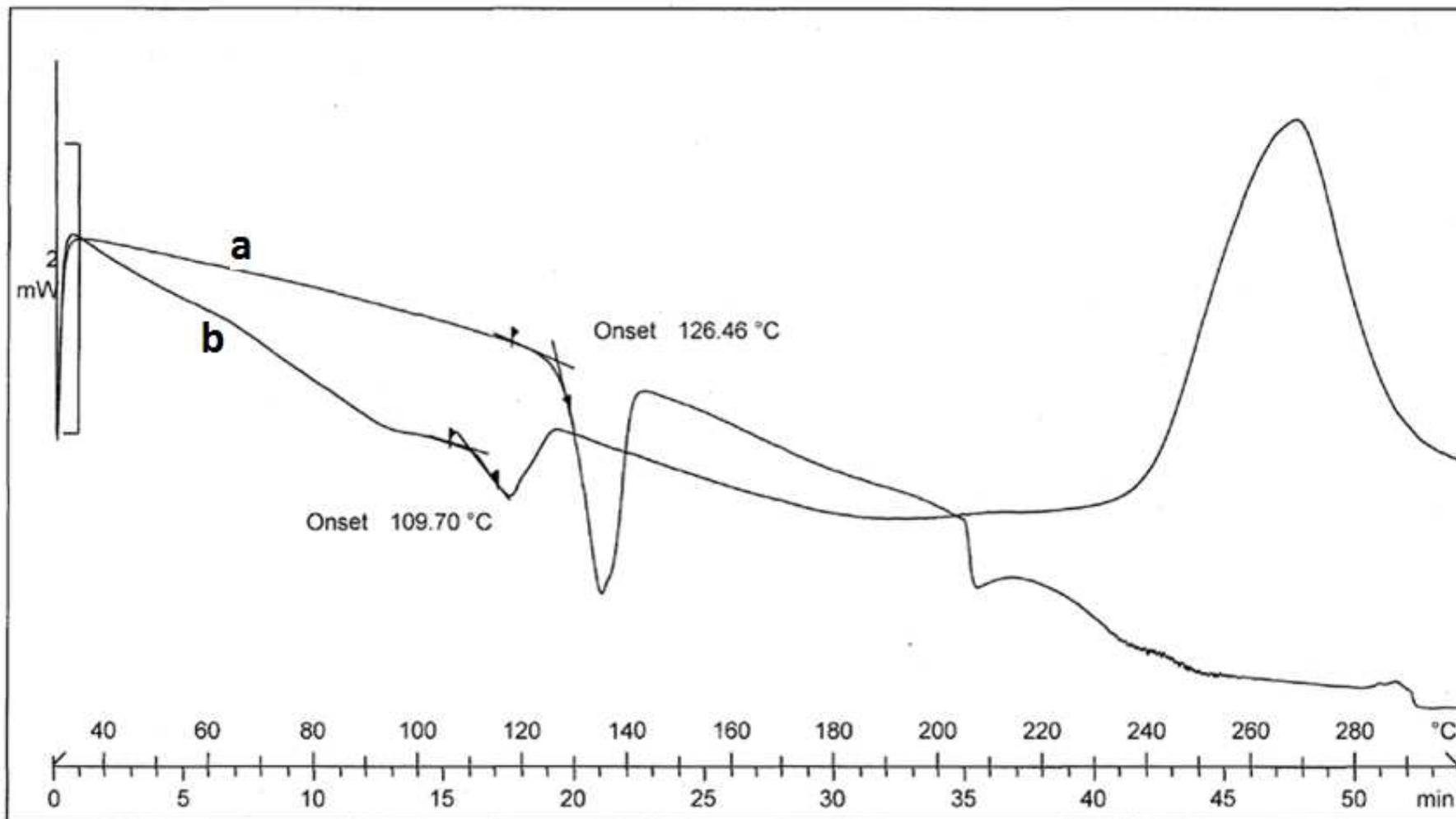
## 7. REFERENCIAS

1. Hilfiker Rolf, *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, Editorial WILEY-VCH, Weinheim Alemania, **2006**.
2. Sánchez G. Elizabeth, *et al.*, *Relevancia del polimorfismo en el área farmacéutica*, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 38(002), 57-76, **2007**.
3. R. Prohens y C. Puigjaner, *Polimorfismo en la industria farmacéutica*, El farmacéutico, 373, 58-68, **2007**.
4. Martín Islán África, Molina Montes Esther, *Polimorfismo farmacéutico*, Ámbito farmacéutico Farmacocinética, 25(8), **2006**.
5. *ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism, Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, Julio **2007**.
6. Wavefunction Inc, 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612, USA).
7. **a)** S. Djokic y G. Kobrehel, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1881-1890, **1986**, **b)** J. Chem. Res. (M) 1239-1261, **1988**, **c)** J. Chem. Res.(S) 152-153, **1988**.
8. G. Kobrehel y S. Djokic, Czechoslovakian Patent 592/81, Marzo 6, **1981**.
9. G. Kobrehel y S. Djokic (Sour Pliva farmaceutska, kemijska prehrambena I kosmeticka industrija) US patent 4517359, Mayo, 14, **1985**.
10. <http://www.emedexpert.com/facts/azithromycin-facts.sh>
11. Nakornchai S, Konthiang P., *Activity of azithromycin or erythromycin in combination with antimalarial drugs against multidrug-resistant Plasmodium falciparum in vitro*, ACTA TROPICA, 100, 185-191, **2006**.

12. Taylor W. R., *et al.*, *Malaria prophylaxis using azithromycin: a double-blind, placebo-controlled trial in Irian Jaya, Indonesia*, *Clin. Infect. Dis.*, 28(1), 74-81, **1999**.
13. Girard Arthur E., *et al.*, *Pharmacokinetic and In Vivo Studies with Azithromycin (CP-62,993), a New Macrolide with an Extended Half-Life and Excellent Tissue Distribution*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(12), 1948-1954, Diciembre **1987**.
14. Hyoung Cheul Kim, Sung Ho Kang, *Total synthesis of azithromycin*, *Wiley InterScience*, 48(10), 1827-1829, **2009**.
15. Montejo-Bernardo J. M., *et al.*, *On the solid state conformation of azithromycin monohydrate and dihydrate pseudopolymorphs*, *Z. Kristallogr.*, 220(1), 66-73, **2005**.
16. Harris D. R., *et al.*, *Structure and stereochemistry of erythromycin A*, *Tetrahedron Lett*, 11, 679-685, **1965**.
17. Luger P. Maier R., *Molecular structure of 9-deoxy-11-deoxy-9-11-[imino-2-(2-methoxyethoxy)ethylidene)oxy]-(9S)-erythromycin, a new erythromycin derivative*, *J. Cryst. Mol. Struct.*, 9(6), 329-338, **1979**.
18. Lazarevski G., *et al.*, *Conformational analysis of azithromycin by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and molecular modeling*, *Tetrahedron*, 49(3), 727-730, **1993**.
19. Awar A. *et al.* *Conformational analysis of the erythromycin analogues azithromycin and clarithromycin in aqueous solution and bound to bacterial ribosomes*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, 1653-1654, **1995**.
20. G. M. Bright, (Pfizer, Inc.) US patent 4474768, Octubre, 2, **1984**.
21. D.J. M. Allen y K.M. Nepveux, (Pfizer, Inc.), US patent 6268489, Julio 31, **2001**.
22. Pfizer, Inc., US 2002/0007049, Enero 17, **2012**.

23. Zheng J. Li y A. V. Trask (Pfizer, Inc.) Patent Application US 2003/0162730, Agosto, 28, **2003**.
24. Claude Singer y Judith Aronhime (Teva Pharmaceutical Industries Ltd.) Patent Application US 6365574, Abril, 2, **2002**.
25. **a)** Zheng J. Li y A. V. Trask (Pfizer, Inc.) US 7053192, Mayo, 30, 2006; **b)** Zheng J. Li y A. V. Trask (Pfizer, Inc.) US 7309782, Diciembre, 18, 2007. Biochemie S.A., WO 010064, Enero 4, **2001**.
26. C. Singer, J. Aronhime (Teva Pharmaceuticals Industries Ltd) US patent 6365572, Abril 2, **2002**.
27. V. Centella, R. García, M. Posch, J. Diago, J. Ludescher, I. Bosch (Biochemie S.A.), WO 010064, Enero 4, **2001**.
28. R. Gandhi, *et al.*, *Characterization of Azithromycin hydrates*, European Journal Pharm. Sci., 16, 175-184, **2002**.
29. J.M. Montejo Bernardo, S. García-Granda, M.S. Bayod-Jasanada, L. Llavona-Díaz, y I. Llorente, Z. Kristallogr. 218, 703-707 **2003**.
30. K. Karimian y M. Motamedi (Apotex, Inc.) US patent 6245903, Junio, 12 **2001**.
31. Mercury package 3.0, Cambridge Crystallographic Data Centre, [www.ccdc.cam.ac.uk/mercury](http://www.ccdc.cam.ac.uk/mercury).
32. J. Oliver y L.C. Strickland, Act. Cryst. C. 42,452 **1986**.

# **Anexo 1**



**Figura 5.1** Calorimetría diferencial de barrido para el dihidrato **a)** usando una capsula sin perforar; **b)** usando una capsula perforada

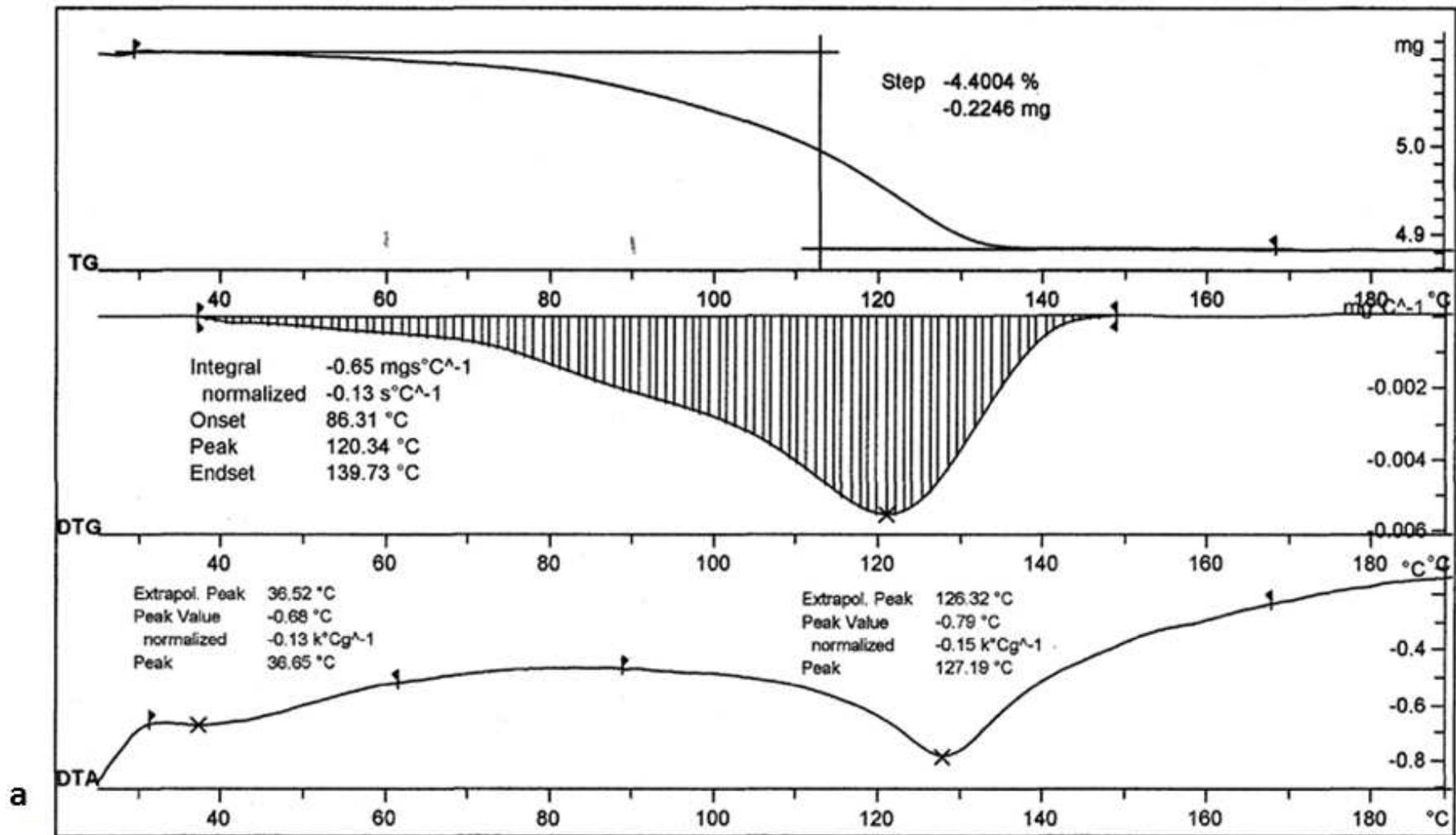


Figura 5.2 a) Análisis Termogravimétrico para el polimorfo dihidrato.

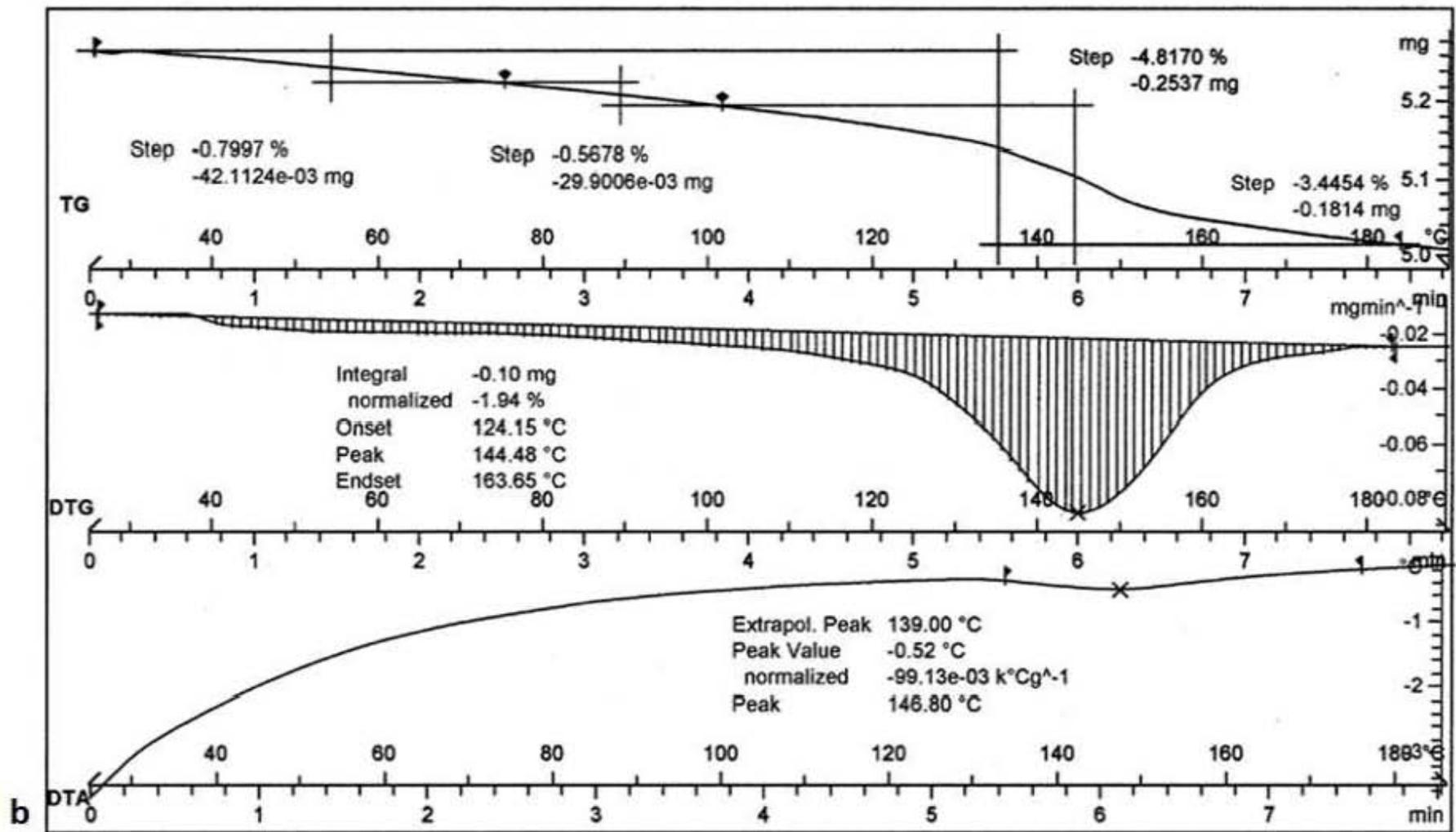
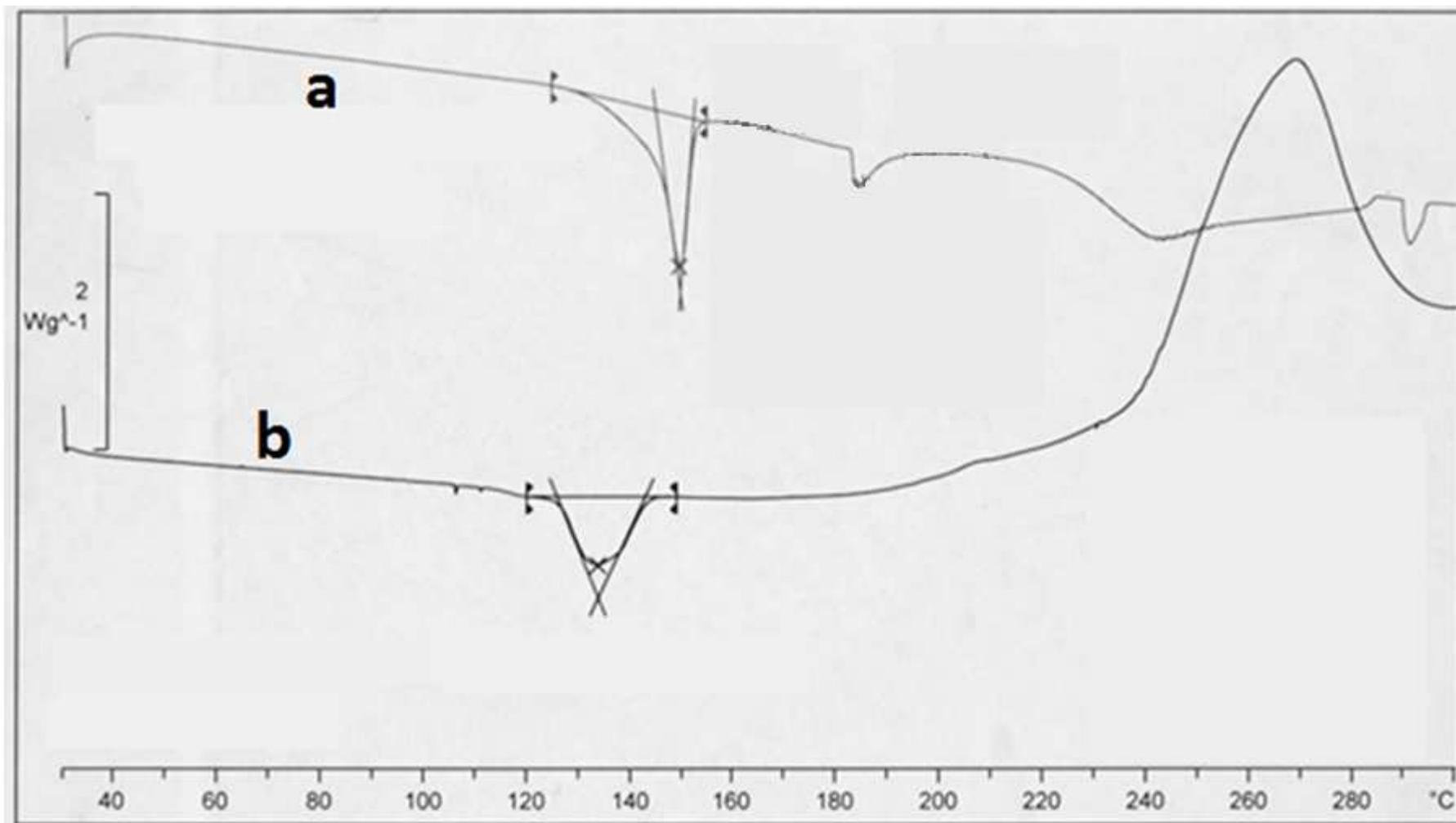
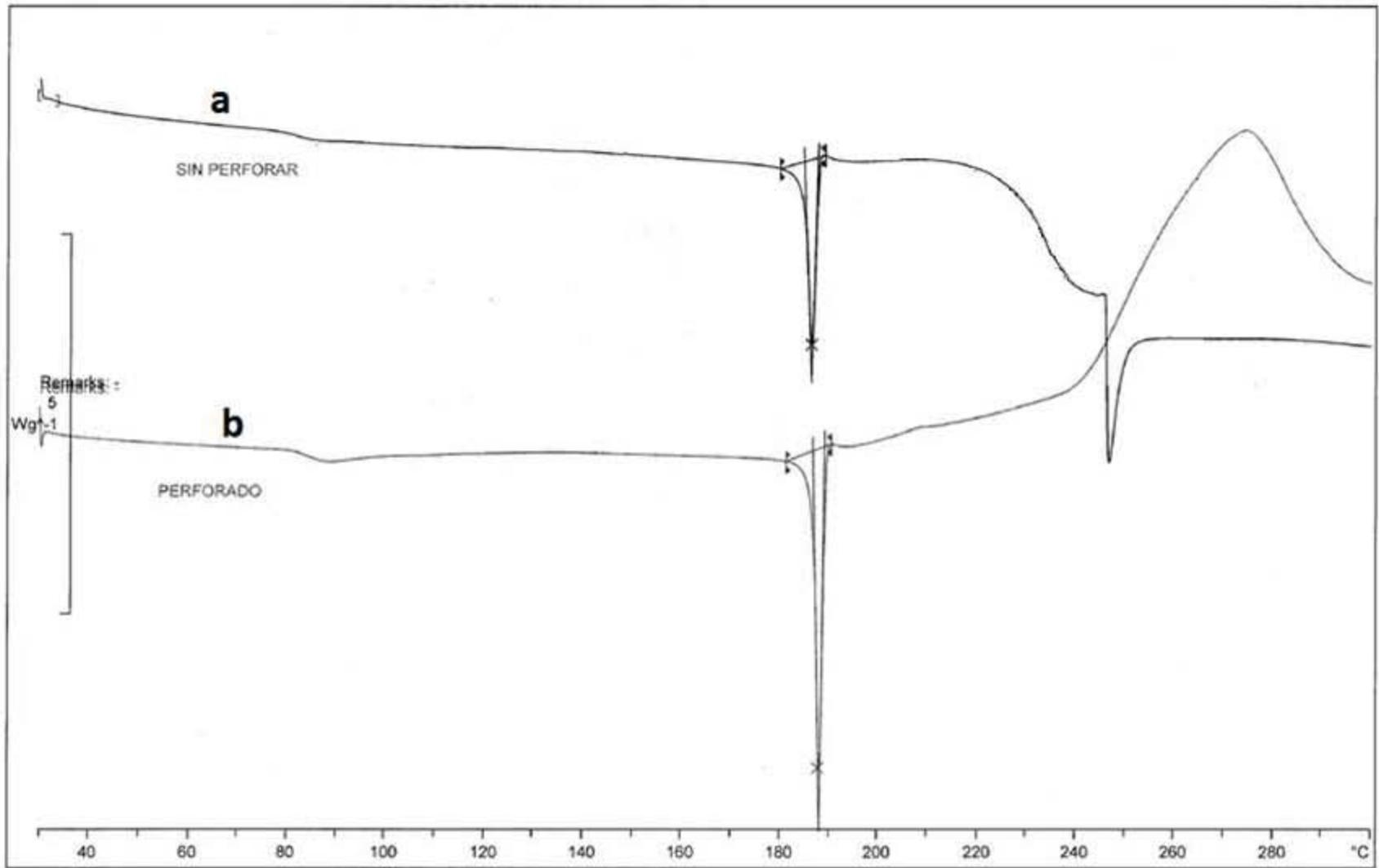


Figura 5.2. b) Análisis Termogravimétrico para el polimorfo monohidrato.





**Figura 5.3** Calorimetría Diferencial de Barrido para el polimorfo monohidrato **a)** usando una capsula sin perforar; **b)** usando una capsula perforada.



**Figura 5.4** Calorimetría Diferencial de Barrido para el polimorfo anhidro **a)** usando una capsula sin perforar; **b)** usando una capsula perforada.

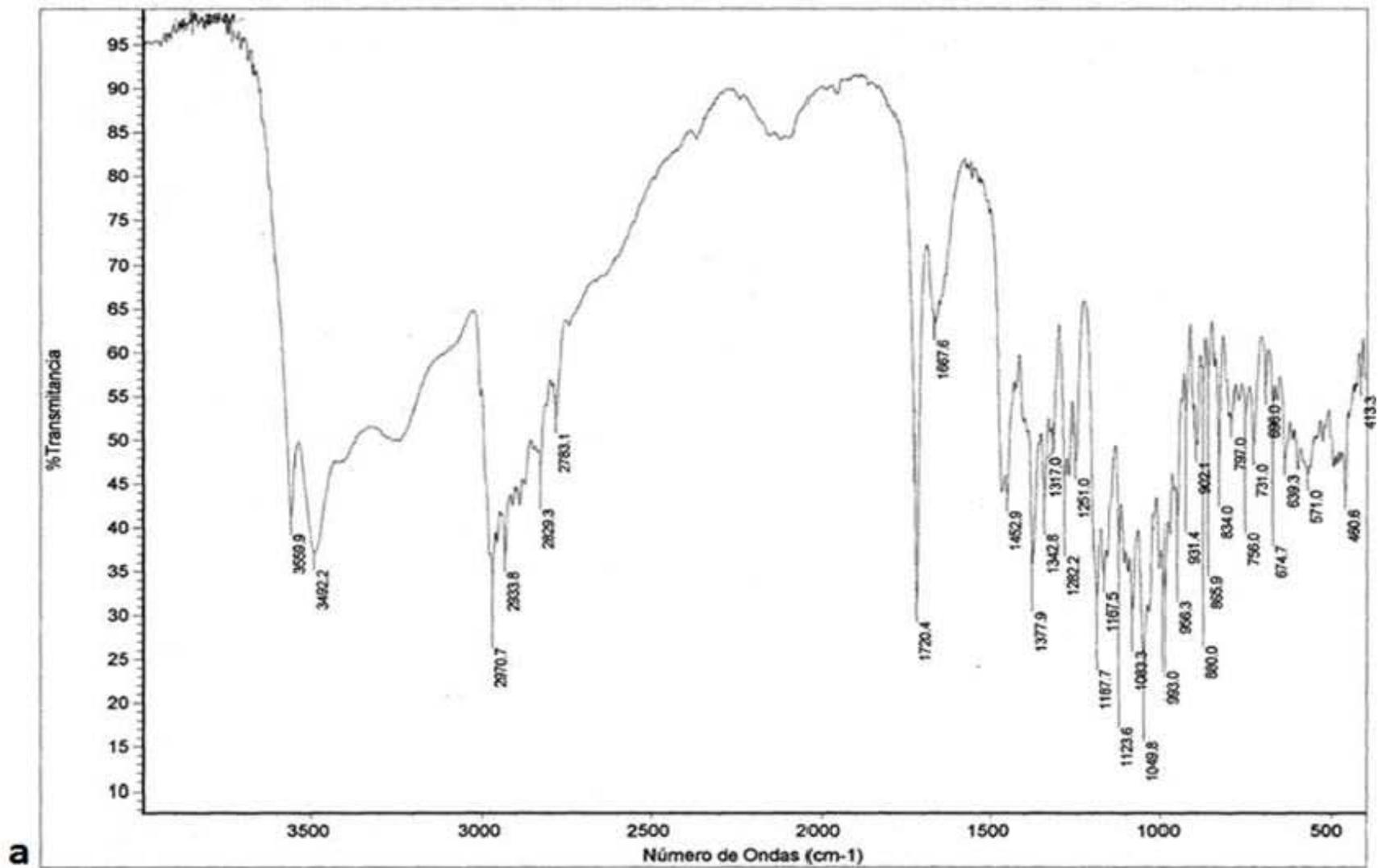


Figura 5.5 a) Espectro experimental de IR del polimorfo dihidratado.

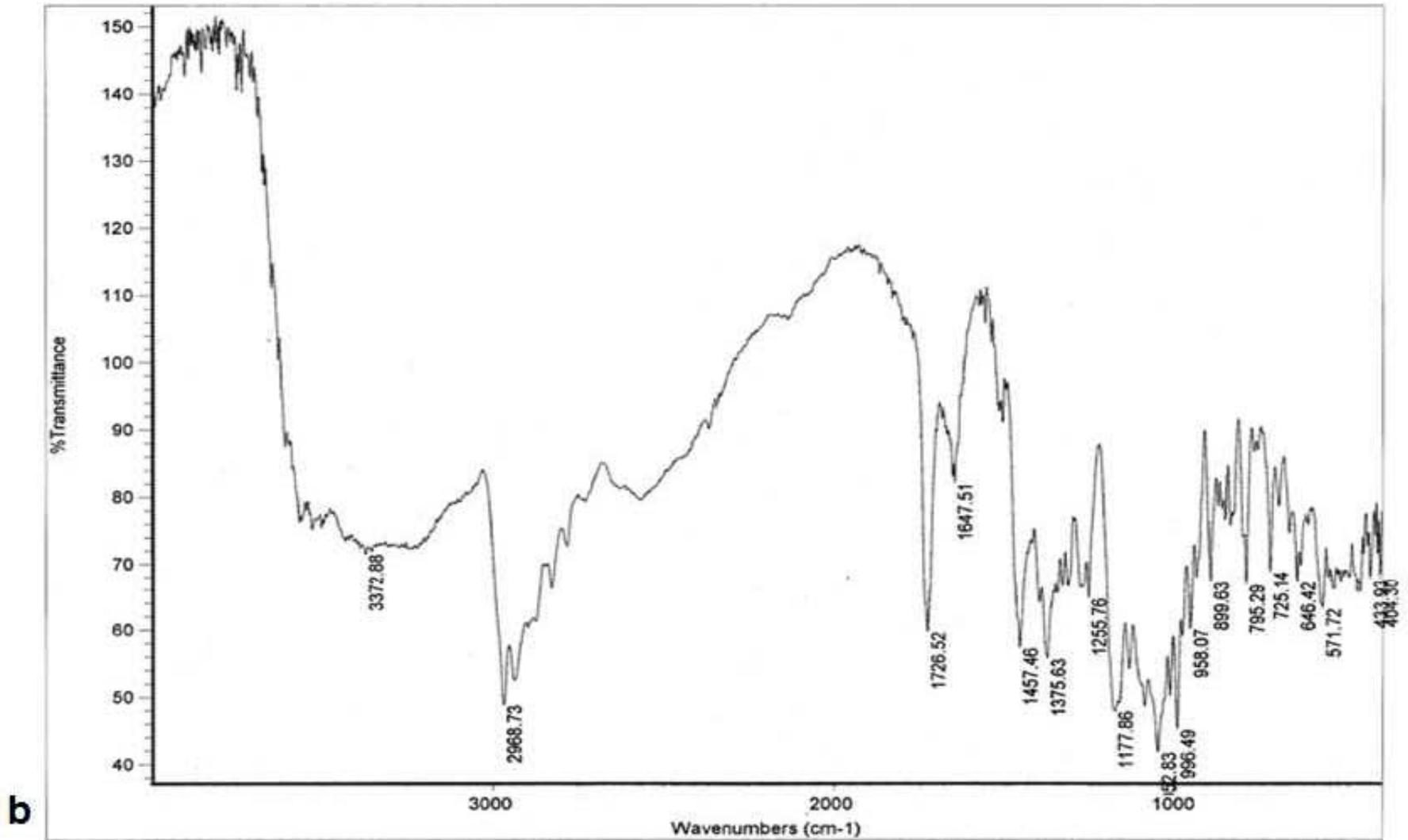


Figura 5.5 b) Espectro experimental de IR del polimorfo monohidrato

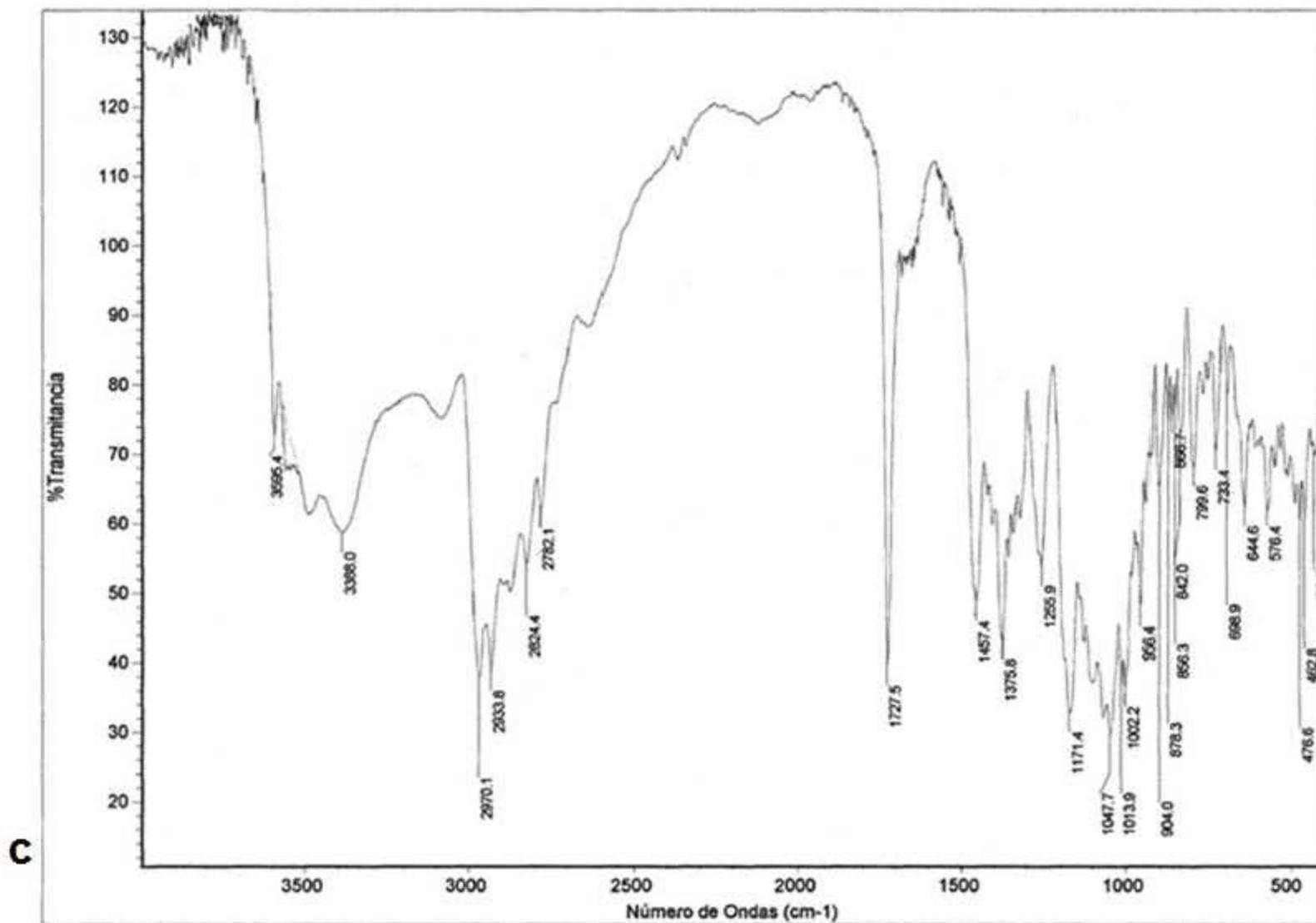


Figura 5.5 c) Espectro experimental de IR del polimorfo anhidro.

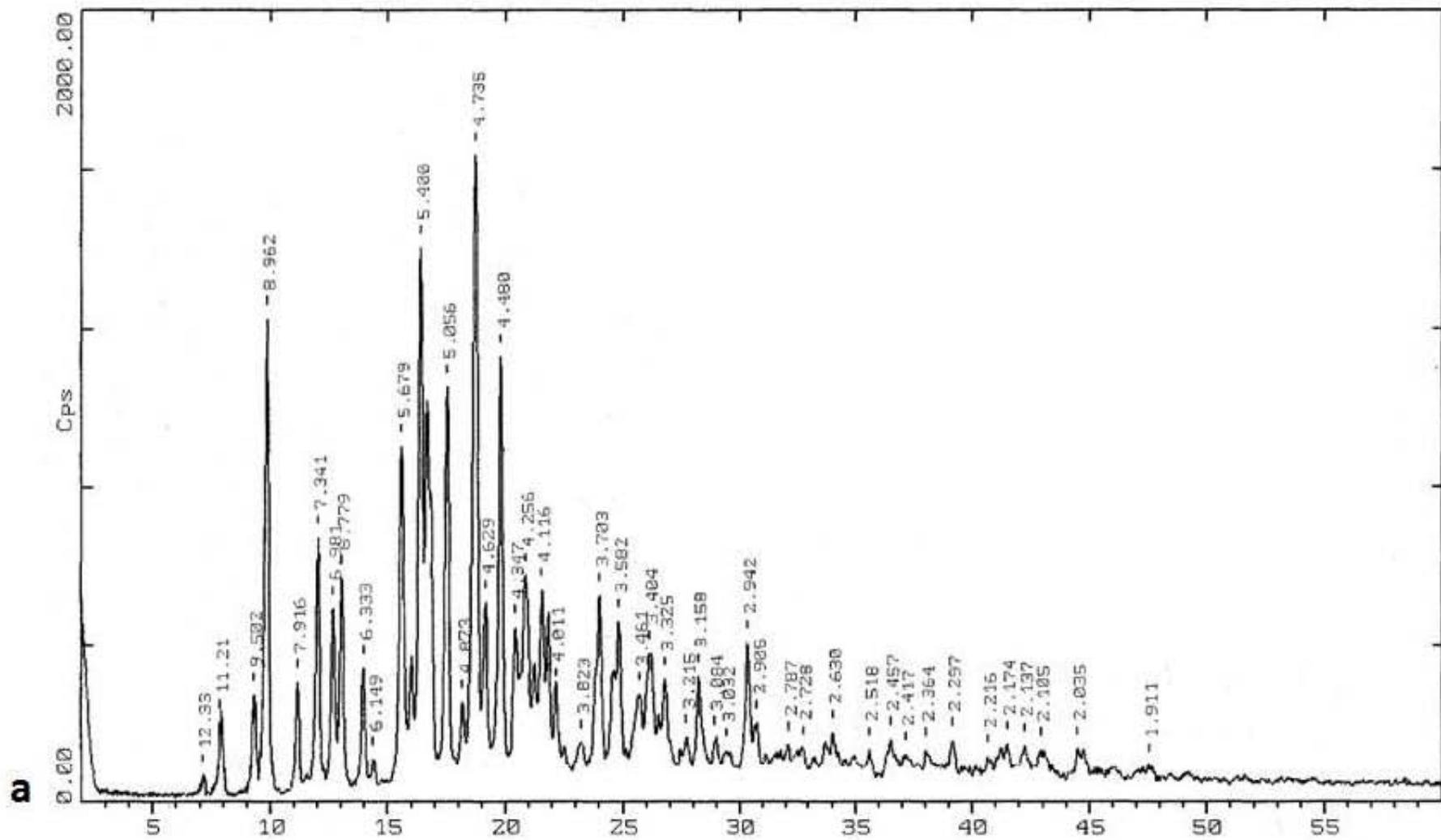


Figura 5.12 a) Difracción de Rayos X de polvo para el polimorfo dihidrato.

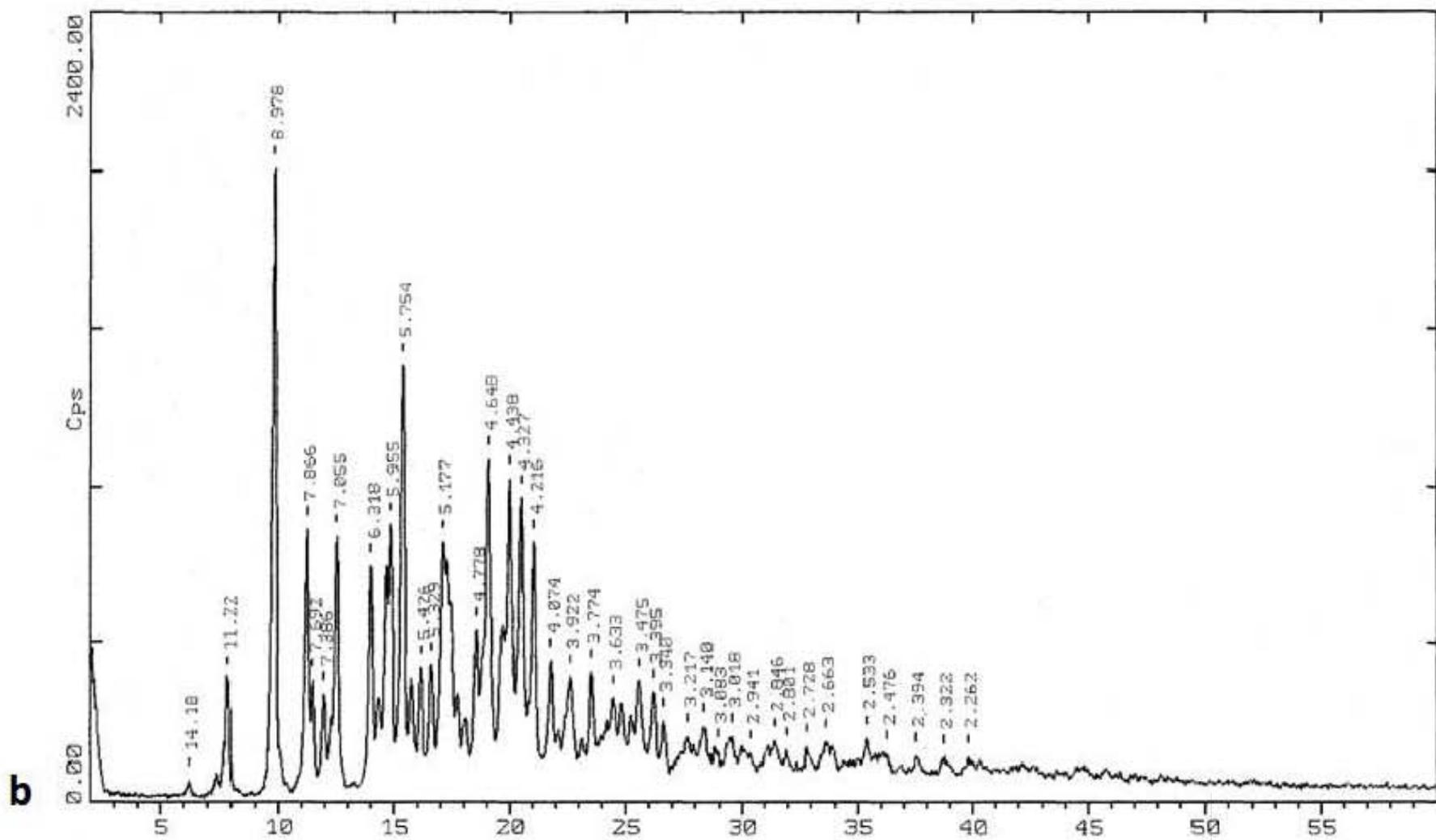


Figura 5.12 b) Difracción de Rayos X de polvo para el polimorfo monohidrato.

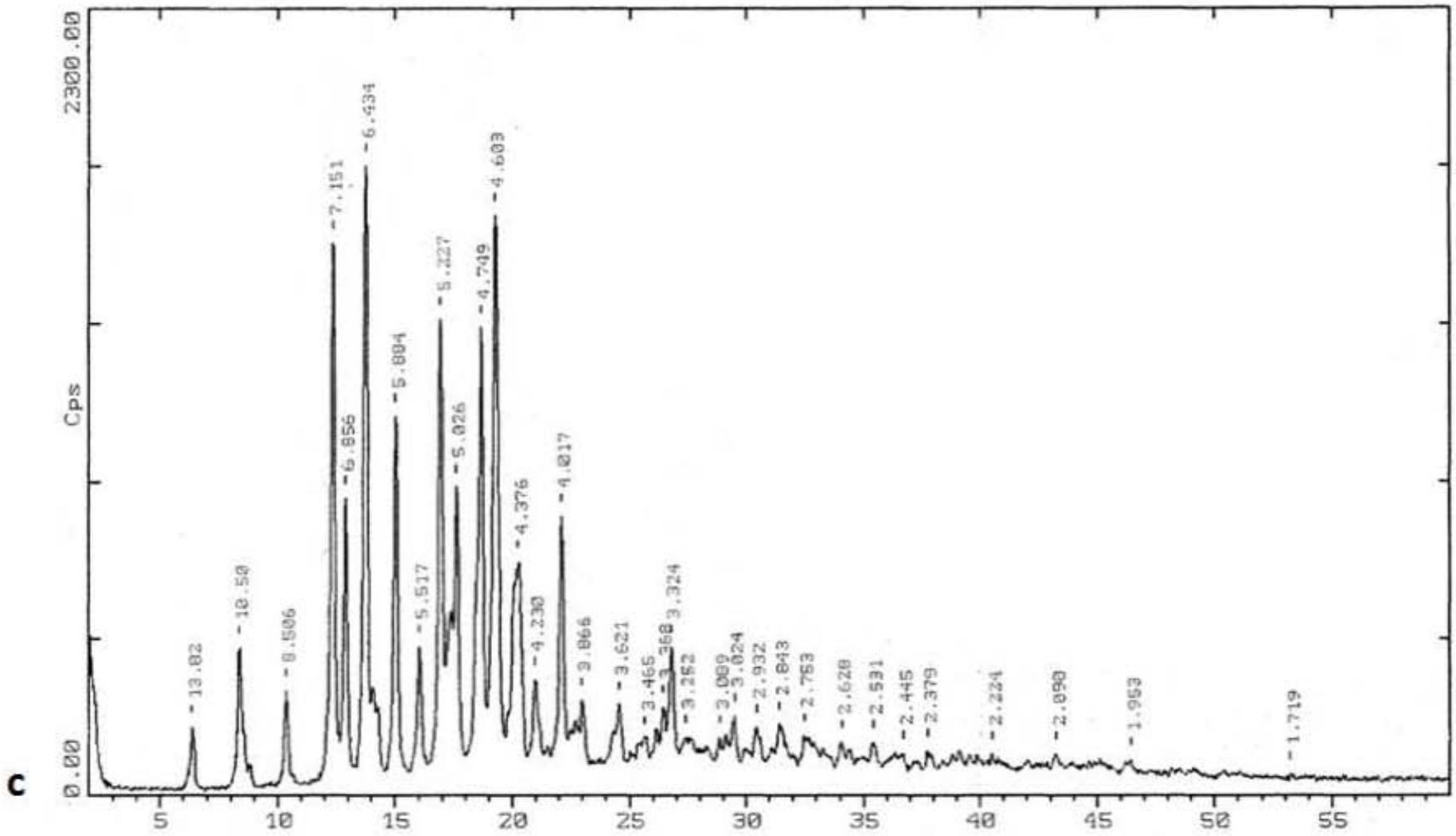
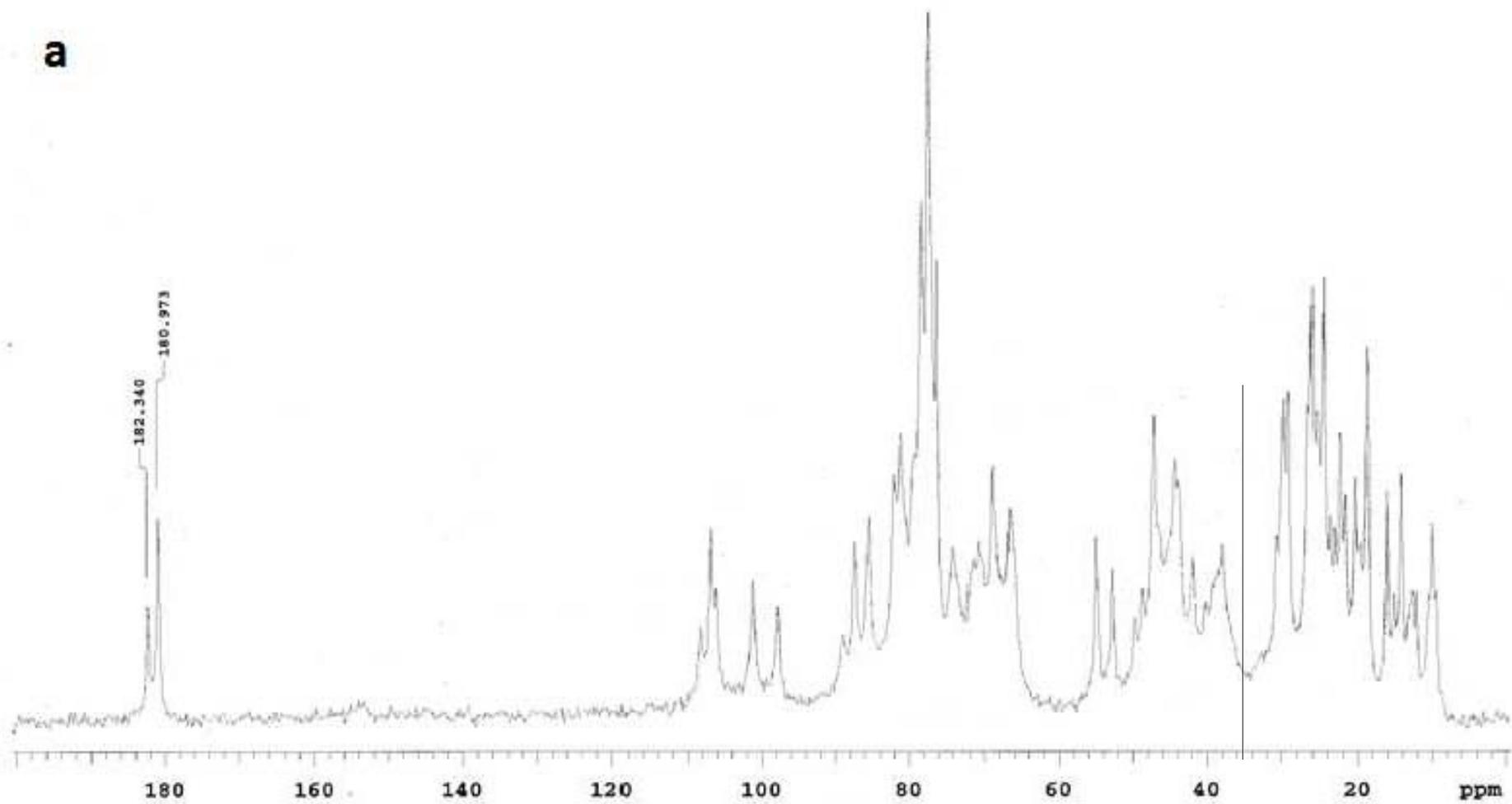
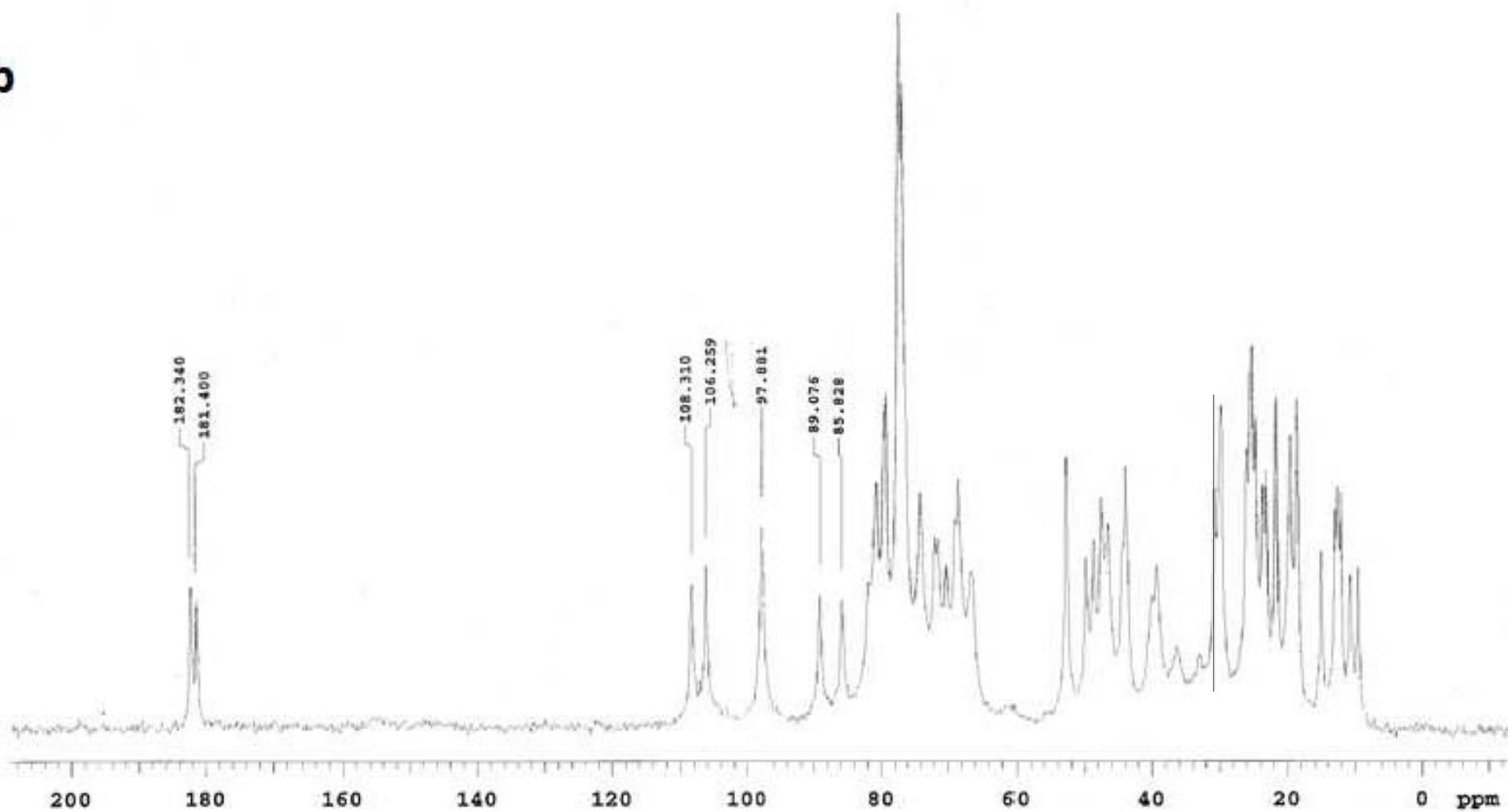


Figura 5.12 c) Difracción de Rayos X de polvo para el polimorfo anhidro.

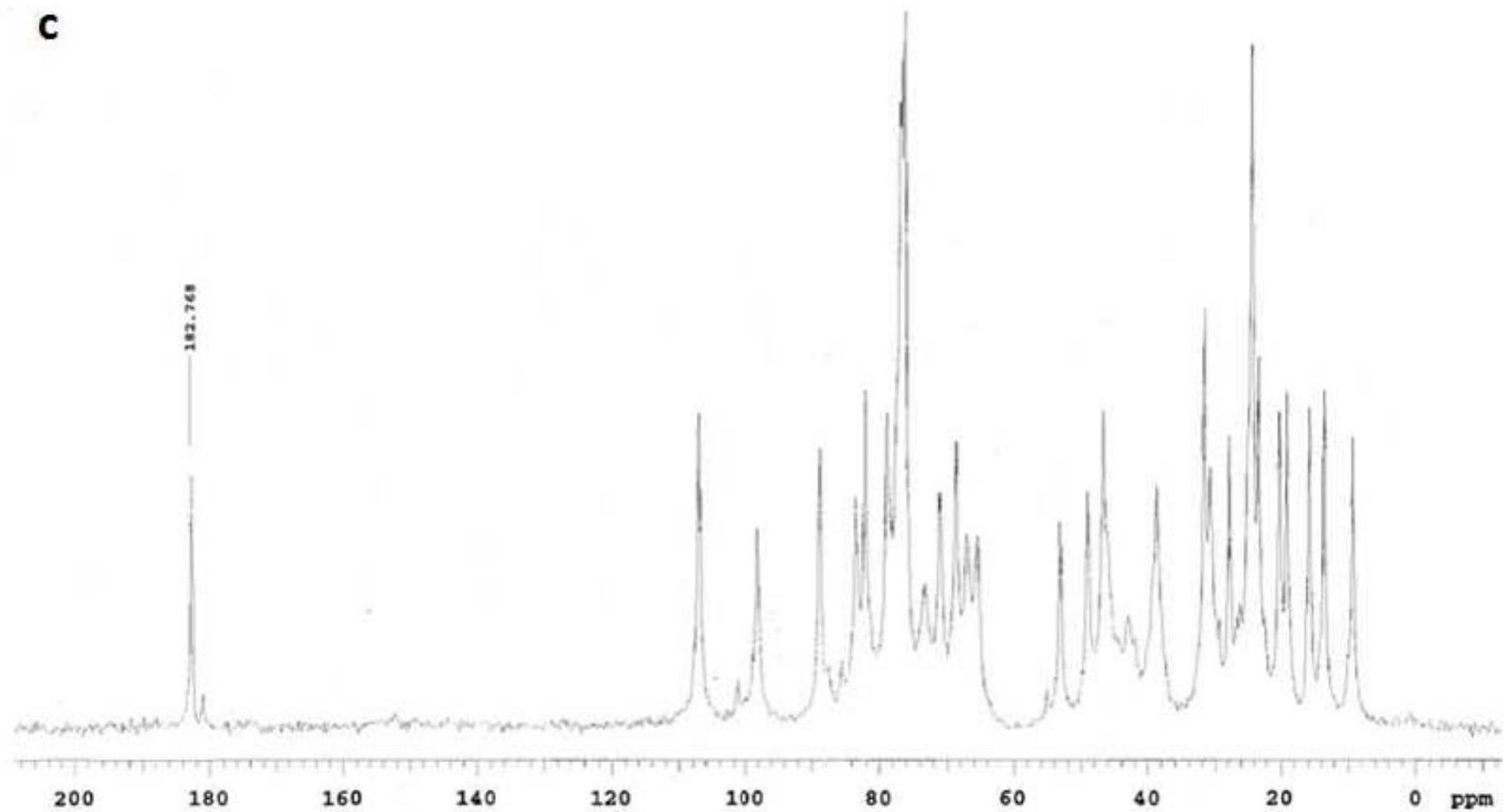


**Figura 5.13 a)** Espectro experimental de Resonancia Magnética Nuclear de sólido para el polimorfo dihidrato.

**b**



**Figura 5.13 b)** Espectro experimental de Resonancia Magnética Nuclear de sólido para el polimorfo monohidrato.



**Figura 5.13 c)** Espectro experimental de Resonancia Magnética Nuclear de sólido para el polimorfo anhidro.