

Pertenece a la Cátedra

# Tesis

Nº 408(5)

Nelson L Galotti

Año 1958



9 27238

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Biblioteca  
50 y 115 1º subsuelo  
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar  
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-27233

Nº 408(5)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

" HIDROGENACION CATALITICA DE CLOROTETRACICLINA "

TRABAJO DE TESIS

presentado por

NELSON LUIS GALOTTI

para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

De.....  
Fecha... 12/8/59  
Inv. N. .... Inv. N. 27238

AÑO 1958



A MIS PADRES

A MI ESPOSA



Agradezco a los Directores de los Laboratorios de Investigación de E. R. Squibb & Sons, Dres. Alfredo Sordelli y Venancio Deulofeu, por la oportunidad que me brindaron de realizar este trabajo en los citados Laboratorios y por la valiosa orientación que me suministraron en todo momento. Hago extensivo este agradecimiento a los Dres. Calzarini y Venzano y a todo el personal del Laboratorio, que en una u otra forma han contribuido a la buena marcha de los trabajos.

Deseo también dejar constancia de mi reconocimiento a los profesores Dr. García Díaz, primer director de tesis y Dr. Carlos Campi, actual director, quienes aportaron su reconocida capacidad y experiencia en el desarrollo del trabajo.

I.- I N T R O D U C C I O N



## BREVE HISTORIA DE LOS ANTIBIOTICOS

### 5.- PROPIEDADES QUIMICAS, FISICAS Y FARMACOLOGICAS DE LAS TETRACICLINAS.

Los antibióticos, descubiertos e introducidos en forma intensa en la medicina moderna, constituyen el arma más valiosa para la lucha contra un sinnúmero de enfermedades que habían resistido hasta el presente, en mayor o menor grado, la acción de las drogas de la quimioterapia.

La etimología de la palabra nos induce a un sentido inexacto de sus propiedades: anti - contra y bios - vida, cuando en realidad y según la definición de Waksman, (1) " un antibiótico es una sustancia química producida por microorganismos, la cual tiene la capacidad de inhibir el crecimiento, y aún de destruir bacterias y otros microorganismos en soluciones diluidas." Son todos de origen orgánico y resultantes de la actividad de hongos, bacterias, fermentos, etc., desarrollados en presencia de sustancias que favorecen la formación de los mismos y que constituyen los denominados medios de cultivo.

Aunque el término "antibiosis" fue aludido desde muy antiguo ( Varrón: año 40 A.C. ; Kircher: 1641 ; Leeuwenhoek: 1670 y Koch ), la llamada " Era de los Antibióticos " recién comienza entre los años 1929-1940, con los trabajos de Dubos, Chain, Florey y Waksman. Fue éste último el que lo introdujo y usó en el verdadero sentido moderno.

Sin embargo, cabe el gran honor de abrir el inmenso campo de los antibióticos, al sabio inglés Dr. Alexander Fleming en el año 1928, con el descubrimiento de la Penicilina. Sus trabajos despertaron en esa época poca atención, llegándose a aplicar por primera vez en la terapéutica en febrero de 1940, en el Hospital Radcliffe de la Universidad de Oxford; los Dres. H. Florey y E. Chain (2) trataron un enfermo atacado de septicemia ( *Staphylococcus aureus* ) con penicilina aislada por ellos en la mencionada Universidad.

El éxito obtenido en posteriores aplicaciones, alentó las investigaciones de innumerables científicos en la búsqueda de nuevos productos similares.

Es así que de tales trabajos y especialmente de los realizados en forma de "equipos", van apareciendo gran cantidad de antibióticos. La lista se engrosa continuamente día a día, aunque de todos ellos solamente un número limitado tiene amplio uso, estando los restantes en vías de experimentación. De aquéllos citaremos los siguientes: la penicilina, la estreptomina y dihidroestreptomina, la cloromicetina, la bacitracina, la neomicina, la eritromicina y el muy importante grupo de las tetraciclina, al cual se hará especial referencia en este trabajo.

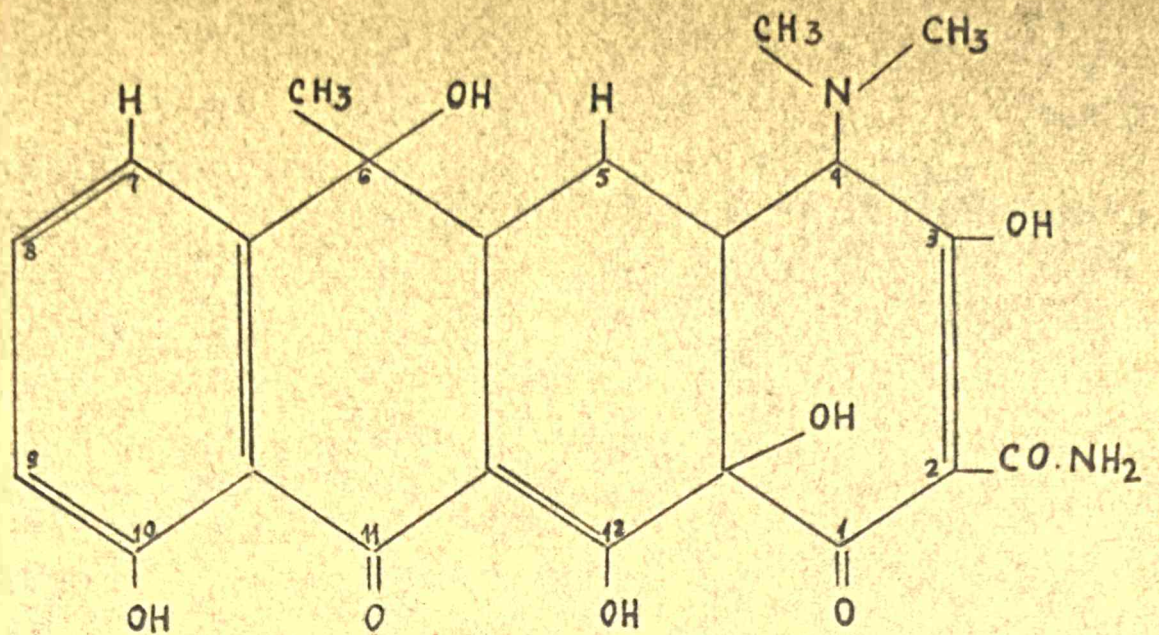
Esté constituido principalmente por tres antibióticos denominados de amplio espectro, caracterizados por tener propiedades químicas y terapéuticas parecidas debido a que poseen en común, el esqueleto del hidronaftaceno como base de su estructura química.(3) Son ellos: la clorotetraciclina, la oxitetraciclina y la tetraciclina.

La primera fue aislada de una muestra de suelo de Missouri en el año 1948, por Duggar de los Laboratorios Lederle (4); es producida por un *Streptomyces aureofaciens*. La oxitetraciclina fue anunciada en 1950 por investigadores de los Laboratorios de Charles Pfizer, quienes la obtuvieron de cultivos de *Streptomyces rimosus*. Por último, la tetraciclina fue descubierta inicialmente en los Laboratorios Lederle como producto de la hidrogenación deshalogenante de la clorotetraciclina. Más tarde fue aislada de una muestra de suelo de Texas, también proveniente de la actividad de un *Streptomyces*, por la Hayden Chemical Corporation.

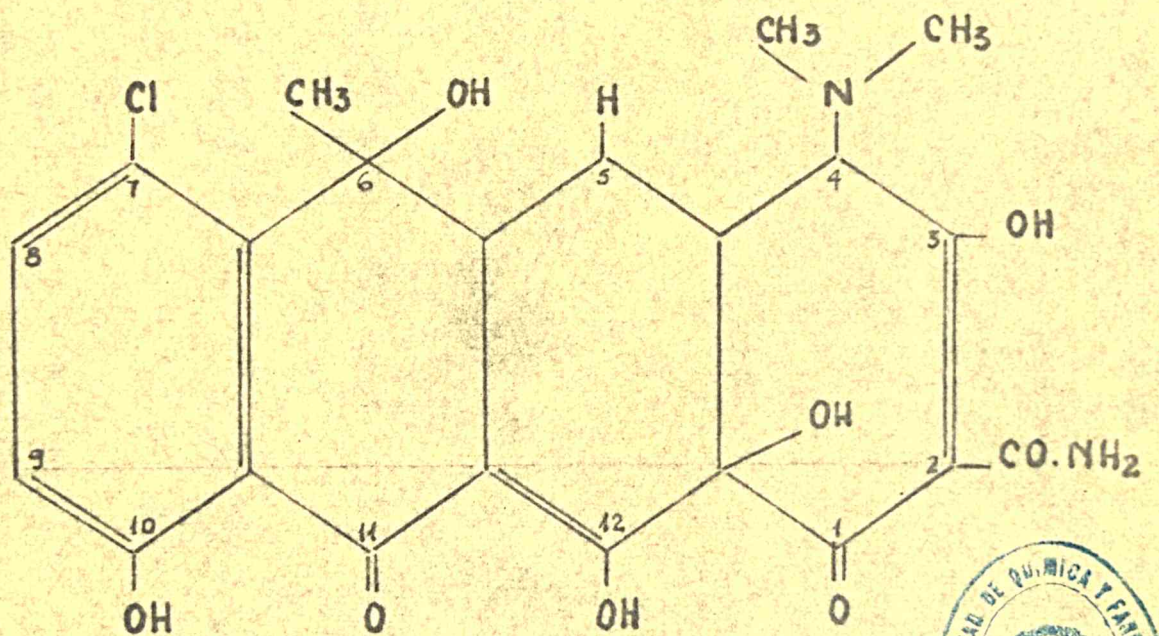
Tal como la nomenclatura química lo indica, la diferencia fundamental entre estos compuestos, radica en que la clorotetraciclina posee un átomo de cloro unido al anillo aromático, y la oxitetraciclina un radical oxidrilo; la tetraciclina posee hidrógenos en esas posiciones.

La fórmula básica actualmente aceptada para el grupo es :  
4-dimetilamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-5,6,10,12,12a-pentahidroxi-6-metil-1-11-dioxo-2-naftaceno carboxamida (5). Las posiciones 6 y 7 son las que contienen los elementos químicos citados y que diferencian a estos tres antibióticos.

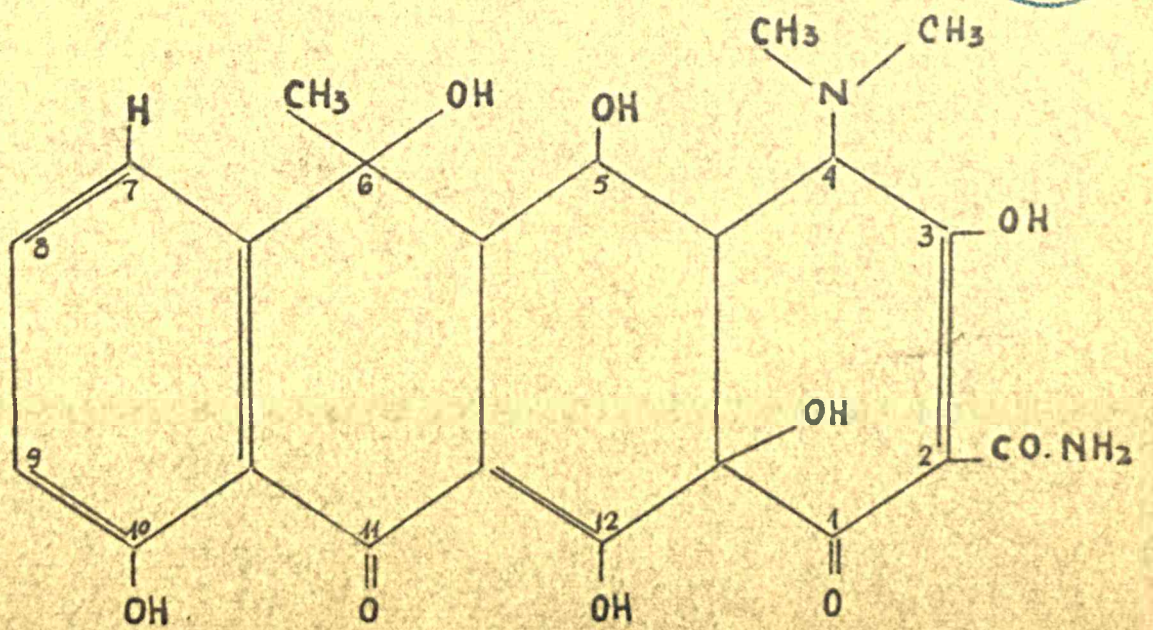
Los espectros de absorción en el infrarrojo y en el ultravioleta muestran las diferencias resultantes de la estructura de los tres antibióticos por la presencia de los átomos de H, Cl y del radical OH.



TETRACICLINA



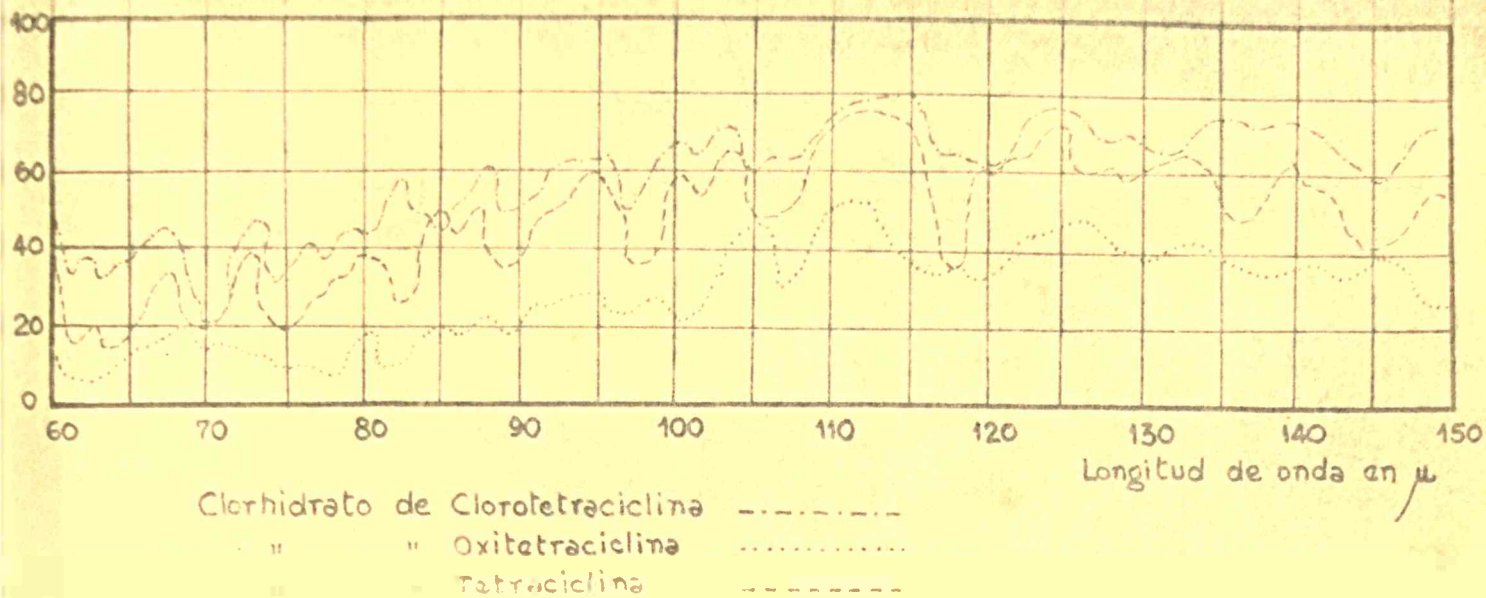
CLOROTETRACICLINA



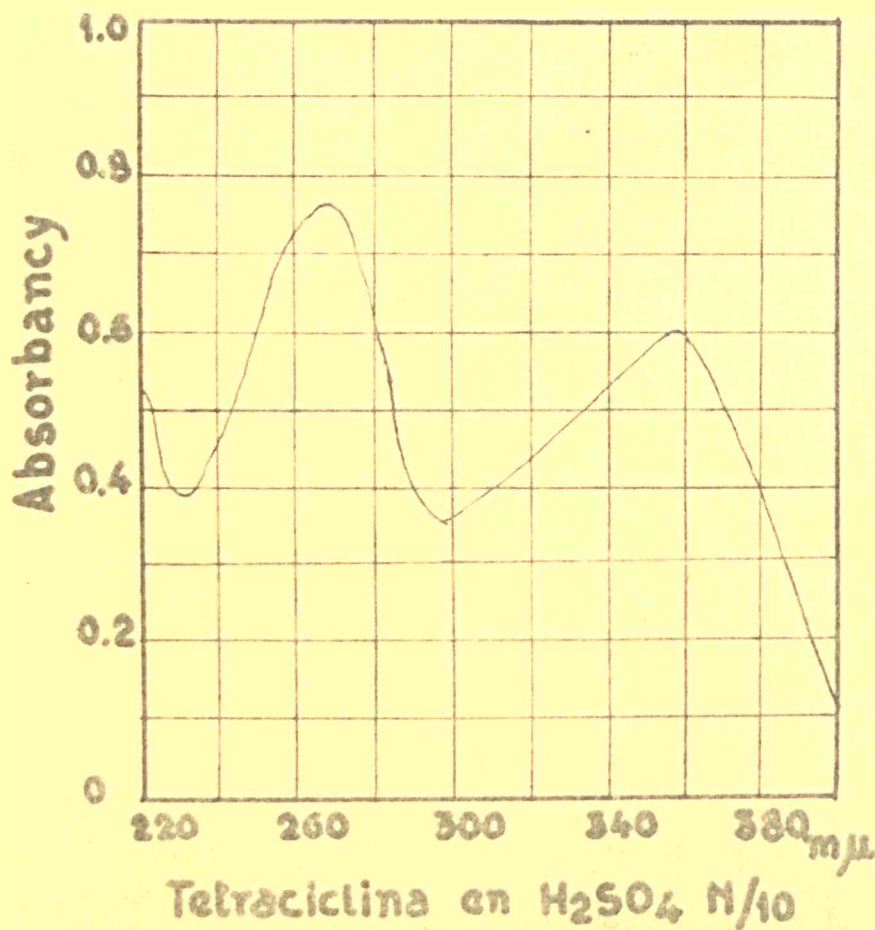
OXITETRACICLINA



### ESPECTRO ABSORCION INFRARROJO



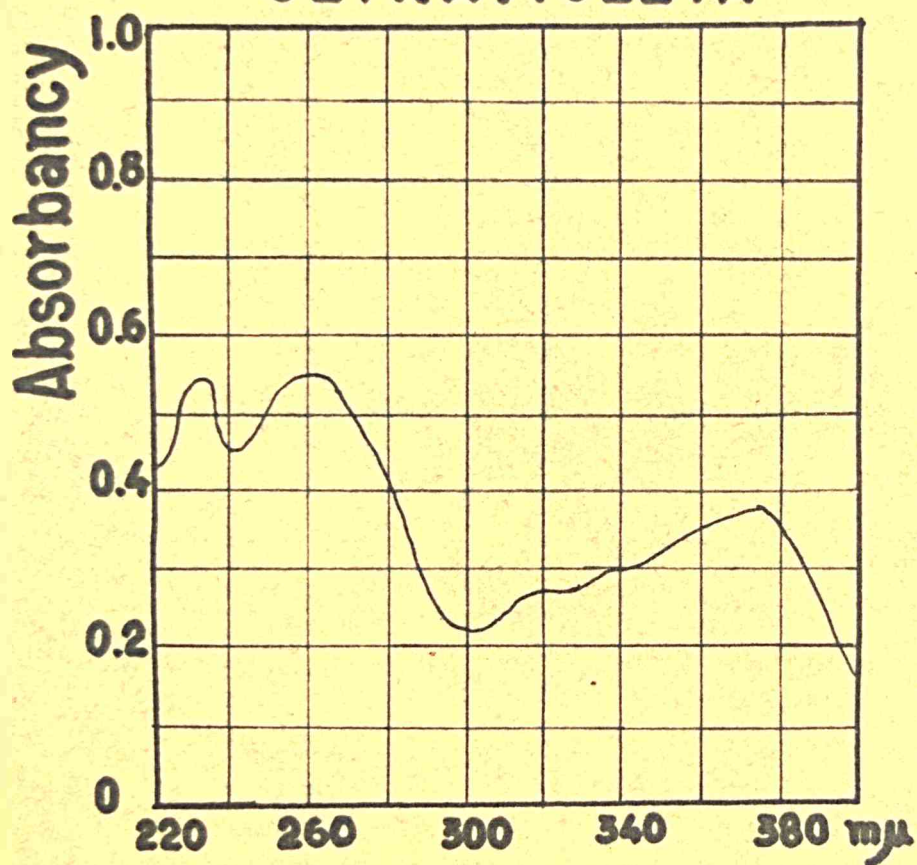
### ESPECTRO ABSORCION ULTRAVIOLETA



Tetraciclina en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N/10



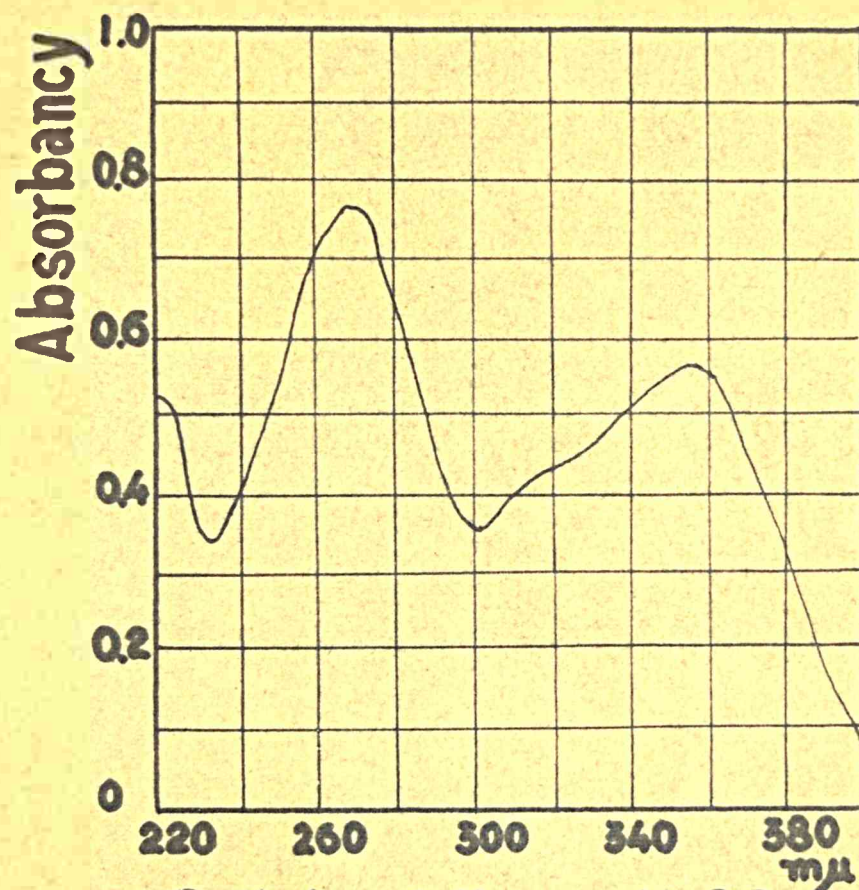
## ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA



Clorotetraciclina en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> n/10



*ESPECTRO de ABSORCION  
ULTRAVIOLETA*



Oxitetraciclina en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1/10



Esta diferencia es menos notable en el infrarrojo, como puede observarse en las figuras correspondientes.(6)

### PODER ROTATORIO ESPECIFICO (11)

El poder rotatorio específico de las tetraciclinas, consideradas en los estados de base libre, o salificadas como clorhidratos, es el siguiente:

#### CLOROTETRACICLINA

Base libre  $(\alpha)_D^{23} = - 274^{\circ}9$  ( solución metanólica )

Clorhidrato  $(\alpha)_D^{23} = - 240^{\circ}5$  ( solución 0,5%-agua )

#### OXITETRACICLINA

Base libre  $(\alpha)_D^{25} = + 26^{\circ}5$  ( solución 1% metanol )

Clorhidrato  $(\alpha)_D^{25} = - 196^{\circ}6$  ( solución 1% HCl 0,1 N )

#### TETRACICLINA

Base libre  $(\alpha)_D^{29} = - 284^{\circ}0$  ( solución 0,8% metanol )

Clorhidrato  $(\alpha)_D^{29} = - 288^{\circ}0$  ( solución 0,65% agua )

### CRISTALOGRAFIA (12)

La clorotetraciclina se presenta en forma de cristales aciculares muy pequeños; el índice de refracción es : 1,674 - 1,694.

La oxitetraciclina cristaliza como dihidrato, con cristales biaxiales negativos con extinción paralela y de índices de refracción iguales a :

$$\alpha = 1,634 \pm 0,005 \quad \beta = 1,646 \pm 0,004 \quad \gamma = 1,70$$

El dihidrato pierde su agua de cristalización, cuando se lo calienta a 100°C y al vacío.

Los cristales de la tetraciclina base pertenecen al sistema rómbico y poseen los siguientes índices de refracción:

$$\alpha = 1,572 \pm 0,005 \quad \beta = 1,646 \pm 0,005 \quad \gamma = 1,750$$

### PESO MOLECULAR (13)

Clorotetraciclina = 480 g

Oxitetraciclina (por rayos x) = 462 ± 5

Tetraciclina = 444 calculado

Esta tiene : C = 59,45 % ; H<sub>2</sub> = 5,44 % ; N = 6,51 %

### PUNTO DE FUSION (14)

Clorotetraciclina : base = 168° - 169°C

clorhidrato = 210°C con descomposición

Oxitetraciclina : 184° 5 - 185° 5 con descomposición

Tetraciclina : base : ablande a 165° - 170° y funde 170° - 75°

con descomposición

clorhidrato : funde con gases y descomposición a 214°C

### ESTABILIDADES

Es aquí donde se ponen de manifiesto más marcadamente las diferencias químicas de la constitución de estos antibióticos de amplio espectro (7).

Una solución de clorotetraciclina en agua o solución salina, a pH ligeramente ácido y en plasma citratado, incubado a 37°C comienza a perder actividad a las 6 - 8 horas y más rápidamente después de las 18 horas; la descomposición de la oxitetraciclina es mucho menor y la de la tetraciclina supera a las anteriores en un período de 48 horas a 37°C.

A baja temperatura ( a - 25°C ) las soluciones de las mismas conservan su actividad durante 6 semanas; lo mismo sucede con un plasma sanguíneo bajo tratamiento con estos antibióticos y en las mismas condiciones de conservación. A 5°C la clorotetraciclina tiene apreciable disminución de actividad entre 24 a 48 hs, oxitetraciclina moderada descomposición al final de la primera semana y la tetraciclina permanece inalterada en 3 semanas.

## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ESTABILIDAD

La actividad comparativa de las tetraciclinas in vitro se ha estudiado en distintos medios: agar inclinado, agar profundo, turbidimetría en caldos, etc. En ellos muestran acciones similares, aunque la estabilidad, y por lo tanto, la prolongación del tiempo de actividad acusa diferencias más o menos notables. Cuando el tiempo de incubación es relativamente corto, la clorotetraciclina es generalmente más activa que las otras (15) dos; al extender el período se vuelve relativamente menos activa. El estudio de la turbidimetría permite investigar la estabilidad de los 8 antibióticos. En las figuras se muestran las actividades remanentes después de incubar una solución de 1mg/ml en fosfato buferizado a 37°C. (fig. 3 y 4). (16)

Después de 10 horas a pH 8, la actividad residual porcentual era de 8 para clorotetraciclina, 75 para oxitetraciclina y 64 para tetraciclina; a pH 7 35, 66 y 98 % respectivamente. Como se ve, una variación de una unidad de pH produce un efecto notable en la estabilidad.

La actividad de las tetraciclinas se mide haciéndolas actuar sobre el *Staphylococcus aureus* y se expresa en unidades de antibiótico por  $\mu$ g de material inicial. (17)

La unidad se define como la cantidad de material en  $\mu$ g/ml necesarios para causar la mitad de máxima inhibición después de 3 horas de incubación. Bajo estas condiciones la clorotetraciclina tiene 4 a 5 veces la actividad de la oxitetraciclina o tetraciclina.

En las figuras 1 y 2 se muestra el alto grado de destrucción cuando los antibióticos se incuban a 37°C en soluciones neutras o ligeramente alcalinas. Dado que la destrucción de la clorotetraciclina es mucho más rápida, su actividad biológica inicial es mucho mayor en las 12 horas primeras.

Al estudiar el comportamiento a temperatura elevada, se nota una marcada diferencia entre la oxitetraciclina y la tetraciclina. Calentando a 100° durante 15' en soluciones a distintos pH hay una gran destrucción de la oxitetraciclina y clorotetraciclina, la que es ~~menos~~ <sup>menos</sup> notable a pH ácido que a pH neutro o alcalino.

pH	% ACTIVIDAD REMANENTE		
	Clorot.	Oxit.	Tetra.
2.5	36	57	55
7.0	2	7	45
9.0	2	14	37

Estabilidades al calor ( 100°C - 15' ) (18)

Concentración = 10 µg/ml

Testigo : Bacillus cereus en agar pH 6.0

ESTABILIDAD DE LAS TETRACICLINAS

ESTABILIDAD EN BUFFER FOSFATO A pH 8.0 y 37° C. TEMP.

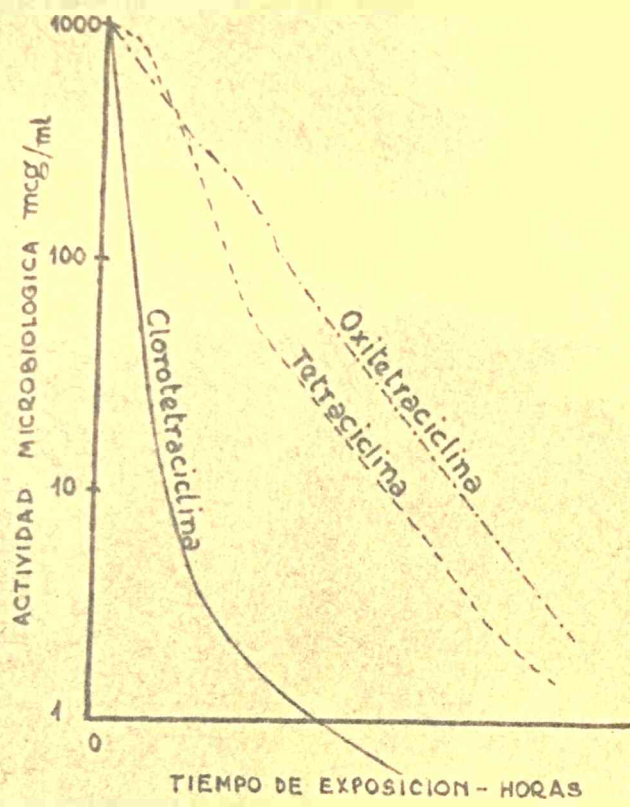


Fig. 1

ESTABILIDAD EN BUFFER FOSFATO A pH 7.0 y 37° C. TEMP.

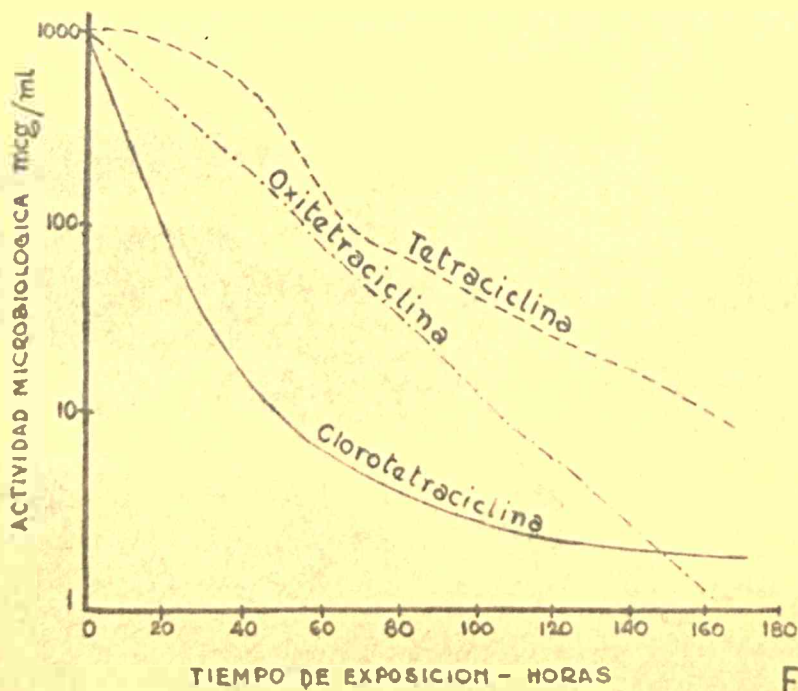


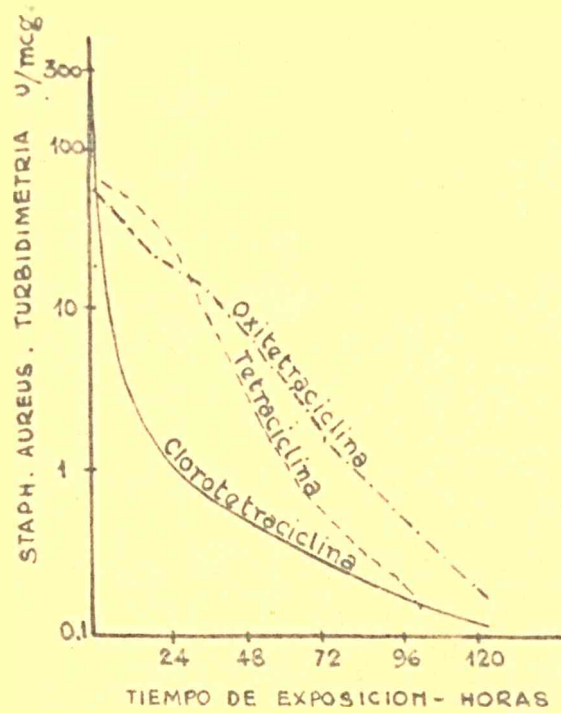
Fig. 2



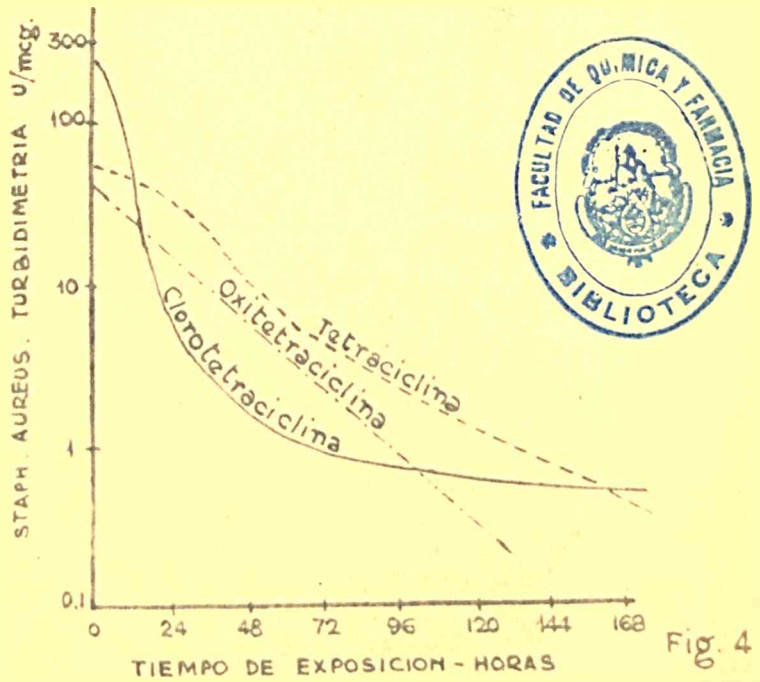


ACTIVIDADES DE LAS TETRACICLINAS

ACTIVIDADES EN BUFFER FOSFATO A pH 8.0 y 37°C TEMP.



ACTIVIDADES EN BUFFER FOSFATO A pH 7.0 y 37°C TEMP.



IDENTIFICACION Y SEPARACION DE LOS ANTIBIOTICOS

ANALISIS CON PAPEL CROMATOGRAFICO (19)

Las tetraciclinas pueden ser determinadas cuantitativamente por papel cromatográfico.

Los papeles se embeben en buffer fosfato de concentración y pH determinado y se secan. Luego se humedecen con soluciones muy diluidas de los antibióticos y evapora el solvente. Se colocan sobre platos agar sembrados con *Bacillus cereus*; se retiran después de varios minutos y se incuban a 37° durante 12 horas. Luego se determinan y fotografian las zonas de inhibición.

REACCIONES DE COLOR (20)

Otras reacciones de diferenciación de los antibióticos de amplio espectro se basan en ensayos de coloración con reactivos químicos. Reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído en HCl diluido):

La oxitetraciclina da un precipitado verde azulado después de 8 horas; con el sobrenadante verde azulado la clorotetraciclina da una solución amarillo canario y la tetraciclina solución amarillo naranja. La presencia de Cl no inhibe el desarrollo de color con oxitetraciclina, pero sí la de la tetraciclina.

La tetraciclina puede diferenciarse de la oxitetraciclina y clorotetraciclina por medio de  $H_2SO_4$ ; da color violeta estable, mientras que la oxitetraciclina da rojo cereza estable y la clorotetraciclina, púrpura, pasando en pocos segundos a negro verdoso.

DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE (21)

Los estudios con el distribuidor Craig en contracorriente permiten distinguir y separar las 3 tetraciclinas. Usando un distribuidor Craig de 49 platos a temperatura ambiente usando el sistema n-butanol al 2,5 % en ácido acético acuoso, la máxima concentración del antibiótico tetraciclina se encuentra en el tubo 18, de la oxitetraciclina en el 16 y de la clorotetraciclina en el 26. (22)

PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

Las propiedades antibacterianas de las 5 tetraciclinas son análogas. La diferencia más notable entre ellas radica en una mayor estabilidad de la tetraciclina con más altos niveles sanguíneos. También presenta menores trastornos gastrointestinales que las otras dos.

El espectro antibacteriano comparativo de las tetraciclinas se indica en la tabla siguiente, (8); las cifras indican las cantidades relativas en  $\mu\text{g/ml}$  de antibiótico requeridas para inhibir un cierto número de microorganismos; el método empleado es el de Waksman y Beilly y los compuestos usados son: clorhidrato de clorotetraciclina, de oxitetraciclina y trihidrato de tetraciclina. (23)

ESPECIES	Clorotetra. HCl	Tetra. trihidr.	Oxitetra. HCl
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.292	0.29	0.58
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.29	0.24	0.24
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.29	0.78	1.95
<i>Bacillus subtilis</i>	0.195	0.29	0.29
<i>Escherichia coli</i>	1.45	1.17	1.17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.29	0.58	0.58
<i>Neisseria catarrhalis</i>	0.098	0.098	0.098
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1.17	2.34	1.56
<i>Proteus vulgaris</i>	4.6	5.9	5.12
<i>Salmonella typhosa</i>	1.17	2.34	1.56
<i>Shigella dysenteriae</i>	5.12	5.12	6.25
<i>Brucella bronchiseptica</i>	0.292	0.78	1.17
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0.147	0.195	0.25
<i>Candida albicans</i>	> 100	> 100	> 100
<i>Clostridium butyricum</i>	0.078	0.312	1.25

La toxicidad de las tetraciclinas por vía parenteral, oral o endovenosa en animales de laboratorio (ratas, cobayos, conejos y perros) se muestra semejante. Las estadísticas clínicas de la aplicación en seres humanos han demostrado que la tetraciclina es mejor tolerada oralmente que la clorotetraciclina y la oxitetraciclina. (24)

La estabilidad en el plasma sanguíneo de personas que recibieron 1g de cada una de las tetraciclinas fue la siguiente: con clorotetraciclina hubo disminución del poder antibacteriano después de las 24 hs, desapareciendo completamente a las 40 hs; la concentración de la oxitetraciclina disminuyó algo después de iguales períodos de incubación y la tetraciclina no experimentó alteración alguna.

Los efectos secundarios tóxicos de la tetraciclina sólo se limitan a síntomas gastrointestinales, aunque son menos frecuentes y menos notables que los provocados por clorotetraciclina y oxitetraciclina.

#### PREPARACION Y MANUFACTURA

Los métodos actuales de producción de tetraciclina son 2: A) por fermentación y B) por hidrogenación de la clorotetraciclina. El objeto del presente trabajo es el de estudiar este segundo método de hidrogenólisis buscando condiciones y materiales convenientes para su realización.

A) El método de producción por fermentación parte de caldos de cultivos de *Streptomyces aureofaciens* (9) en distintas condiciones de proceso. Se efectúa en tanques profundos por cultivos sumergidos, con agitación, aereación, etc. El medio se esteriliza con vapor y la fermentación se desarrolla bajo condiciones estériles.

Debido a la semejanza de la estructura química entre las tetraciclinas y al hecho de que, en los caldos de fermentación de clorotetraciclina aparecen siempre cantidades variables de tetraciclina, se han investigado detenidamente las causas que influyen en esos procesos. Así se ha encontrado que es posible obtener en la fermentación de clorotetraciclina cantidades crecientes y regulables de tetraciclina, variando la concentración de los cloruros del medio de cultivo. (10)

Se parte de una cepa de *Streptomyces aureofaciens*, la que se

siembra en un medio de cultivo para efectuar una primera germinación a 28° durante 48 horas, con agitación. De allí se transfiere a otro medio para una segunda germinación (1-1.5% v/v) y de éste se pasa directamente a la fermentación principal, después de un período semejante al primero.

El medio a fermentar tiene la siguiente composición:

Extracto de cereales	14 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	8 g
$\text{Ca CO}_3$	9 g
Glucosa	50 g

Esto es para un volumen de 1000 cc de agua destilada.

El precultivo se siembra en una relación del 4% del volumen total.

El proceso se desarrolla a 28°C, con agitación y con inyección de aire. El pH inicial es de 6.2 - 6.3.

El control se realiza por determinación de la glucosa que se va consumiendo gradualmente hasta su totalidad, lo que ocurre entre las horas 60 a 72. A partir de este momento el pH aumenta hasta llegar al final a 6.8 - 7.2.

Al mismo tiempo, va aumentando la cantidad de antibiótico, hasta niveles máximos; en este momento, alrededor de la hora 96, se da por finalizada la fermentación.

Se acidifica el caldo a pH 1.5 para solubilizar la tetraciclina y se filtra para separar el micelio. El filtrado se extrae con butanol anhidro hasta agotar; este extracto butanólico se concentra al vacío, se elimina el calcio con ácido oxálico y se cristaliza el antibiótico, según procedimientos indicados más adelante.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Sokoloff, Boris : The story of penicillin, p. 23
- 2.- Sokoloff, Boris : The story of penicillin, p. 15
- 3.- Boothe, J.H. et al : Tetracycline, J. amer. chem. soc. 75 : 4621, 1953.  
Conover, L.H. et al : Terramycin, XI, Tetracycline, J. amer. chem. soc. 75 : 4622-25, 1953.
- 4.- Kirk - Othmer : Encyclopedia of Chemical Technology - vol. 12, p. 772 y sig.
- 5.- Boothe, J.H. et al : Chemistry of tetracycline, Antibiotics Annual 1953/54, p. 46 - 48.
- 6.- Minieri, P. Faul et al : A new broad spectrum antibiotic product of the tetracycline group, Antibiotics annual 1953/54, p. 81 - 87.
- 7.- Wright, Samuel S. et al : Clinical and laboratory observations on tetracycline, Antibiotics Annual 1953/54, p. 92 - 97.
- 8.- Cunningham, Raymond W. et al : Pharmacology of tetracycline, Antibiotics Annual 1953/54, pág. 84
- 9.- Kirk - Othmer : Encyclopedia of Chemical Technology - vol. 12 - p. 772.
- 10.- Rolland, G. et al : Sulla produzione diretta di tetraciclina per fermentazione, Il Farmaco (ed. sc.) 10 : 37 - 46, 1955.
- 11.- cita N° 6, p. 82.
- 12.- cita N° 6, p. 82.
- 13.- cita N° 6, p. 82.
- 14.- cita N° 6, p. 82.
- 15.- Bohonos, Dornbusch, Feldman, Martin, Fehrak y Williams: In vitro studies with Chlortetracycline and tetracyclina, p. 51.
- 16.- cita N° 15, p. 52.
- 17.- cita N° 15, p. 53.
- 18.- cita N° 15, p. 54.
- 19.- cita N° 15, p. 54.
- 20.- cita N° 6, p. 82.
- 21.- cita N° 6, p. 82.
- 22.- Weisiger, J.R.: Countercurrent distribution, Organic Analysis, vol.2, p. 277 y sig.
- 23.- Maksman and Reilly, : Industrial Engin. Chem. Analysis, Ed.17, p. 556-58, 1945.
- 24.- cita N° 6, p. 87.

T R A B A J O S

E X P E R I M E N T A L E S

## A.- OBTENCIÓN DE CLOROTETRACICLINA

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

La materia inicial del proceso es la clorotetraciclina la que fue obtenida experimentalmente, aislada y purificada.

#### FERMENTACION

La preparación de la misma abarca la fermentación, a partir de caldos de cultivos, de una cepa de *Streptomyces Aureofaciens* (1). Estos medios de cultivo son de composición variada y pueden ser naturales, semisintéticos y sintéticos. Cuentan con materias ricas en C : Sacarosa, almidón, dextrinas, maltosa, lactosa, etc; fuentes de  $N_2$ : peptonas, caseína, aminoácidos, macedado de maiz, extracto de carne, melazas, urea, etc.; elementos inorgánicos: P, K, Ca, Mg, Cl,  $S^{=}$  y otros elementos indispensables en cantidades ínfimas.

El medio es previamente esterilizado para evitar el desarrollo de fermentaciones secundarias perjudiciales. Previamente se efectua un cultivo del *Streptomyces aureofaciens* sobre agar inclinado y de allí se va transfiriendo a frascos con medio nutritivo y de la capacidad correspondiente al aumento del volumen del micelio y esporas del cultivo, hasta llegar a una etapa de fermentación previa de 1 a 2 días a  $26^{\circ}$  (2). Luego se transfiere al fermentador donde se mantiene a  $27^{\circ}$  C mas de 50 horas, con agitación y aereación continua; se inyectan antiespumígenos ( aceite de lardo ) y se mantiene algo de sobrepresión para evitar contaminaciones; el pH se mantiene entre 6.0 a 7.0.

Se efectuan controles periódicos del desarrollo del proceso por medio de la determinación del contenido del antibiótico en el caldo hasta que alcance y se mantenga en el rango más alto de potencia biológica; momento en el cual se da por terminada la fermentación; se inicia aquí la etapa de la extracción y purificación de la clorotetraciclina, la que abarca varios métodos distintos; de ellos desarrollaremos el practicado en la oportunidad y que comprende los siguientes pasos (3) :

#### 1<sup>o</sup> FILTRACION

Se colocan unos 20 litros de caldo cosechado en un recipiente adecuado con agitador de paletas; agitando continuamente se ajusta el pH entre 1.8 - 2.1 con ácido sulfúrico al 40%, lentamente, hasta que se mantenga esta acidez constante durante 20 minutos.



Luego se filtra este caldo acidificado y con el agregado de un 6% de ayuda filtrante de tierra de infusorios (Celite) por un Buchner con papel y capa de 1cm del mismo ayuda filtrante. (Volumen de caldo = 18 litros.)

La torta de micelio-celite queda impregnada de caldo con antibiótico, por lo que se lava 3 - 4 veces con 800ml cada vez de agua acidulada con ácido sulfúrico a pH : 2,0 reuniéndose estos lavados con el primer filtrado. Se obtiene un volumen que contiene un 90% de la actividad inicial.

## 2. EXTRACCION

Al caldo filtrado se le agregan, agitando continuamente, un 50% de su volumen, de butanol anhidro; de inmediato se lleva a pH : 7,5 con OHNa al 40% y se mantiene la agitación durante 20 minutos más. Luego se deja reposar 1 hora, observándose la separación en 2 capas: una superior butanólica con antibiótico disuelto y una inferior de caldo extraído; entre ambas aparece una interfase emulsionada. Las 2 fases se separan en una ampolla de decantación y la interfase se centrifuga, agregándose el solvente al extracto butanólico, y el caldo, al anterior.

El caldo extraído conserva aún antibiótico, por lo que se somete a una nueva extracción con un 10%  $\frac{v}{v}$  de butanol y en las mismas condiciones anteriores de contacto y agitación.

También se decantan las capas en ampollas y se centrifuga la interfase, agregándose los extractos butanólicos al primero y desechando luego el caldo casi completamente libre de actividad. Del conjunto de los extractos butanólicos se saca una muestra alícuota y se determina la actividad para calcular el rendimiento y la próxima etapa de concentración. (Vol. butanol rico = 6,150 l.)

## 3. CONCENTRACION

El butanol rico se lleva a pH 2.5 mediante el agregado de HCl 10N y luego se concentra en un evaporador al vacío tipo "Flash", con una reducción de volumen de relación 2,5 : 1. La temperatura de evaporación es de 25° y la misma dura 10', agregando periódicamente agua hasta tener un exceso final (5 %) como fase acuosa libre. (Volumen butanol conc. = 2,500 litros.)

## 4. PRECIPITACION DE LA ACTIVIDAD A pH 6

Al concentrado final se ajusta el pH a 6.0 con KOH 40%, con agita -

ción y a temperatura ambiente, Después se mantiene en agitación durante 3 horas más y a temperatura de 5°C. Se agrega un 1% de "calite", se agita 5 minutos y se filtra por Buchner con papel y capa de 1 mm del ayuda filtrante. La torta se lava 2 veces con butanol saturado de agua; ella contiene la mayor parte de la clorotetraciclina pasando el resto a las aguas madres.

#### 5. PURIFICACION DEL PRECIPITADO ACTIVO.

La torta se suspende bien luego en agua y se lleva a pH 2.2 - 2.3 con ácido oxálico al 10%; se solubiliza así la actividad y queda un insoluble de oxalato de calcio, el cual se separa por filtración por Buchner y papel; se lava la torta 3 veces con agua acidulada con oxálico (pH 2.3). Los lavados mas el primer filtrado contienen la clorotetraciclina en solución que se purificará en la nueva etapa.

#### 6. PRECIPITACION DE LA BASE

Al filtrado descalcificado se agrega, gota a gota, solución CHK al 20% hasta pH 6.0; se raspan las paredes con una varilla de vidrio, promoviendo así el comienzo de la cristalización de la base de clorotetraciclina. Cuando comienza a enturbiarse se lleva a temperatura de 5° C, donde se mantiene 3 horas para favorecer la cristalización.

La base cristalina se filtra, se lava con agua 2-3 veces y se seca en desecador al vacío sobre potasa y durante 24 horas. Se pesa y se calcula el rendimiento.

#### 7. PURIFICACION DE LA CLOROTETRACICLINA BASE

Un método de purificación de la base consiste en transformarla en clorhidrato, de éste se partió para efectuar ~~los~~ todos los ensayos de hidrogenación.

Para ello, se disuelve la base en una mezcla de 10% de 2-3 etoxi-etoxi-etanol (cellosolve) en butanol anhidro; luego se agrega trietanolamina hasta disolución completa y se agitan <sup>con</sup> unos 2 gr de carbón activo (Darco G 60) para decolorar la solución.

Se filtra por capa del ayuda filtrante y se lava la torta con butanol anhidro hasta que el lavado no tenga mas color.

Al filtrado resultante se adiciona HCl concentrado hasta ligero exceso,

se rascan las paredes del vaso con una varilla hasta que comienza la cristalización, la que se favorece enfriando a  $\pm 5$  y agitando continuamente unas 5 horas. Se filtran los cristales por papel, se lavan con butanol y luego con acetona; se secan sobre potasa en desecador al vacío. Se pesan y se calcula rendimiento, el que oscila entre 80 - 85 %.

### 8. DETERMINACION DE CONSTANTES

Se efectuaron ensayos con la clorotetraciclina, como clorhidrato, para determinar las constantes, obteniéndose los siguientes datos para 2 lotes provenientes de 2 caldos distintos:

	Nº 1	Nº 2	Bibliografía
Punto de fusión $^{\circ}\text{C}$	210-213 <sup>o</sup> desc.	212-216 <sup>o</sup> desc.	> 210 desc.
Poder rotatorio	$(\alpha)_{\text{D}}^{21} = -237^{\circ}$	$(\alpha)_{\text{D}}^{27} = -235^{\circ}$	$(\alpha)_{\text{D}}^{28} = -240^{\circ}$
Tetraciclina (+)	5 %	2%	1 - 5 %
Clorotetraciclina(+)	95 %	98%	97 -99 %

(+) por cromatografía.

### PREPARACION DE CATALIZADORES

Los catalizadores usados en las hidrogenaciones de clorotetraciclina fueron:

- 1) Paladio al 5 % sobre carbón preparado en Laboratorio
- 2) Paladio sobre carbón adquirido en USA
- 3) Platino al 5 % sobre alúmina
- 4) Niquel de Raney
- 5) Hidróxido de paladio soportado por sulfato de bario

#### 1) PALADIO 5 % / CARBON (5)

Este catalizador, junto al de  $\text{Pt}/\text{Al}_2\text{O}_3$ , fué el más empleado en los ensayos de hidrogenación. Se preparó a partir de Pd metálico.

#### a) DISOLUCION DE Pd

Se disolvieron en la mínima cantidad de agua regia y en baño de vapor; se evaporó a seco y se agrega HCl concentrado, evaporándose y repitiendo el agregado las veces necesarias para eliminar el  $\text{HNO}_3$ ; se obtiene así el Pd

como cloruro, disuelto en HCl.

b) LAVADO DE C ACTIVO

Separadamente se prepara carbón activo (Darco G.60) y se lo lava durante 2 - 3 horas al baño maría con  $\text{HNO}_3$  al 10%; se filtra y se lava con agua hasta eliminar el ácido totalmente, secándose luego en estufa a 100 - 110 ° C.

c) IMPREGNACION

Se suspenden 41.5 gr de este carbón en 600 ml de agua y se calienta a 80° C; se agrega una solución de 4.1 gr de  $\text{Cl}_2\text{Pd}$  en 10 ml de HCl y 25ml de agua destilada y se agita bien.

d) SECADO

La suspensión se seca en estufa a 100 - 110° hasta peso constante y se guarda en frasco cerrado.

Este precatalizador debe activarse cada vez, previamente a su uso, haciendo una hidrogenación con la cantidad necesaria del mismo, utilizando el mismo solvente del ensayo, pero sin agregar antibiótico.

Las condiciones de hidrogenación se mantienen iguales a las del proceso y se da por terminada cuando cesa la absorción del hidrógeno.

En la misma, el  $\text{Cl}_2\text{Pd} + \text{H}_2 \rightarrow 2\text{HCl} + \text{Pd}$  metálico que es el catalizador activo. Se filtra, se lava para eliminar el HCl libre y queda listo para usar.

PREPARACION DE CATALIZADOR DE Pt 5% SOBRE  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (6)

Para la preparación de este catalizador de hidrogenación, se parte de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a la que se activa tratándola durante 1 hora con solución al 10% de ácido acético y decantando; se repite el tratamiento otra hora con ácido de la misma concentración; se lava con agua, se seca a 95°C y se calcina en aire a 482°C. Luego se pone en suspensión en solución de ácido cloroplátnico de concentración suficiente para obtener alrededor de un 5% de Pt en el producto final. El catalizador impregnado se seca a 95°C y se calcina durante 2 horas a 566° C.

PREPARACION DE CATALIZADOR Ni DE RANEY (7)

A una solución 1.5g NaOH en 5 ml A.D. y a 10°C se le adicionan 1 gr de aleación Ni-Al en pequeñas porciones y agitando; evitar que la temperatura

suba de 25°; se requerirán unas 2 horas. Se deja a temperatura ambiente y luego en baño de vapor hasta que desaparezca el desprendimiento y manteniendo constante el volumen de la solución con agua destilada. Se decanta, se agrega agua destilada hasta volumen original, se agita y vuelve a decantar. Se transfiere a un erlenmeyer más chico y se vuelve a decantar el agua destilada. Se agrega una solución de 0.4 g de NaOH en 4 ml de A.D. se agita y decanta. El Ni se lava por suspensión en A.D. de 5' - 10' hasta reacción neutra al tornasol (20 lavados). Se repite el lavado 3 veces con etanol 95 % y 3 veces con alcohol absoluto.

Se almacena en frascos bien llenos de alcohol absoluto y herméticamente cerrados, ya que el producto es muy pirofórico.



#### PREPARACION DE CATALIZADOR (OH)Pd / SO<sub>4</sub>Ba (8)

2 g de Cl<sub>2</sub>Pd se disuelven en 100 cc de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se favorece con 800 cc de A.D. a 80° C. Enfriar y añadir gota a gota y agitando, 1100 cc de (OH)<sub>2</sub>Ba 0.2 N en 15' - 20'.

Centrifugar el precipitado marrón claro que se produce, lavar con 1.200 - 1.600 cc de agua destilada. Secar sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Este catalizador contiene 5 % de paladio y 4.9 a 5.1 % de H<sub>2</sub>O. El Pd de este catalizador es soluble en ácido clorhídrico, pero deja de serlo una vez reducido.

Además de estos catalizadores, se utilizó uno, ya preparado y adquirido como tal, de Pd metálico soportado por carbón activo; no necesitó activación previa y demostró poseer una velocidad de hidrogenación rápida, con buenos rendimientos.

La dificultad en poder conseguir una cantidad mayor a la reducida de que se dispuso, fue la causa de que se hayan efectuado sólo unos pocos ensayos.

Después de las hidrogenaciones en pequeña escala, se comprobó que de aquellos catalizadores preparados, sólo demostraron una actividad considerable los de Pd/C y Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Con estos se hicieron luego trabajos de confirmación en escala mayor, con resultados satisfactorios y concordantes con los pre-

vios.

### EXTRACTOR DE CALDO

Es un recipiente de unos 25 lt de capacidad, formado por una damajuana desfondada invertida, y cuya boca está adaptada como drenaje. Un agitador de paletas accionado a aire comprimido da una eficiente agitación de modo de establecer un contacto íntimo entre el caldo rico y el butanol anhidro. Así la extracción es satisfactoria y la interfase emulsionada que se obtiene es perfectamente separable. El recipiente permite ser utilizado como ampolla de decantación y así se separan 3 capas: la superior de BuOH rica en clorotetraciclina, la capa media que consiste en una interfase con caldo y butanol emulsionados y la inferior del caldo extraído.

ver figura página: 26

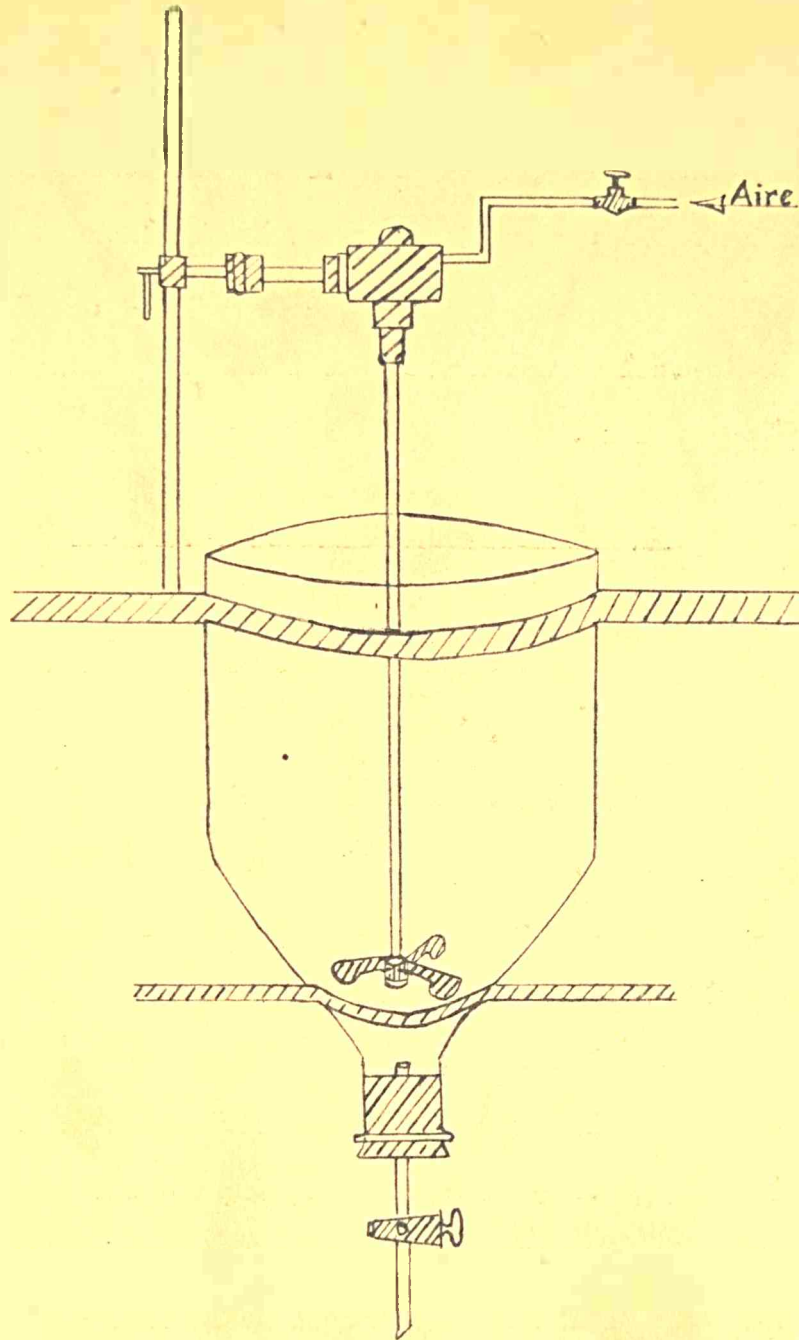
### EVAPORADOR AL VACIO

Consiste esencialmente de 3 partes: una camisa de vapor, un evaporador de vidrio y un sistema de condensación.

El sistema se evacúa completamente. Se succiona el butanol rico a concentrar en la camisa y la solución se calienta, aumenta su nivel y es forzada hacia el evaporador por la parte superior; al mismo tiempo, la solución fría fluye hacia la camisa y se establece una recirculación constante. Por efecto del vacío hay una gran evaporación, condensándose los vapores por el enfriamiento que produce la circulación de agua fría del condensador. La temperatura se mantiene siempre por debajo de 25°C. La presión de vapor necesaria para el proceso es de 4 a 5 libras / ".

Simultáneamente se va reponiendo butanol rico y cuando éste concluye, se carga agua para reponer el azeótropo butanol-agua que destila; una vez llegado a la concentración final según la relación 2.5 : 1 del volumen inicial, se da por terminado el proceso cuando se forma una capa de agua igual al 5% del volumen del butanol concentrado. Se ventila y se drena.

ver figura página: 27

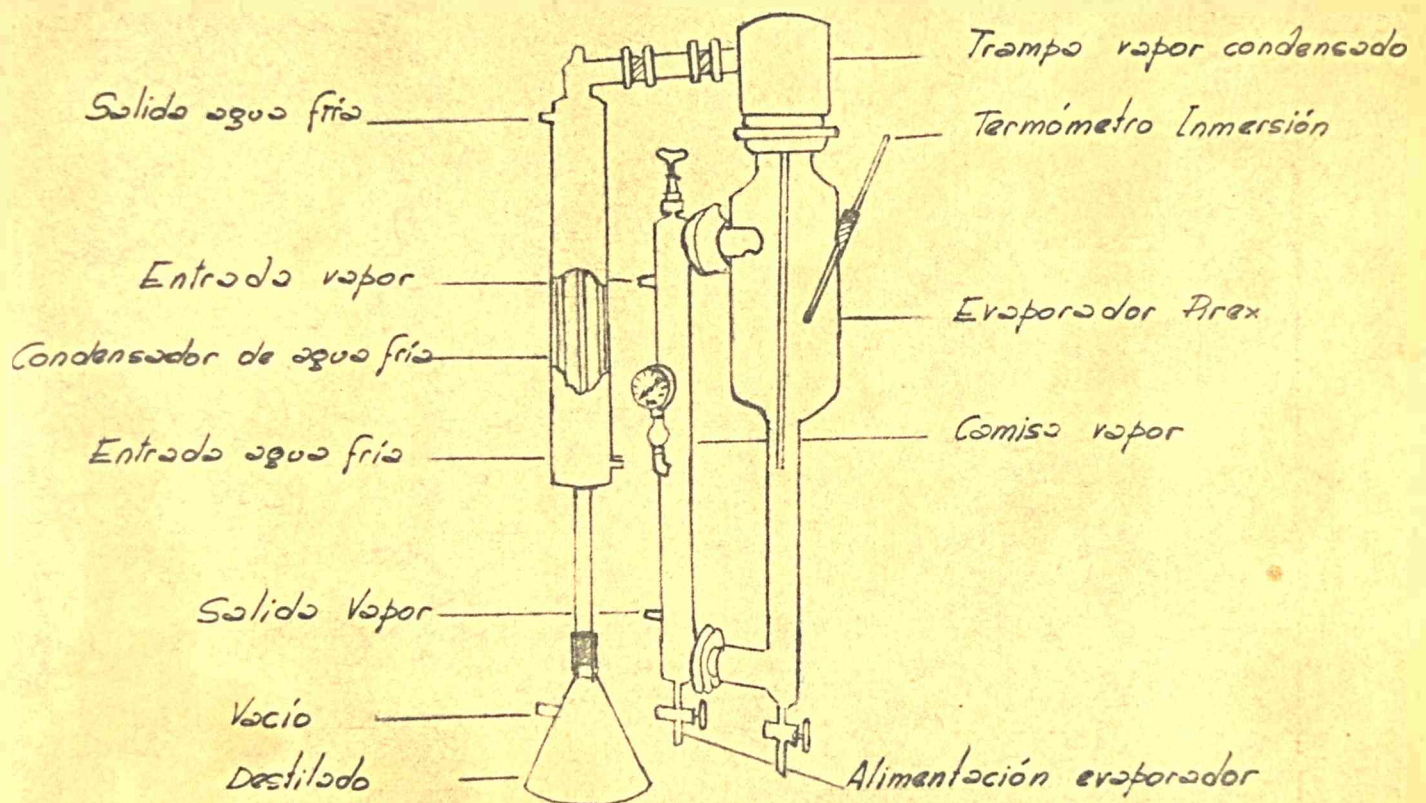


**EXTRACTOR** DE CALDO





## EVAPORADOR AL VACIO



ENSAYOS DE HIDROGENACIONPRUEBA DEL CATALIZADORI. HIDROGENACION DE ACIDO MALICO A SUCINICO

Se hizo una hidrogenación inicial como prueba del catalizador, para lo cual se utilizó ácido maléico y una bomba tipo Parr para bajas presiones (hasta 100 lb) (10)

Se pesan 11.6 gr (0.1 mol) de ácido maléico y se disuelven en 150 ml de alcohol etílico de 95 %; se agregan 0.5 gr de catalizador Pd/C y se hidrogena a una presión inicial de 48.5 lb/□'' de H<sub>2</sub>. Se da por finalizado el proceso al terminar la absorción de H<sub>2</sub> (40.0 lb/□''); litros de H<sub>2</sub> absorbido = 2.24 lt. Al producto obtenido se lo cristaliza y determina punto de fusión: 185°C, que es prácticamente el del ácido succínico (184°C).

Presión inicial	:	48.5 lb/□''
Presión final	:	40.0 lb/□''
Litros de H <sub>2</sub> absorbido	:	2.24 l
Punto de fusión	:	185° C
Peso	:	11.6 gr

CLORO/

II. HIDROGENACION DE CLORHIDRATO DE TETRACICLINA.

Se repitió este ensayo, usando clorhidrato de clorotetraciclina y Pd/C en las siguientes proporciones:

- 1 g de clorhidrato de clorotetraciclina
- 0.2 g de precatalizador Pd/C
- 10ml de metilcellosolve
- 0.5ml de trietanolamina

a) REDUCCION DEL PRECATALIZADOR.

Proviamente se redujo el precatalizador con H<sub>2</sub> y suspendido en metilcellosolve y trietanolamina, en las mismas condiciones que el ensayo con el antibiótico.

b) FILTRACION DEL CATALIZADOR ACTIVADO

El catalizador activado se recupera por filtración, se lava para eliminar restos de ácido no fijado y se usa en la hidrogenación del producto.

c) HIDROGENACION

Los datos del proceso fueron:

Presión inicial : 26 lb/□"  
 Presión final : 25.2 lb/□"  
 Tiempo : 90 '  
 Temperatura : 25° C

d) FILTRACION SOLUCION HIDROGENADA

/la hidrogenación  
 Una vez finalizada, se filtró la suspensión por filtro de placa con papel y capa de ayuda filtrante; se lavó la torta de catalizador con el mismo solvente hasta que pasa incoloro.

e) CRISTALIZACION TETRACICLINA

Al filtrado se le adicionan 5 volúmenes de agua, se raspan las paredes con una varilla para favorecer la cristalización; al comenzar a enturbiarse, se mantiene en cámara fría (+ 5°C) agitando durante 5 horas.

f) FILTRACION Y SECADO DE CRISTALES

Luego se filtran los cristales que se han formado, se lavan y secan en desecador al vacío sobre OHK. Se pesan: 0.600 g de tetraciclina base, con las siguientes características:

Análisis cromatográfico: tetraciclina = 98 %; clorotetraciclina = 2%

Punto de fusión = 175°C desc. (teórico : 170 - 175° C desc.)

g) HIDROGENIZACION A P Y T DE AMBIENTE

Comprobada la actividad del catalizador se inician una serie de hidrogenaciones en escala reducida, utilizando un aparato de vidrio y trabajando solo a una pequeña sobrepresión de H<sub>2</sub>, la necesaria para facilitar la absorción del mismo por la solución. (Descripción del aparato: pág. 50 y 51)

h) PRUEBA DEL APARATO

Se repite en este aparato la prueba de hidrogenación de maléico a succínico, utilizando : 0.333 g de maléico, 0.15 g de Pd/C y 4 ml de etanol. El volumen inicial de H<sub>2</sub> fué de 6.96 ml a 26° C y el final de 0.5 ml; tiempo: 20'; presión atmosférica = 765.4 mm.

Corrección del volumen de H<sub>2</sub> absorbido:

$$\frac{P_0 \cdot V_0}{T_0} = \frac{P_1 \cdot V_1}{T_1} \quad \frac{760 \cdot V_0}{273} = \frac{765.4 \times (6.96 - 0.5)}{299}$$

$$V_0 = \frac{765.4 \times (6.96 - 0.5) \times 273}{299 \times 760} = 3.18 \text{ ml}$$

Teóricos:

11.6 mol. ác. ——— 2.24 lt H<sub>2</sub> absorb.  
 0.333 mol. ác. ——— x = 6.43 ml  
 Absorción = 96.1 %

### HIDROGENACION DE CLOROTETRACICLINAS

Se comienzan las hidrogenaciones de clorotetraciclina variando los solventes y catalizadores. En primer término se utilizó un catalizador de Pd metálico sobre carbón que no necesitó reducción previa y que fué adquirido como tal. Se hicieron ensayos usando los siguientes solventes: metilcellosolve, metanol y mezcla de dioxano y metanol, obteniéndose los siguientes resultados:

#### ENSAYO N° 1:

#### METILCELOSOLVE

Clorhidrato de clorotetraciclina = 0.0943 gr  
 Catalizador Pd/C = 0.030 gr  
 Metilcellosolve = 3 ml  
 Trietanolamina = 0.05 ml  
 Volumen inicial = 6.58 ml H<sub>2</sub> T° 26°8  
 Volumen final = 1.66 ml H<sub>2</sub> ΔV = 4.92 ml Δ tiempo = 25'  
 ΔV correg. : 4.48 ml ΔV teor. : 4.15 ml

Se cristaliza y seca. Se hacen determinaciones:

Punto fusión = 174° C (descomp.)  
 Color = Amarillo pálido  
 Cromatografía = 100 % tetraciclina

#### ENSAYO N° 2:

#### METILCELOSOLVE

Se repitió el N°1 para confirmar resultados:

Clorhidrato de clorotetraciclina = 0.0989 gr  
 Catalizador Pd/C = 0.030 gr  
 Metilcellosolve = 3 ml  
 Trietanolamina = 0.05 ml  
 ΔV correg. = 4.71 ml ΔV teor. = 4.32 Δt = 12'

Punto de fusión = 173° C desc.

Color = amarillo pálido

Análisis cromatográfico = 100 % tetraciclina.

Se hizo la curva del progreso de la absorción que se observa en la fig.1.

ENSAYO N° 3DIOXANO - METANOL

Clorhidrato de clorotetraciclina	= 0.0989 g
Catalizador de Pd/C	= 0.050 g
Dioxano	= 4 ml
Metanol	= 1 ml
Trietanolamina	= 0.05 ml
Volumen H <sub>2</sub> absorbido (correg.)	= 5.89 ml
Volumen H <sub>2</sub> absorbido (teórico)	= 4.22 ml
Tiempo	= 24 minutos
Análisis cromatográfico	= 100 % tetraciclina
Punto de fusión	= 173° C desc.

ENSAYO N° 4DIOXANO - METANOL

Es una repetición del anterior para confirmar resultados.

Clorhidrato de clorotetraciclina	= 0.0854 g
Catalizador Pd/C	= 0.050 g
Dioxano	= 4 ml
Metanol	= 1 ml
Trietanolamina	= 0.05 ml
Volumen H <sub>2</sub> absorbido (correg.)	= 5.79 ml
Volumen H <sub>2</sub> absorbido (teórico)	= 4.88 ml
Tiempo	= 26 minutos
Análisis cromatográfico	= 100 % tetraciclina
Punto de fusión	= 172° C desc.

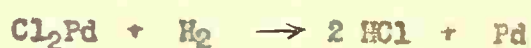
HIDROGENACION CON CATALIZADOR Pd/C PREPARADO EN LABORATORIO

Este catalizador fue preparado por el método ya descrito anteriormente.

Fue necesaria una reducción previa del precatalizador Pd/C antes de cada hidrogenación; para ello se pesó la cantidad necesaria del mismo con un pequeño exceso por las pérdidas posibles de manipuleo.

Se procesa con el mismo volumen de solvente que para la hidrogenación principal y se pone en el aparato en contacto con el hidrógeno, hasta que finaliza la absorción; el punto final está determinado por la constancia en las lecturas del nivel de mercurio en los tubos.

El catalizador se separa por centrifugación del solvente; se lo somete a lavados para eliminar el ácido clorhídrico que se produjo en la reducción del mismo, por la reacción:



Así queda listo el catalizador, como Pd metálico soportado por carbón, para la hidrogenación de la clorotetraciclina. La variante con respecto a la reducción previa radica en que en la del antibiótico se fija el ácido clorhídrico que se va desprendiendo por medio de una base, trietanolamina en este caso, para evitar una reacción del mismo con el antibiótico resultante del proceso (tetraciclina base) (9)

En general se hicieron 2 ensayos con cada uno de los solventes, con los que mejores resultados se obtuvieron.

En la tabla I se detallan todos los datos obtenidos en cada una de esta serie de hidrogenaciones y va adosada al final del conjunto de ensayos.

ENSAYO N° 7 - Pd/C - METILCELOSOLVE - Fig. 2. Pág. 58

Clorhidrato de clorotetraciclina	: 0.0922 g		
Catalizador Cl <sub>2</sub> Pd/C	: 0.030 g		
Metilcellosolve	: 5 ml		
Trietanolamina	: 0.05 ml		
Δ V abs. = 5.77 ml H <sub>2</sub>	Δ V teor. = 4.24 ml	Δ t' = 60 min.	
Peso de tetraciclina base	: 0.0555 g		
Rendimientos: 60.4% como base y 64.8% como clorhidrato			
Color : amarillo limón			

Punto de fusión : 175° C (desc.)

Análisis cromatográfico = 100% tetraciclina; 0% clorotetraciclina

Actividad biológica = 450 %/ml (standard / 500 %/ml)

ENSAYO N° 8 - IDEM ANTERIOR

$\Delta V$  corr. = 3,77ml       $\Delta V$  teor. = 4,00 ml       $\Delta t'$  = 82 min.

Peso de la tetraciclina base : 0,070 g

Rendimientos : 80,4% base; 86,8% clorhidrato

Color : amarillo pálido

Punto de fusión : 175° C desc.

Análisis cromatográfico = 100% tetraciclina; 0% clorotetraciclina

Actividad biológica = 450 %/ml

ENSAYO N°9 - Pd/C - METANOL

Clorhidrato de clorotetraciclina : 0,0962 g

Precatalizador  $Cl_2Pd/C$  : 0,030 g

Metanol : 4 ml

Trietanolamina : 0,05 ml

$\Delta V$  corr. = 2,54 ml  $H_2$        $\Delta V$  teor. = 4,45 ml       $\Delta t'$  = 115 min.

Peso de la tetraciclina base : 0,052 g

Rendimientos : 54,1% base y 58,4% clorhidrato

Color : amarillo pálido

Punto de fusión : 169° C desc.

Análisis cromatográfico : 95% de tetraciclina + 5% de clorotetraciclina

Actividad biológica : 460 %/ml

ENSAYO N° 10 - IDEM ANTERIOR - Fig. 5. Pág. 58

Clorhidrato de clorotetraciclina : 0,095 g

Catalizador : 0,030 g

$\Delta V$  corr. = 2,88 ml  $H_2$        $\Delta V$  teor. = 4,27 ml       $\Delta t'$  = 80 min

Peso de la base obtenido : 0,0582 g

Rendimientos : 62,8% (base) y 67,6% (clorhidrato)

Color : amarillo limón

Punto de fusión : 175° C desc.

Análisis cromatográfico : 94% tetraciclina + 6% clorotetraciclina

Actividad biológica : 460 %/ml

ENSAYO N° 11 - Pd/C - ETANOL

Clorhidrato de de clorotetraciclina : 0.0945 g

$\Delta V$  corr. = 8.88 ml       $\Delta V$  teór. = 4.54 ml       $\Delta t'$  = 67'

Peso de la base obtenida = 0.0661 g

Rendimientos : 72.8% (base) y 77.9% (clorhidrato)

Color : amarillo claro

Punto de fusión : 176° C desc.

Análisis cromatográfico = 95% tetraciclina + 5% clorotetraciclina

Actividad biológica = 450  $\delta$ /ml

ENSAYO N° 12 - IDEN AL N° 11

Clorhidrato de clorotetraciclina : 0.0984 g

$\Delta V$  corr. = 8.57 ml H<sub>2</sub>       $\Delta V$  teór. = 4.29 ml H<sub>2</sub>       $\Delta t'$  = 110'

Peso de la base obtenida = 0.0698 g

Rendimiento : 74.7% (base) y 80.7% (clorhidrato)

Color : amarillo marfil

Punto de fusión : 171° C desc.

Análisis cromatográfico = 94% tetraciclina + 6% clorotetraciclina

Actividad biológica = 415  $\delta$ /ml

ENSAYO N° 13 - Pd - BUTANOL - Fig. 4. Pág. 58

Clorhidrato de clorotetraciclina : 0.0985 g

$\Delta V$  correg. = 0.92 ml       $\Delta V$  teór. = 4.80 ml       $\Delta t'$  = 65'

Peso de la base obtenida = 0.048 g

Rendimientos = 45.9% (base) y 49.6% (clorhidrato)

Color: amarillo arena

Punto de fusión = 170° C desc.

Análisis cromatográfico: 95% tetraciclina + 5% clorotetraciclina

Actividad biológica: no se hizo por bajo rendimiento.

ENSAYO N° 14 - IGUAL AL N° 13

Se repitió en las mismas condiciones, obteniéndose una absorción muy baja :  $\Delta V$  corr. = 0.58 ml, luego de una compresión inicial. El producto obtenido no se consigue cristalizar.

ENSAYO N° 15 - Pd/C - CELLOSOLVE - Fig. 5. Pág. 59

Clorhidrato de clorotetraciclina : 0.0981 g

$\Delta V$  corr. = 8.85 ml H<sub>2</sub>       $\Delta V$  teór. = 4.27 ml       $\Delta t'$  = 70'



Peso de la base obtenida : 0.0676 g

Rendimientos : 72.6% (base) y 78.4% (clorhidrato)

Color: amarillo arena

Punto de fusión: 167° C desc.

Análisis cromatográfico : 96% tetraciclina + 4% clorotetraciclina

Actividad biológica: 475  $\gamma$ /ml

ENSAYOS N° 16 y 17 - Pd/C - AGUA

El primer ensayo dió una absorción anormal de  $H_2$ , obteniéndose una solución negruzca que se precipitó a pH: 4.5; el producto obtenido es de aspecto grisáceo y amorfo (no acusa cristales a la observ.). El peso fué de 0.0219 g y el tiempo del proceso 65'.

El segundo fué más normal, y se obtuvieron los resultados siguientes:

$\Delta V$  corr. = 3.76 ml  $H_2$        $\Delta V$  teor. = 4.27 ml       $\Delta t'$  = 106'

Peso de la base obtenida = 0.0397 g

Rendimientos : 42.7% (base) y 46.1% (clorhidrato)

Color: verde oscuro

Punto de fusión : 166° C desc.

Análisis cromatográfico: 94% tetraciclina + 6% clorotetraciclina

ENSAYO N° 18 y 19 - Pd/C - DICXARO

Clorhidrato de clorotetraciclina : 0.093 g

$\Delta V$  corr.: 2.7 ml       $\Delta V$  teor.: 4.27 ml       $\Delta t'$  : 65'

Se obtuvo un precipitado amorfo, rojizo oscuro.

Se repitió y dió un resultado semejante siendo aun menor la absorción de  $H_2$ .

ENSAYO N° 20 - Pd/C - ISOPROFANOL  
cloro/

Clorhidrato de tetraciclina; 0.093 g

$\Delta V$  corr. = 0.5 ml       $\Delta V$  teor. = 4.27       $\Delta t'$  = 46'

Peso de la base obtenida : 0.0381 g

Rendimiento : 40.96 (base) y 44.28 (clorhidrato)

Punto de fusión: 169 °C desc.

Color : marfil

No se hizo el análisis cromatográfico ni la actividad biológica debido al bajo rendimiento.

Los próximos ensayos fueron hechos con la variante de no agregar la trietanolamina para neutralizar el HCl liberado en la reacción.

ENSAYO N° 21 - Et/G - BUTANOL SATURADO DE AGUA

Clorhidrato de clorotetraciclina: 0.098 g

$\Delta V$  corr. = 2.76 ml       $\Delta V$  teor. = 4.27 ml       $\Delta t'$  = 105'

Peso de la base obtenida : 0.029 g

Color : amarillo anaranjado

Rendimiento: 31.5% (base) y 34.0% (clorhidrato)

Punto de fusión: 179°C desc.

Análisis cromatográfico: 61% tetraciclina y 18% clorotetraciclina

ENSAYO N° 22 - BUTANOL ANHIDRO (sin triet.)

En este ensayo, la absorción de  $H_2$  fué irregular, obteniéndose cristalizado un producto color arena. El rendimiento fué bajo : 27.8%. El punto de fusión: 180°C.

ENSAYO N° 23 - AGUA (sin triet.) - Fig. 6. Pág. 59

Las mismas proporciones que los ensayos anteriores.

$\Delta V$  corr. = 2.98 ml  $H_2$        $\Delta V$  teor. = 4.27 ml  $H_2$        $\Delta t'$  = 95'

Peso de tetraciclina base obtenida = 0.0615 g

Rendimientos : 65.9% (base) y 71.2% (clorhidrato)

Color : amarillo verdoso

Punto de fusión: 181°C desc.

Análisis cromatográfico: 91% tetraciclina y 9% clorotetraciclina

ENSAYOS N° 24 y 25 - CELLOSOLVE (sin triet.)

Las hidrogenaciones practicadas en estas condiciones tuvieron bajas absorciones de  $H_2$ , estabilizándose las mismas alrededor de los 50 minutos.

$\Delta V$  corr. = 1.18 ml  $H_2$  y 1.04 ml  $H_2$  respectivamente. Durante la cristalización solo se produce un precipitado amorfo, en pequeña cantidad; no se efectuaron determinaciones sobre el mismo.

ENSAYO N° 26 - METANOL (sin triet.)

Igual que los procesos anteriores, el  $H_2$  absorbido es muy inferior al teórico :  $\Delta V$  cor.. = 1.44 ml  $H_2$  después de 80'. Tampoco se consigue cristalizar el producto final.

ENSAYO N° 27 - ETANOL (sin triet.)

En las mismas condiciones y resultados que el N° 26.

$\Delta V$  corr. = 1.14 ml  $H_2$  en 90' .

ENSAYO N° 28 - METILCELLOSOLVE (sin triet.)

Con los mismos ml de H<sub>2</sub> absorbidos que el N° 27 en 95'min, se desarrolla esta nueva reducción. Tampoco se obtienen cristales, sino un precipitado amorfo, amarillo naranja.

HIDROGENACION CON CATALIZADOR Pt 5%/ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>ENSAYO N° 29 - METILCELLOSOLVE (con triet.) - Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Fig. 7. Pág. 59

Aquí se hidrogenó con un nuevo catalizador: Pt al 5% soportado sobre alúmina.

Peso de clorhidrato de clorotetraciclina = 0.092 g

Catalizador = 0.030 g

$\Delta V$  corr. = 4.09 ml H<sub>2</sub>       $\Delta V$  teor. = 4.24 ml H<sub>2</sub>       $\Delta t$  = 55'

Peso base tetraciclina = 0.0775 g

Rendimientos : 88.8 % (base) y 90% (clorhidrato)

Color : amarillo arena

Punto de fusión : 168° desc.

Análisis cromatográfico: 95% tetraciclina y 5% clorotetraciclina

Actividad biológica: 460 %/ml.

ENSAYO N° 30 - METILCELLOSOLVE ( con triet.) - Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Se repite el anterior con los mismos materiales y proporciones.

$\Delta V$  corr. = 4.27 ml       $\Delta V$  teor. = 4.27 ml       $\Delta t'$  = 56'

Peso base tetraciclina : 0.0553 g

Rendimientos : 59.5 % (base) y 64.5 % (clorhidrato)

Color : amarillo pálido

Punto de fusión: 171 °C desc.

Análisis cromatográfico : 100 % tetraciclina

ENSAYO N° 31 - METANOL (con triet.) - Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Fig. 8 Pág. 59

Iguales condiciones y cantidades.

$\Delta V$  corr. 3.48 ml       $\Delta V$  teor. = 4.24 ml       $\Delta t'$  = 37'

Peso base tetraciclina : 0.0618 g

Rendimientos = 66.5 % (base) y 71.8 % (clorhidrato)

Color: amarillo limón

Punto de fusión : 165 ° C desc.

Análisis cromatográfico: 95% tetraciclina y 5% clorotetraciclina  
 Actividad biológica: 460  $\delta$ /ml.

HIDROGENACION DE CLOROTETRACICLINA CON  
CATALIZADOR NI DE RANEY

Después de esta serie de hidrogenaciones con catalizadores de Pd y Pt, se prepara el de Ni de Raney según el método descrito al comienzo.

El primer y único ensayo dió los siguientes resultados:

ENSAYO N° 22 - Ni Raney - METILCELOSOLVE (triet.)

Peso clorotetraciclina : 0.100 g      Catalizador : 0.040 g

$\Delta V$  corr. = 0.68 ml  $H_2$        $\Delta V$  teor. = 4.52 ml  $H_2$        $\Delta t'$  = 41'

Peso de cristales obtenidos : 0.0226 g.

Análisis cromatográfico: 100% clorotetraciclina.

Esto indica que la clorotetraciclina no se ha alterado por efecto de la hidrogenación, lo que indica que el catalizador de Ni de Raney no es efectivo para la reducción de aquella.

HIDROGENACION CON CATALIZADOR DE HIDROXIDO  
DE Pd SOBRE SULFATO DE Ba.

Se preparó el catalizador de  $(OH)_2 Pd/SO_4Ba$  ( ver preparación) y antes de su aplicación directa, se probó su actividad catalítica en la reducción de una sustancia orgánica pura, ácido cinámico, en este caso. Estas hidrogenaciones (que fueron 2) se llevaron a cabo a presión atmosférica y a presión de 1 Kg/cc, en la bomba Parr.

Se tomaron 5 g de ácido cinámico en metanol 80% y 0.18 g de catalizador; a los 18' se estabiliza la absorción, que fué baja y se dió por terminado el ensayo. Se cristalizó el producto y se determinó el punto de fusión: 112° C que es el del ácido cinámico, lo que indica que no reaccionó con el  $H_2$  en presencia del catalizador.

ENSAYO N° 23 -  $(OH)_2Pd/SO_4Ba$  - METILCELOSOLVE (triet.)

Se efectuó un ensayo de hidrogenación de clorotetraciclina con el mismo catalizador, usando los siguientes proporciones.

Clorotetraciclina (clorhidrato) : 0.100 g

Catalizador : 0.050 g

4ml metilcellosolve + 0.05 ml trietanolamina

La absorción de  $H_2$  fué de 3.80 ml y el tiempo del proceso : 65', se cristalizó el producto final, obteniéndose muy bajo rendimiento de cristales : 20.6 %. Por esta causa no se efectuaron determinaciones sobre los mismos.

E-SELECCION DE LOS PROCEDIMIENTOS QUE DIERON MEJORES RESULTADOS

En la tabla I de la pág. 55 se reúnen todos los ensayos efectuados y los respectivos resultados .

Observándola se deduce que las condiciones más favorables para la hidrogenación, se obtuvieron con el uso de catalizadores de Pd/C y Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y de varios solventes que son manifiestamente superiores a los restantes ensayados, tanto en rendimiento como en pureza y actividad biológica de la tetraciclina obtenida. Así se vé, que, usando catalizadores de Pd/C y Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en soluciones de clorotetraciclina en metilcellosolve, la hidrogenación produce rendimientos superiores al 80% de clorhidrato de tetraciclina.

Igualmente es muy efectivo el catalizador de Pd/C reducido.

Tomando los solventes más adecuados y los 2 catalizadores antes mencionados, se efectuaron una serie de hidrogenaciones con cantidades mayores de sustancia, con el objeto de confirmar los resultados obtenidos en pequeña escala .

Se usó un hidrogenador de vidrio de mayor capacidad. El método y las figuras de los distintos aparatos usados en las hidrogenaciones, se incluyen al final de la parte experimental. A continuación se detallan los resultados de las hidrogenaciones de confirmación.

F - HIDROGENACIONES DE CONFIRMACION

ENSAYO N. 34 - CATAL. Pd/C - METILCELOSOLVE - Fig. 9. Pág. 60

En todos estos ensayos se hidrogenaron 0.500 g de clorotetraciclina en presencia de 0.150 g de catalizador y 0.25 ml de <sup>anol</sup> trietilamina.

$\Delta V$  - 27.4 ml     $\Delta V$  corr. - 25.0 ml     $\Delta V$  teor. - 22.96 ml     $\Delta t$  - 98'

Peso de la base cristalizada - 0.3588 g

Rendimiento base - 71.7 %

Rendimiento clorhidrato - 77.5 %

Cromatografía - 99% tetraciclina + 1% clorotetraciclina

Actividad biológica - 470  $\mu$ /ml

Punto de fusión - 171°C desc.    Color - amarillo marfil

ENSAYO N. 35 - idem - Fig. 10. Pág. 60

$\Delta V$  - 23.0 ml     $\Delta V$  corr. - 21.1 ml     $\Delta V$  teor. - 22.96 ml     $\Delta t$  - 80'

Peso de la base cristalizada - 0.4037 g

Rendimiento base - 80.7 %

Rendimiento clorhidrato - 87.1 %

Cromatografía: 99 % tetraciclina + 1 % clorotetraciclina

Actividad biológica : 440  $\delta$ /ml

Punto de fusión : 171°C desc.

Color: amarillo marfil.

ENSAYO N° 16 - Idem.

$\Delta V = 27.2$  ml

$\Delta V$  corr. = 24.9       $\Delta V$  teor. 22.96 ml       $\Delta t' = 55'$

Peso de la base cristalizada = 0.355 g

Rendimiento base = 71.0 %

Rendimiento clorhidrato = 76.7 %

Cromatografía = 99 % tetraciclina + 1% clorotetraciclina

Actividad biológica = 510  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 172°C desc.

Color = amarillo marfil

ENSAYO N° 17 - Idem - Fig. 11. Pág. 60

$\Delta V = 25.0$  ml

$\Delta V$  corr. = 22.9 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t' = 65'$

Peso de la tetraciclina base = 0.3716 g

Rendimiento base = 74.3 %

Rendimiento clorhidrato = 80.5 %

Cromatografía = 99 % tetraciclina + 1% clorotetraciclina

Actividad biológica = 490  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 172°C desc.

Color = amarillo pálido

ENSAYO N° 18 - Idem - Fig. 12. Pág. 60

$\Delta V = 24.1$  ml

$\Delta V$  corr. = 22.2 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t' = 55'$

Peso de la tetraciclina base = 0.3681 g

Rendimiento base = 73.6 %

Rendimiento clorhidrato = 79.5 %

Cromatografía = 99 % tetraciclina + 1 % clorotetraciclina

Actividad (2cc) biológica = 490  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 170°C

Color = amarillá.

ENSAYO N° 39 - CATALIZADOR PA/G - METANOL - Fig. 13. Pág. 61

En toda esta serie de hidrogenaciones se procesaron 0.500 g de cloro-tetraciclina con 0.150 g de catalizador y 0.25 ml de triet<sup>anol</sup>amina, todo en 10 ml de metanol anhidro como solvente.

$$\Delta V = 24.2 \text{ ml}$$

$$\Delta V \text{ corr.} = 22.3 \text{ ml} \quad \Delta V \text{ teor.} = 22.96 \text{ ml} \quad \Delta t' = 65'$$

Peso de la tetraciclina base = 0.5308 g

Rendimiento base = 68.1 %

Rendimiento clorhidrato = 71.4 %

Cromatografía = 96 % tetraciclina + 4 % clorotetraciclina

Actividad biológica = 500  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 173°C

Color = amarillo pálido

ENSAYO N° 40 - Idem anterior - Fig. 14. Pág. 61

$$\Delta V = 25.5 \text{ ml}$$

$$\Delta V \text{ corr.} = 23.5 \text{ ml} \quad \Delta V \text{ teor.} = 22.96 \text{ ml} \quad \Delta t' = 70'$$

Peso de la tetraciclina base = 0.5402 g

Rendimiento base = 68.0 %

Rendimiento clorhidrato = 73.4 %

Cromatografía = 97.5 % tetraciclina + 2.5 % clorotetraciclina

Actividad biológica = 460  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 172°C

Color = amarillo pálido

ENSAYO N° 41 - Idem - Fig. 15. Pág. 61

$$\Delta V = 23.0 \text{ ml}$$

$$\Delta V \text{ corr.} = 21.1 \text{ ml} \quad \Delta V \text{ teor.} = 22.96 \text{ ml} \quad \Delta t' = 85'$$

Peso de la tetraciclina base = 0.577 g

Rendimiento base = 75.4 %

Rendimiento clorhidrato = 81.4 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 520  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 171°C

Color = amarillo pálido.

ENSAYO N° 42 - Idem - Fig. 16. Pág. 61

$$\Delta V = 27.0 \text{ ml}$$

$\Delta V$  corr. = 24.6 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 85'

Peso de la tetraciclina base = 0.8682 g

Rendimiento base = 72.6 %

Rendimiento clorhidrato : 78.4 %

Cromatografía : 90 % tetraciclina + 10 % clorotetraciclina

Repetición = 88 % tetraciclina + 12 % clorotetraciclina

Actividad biológica = 510  $\mu$ /ml

Punto de fusión = 170°C

Color = amarillo limón.

ENSAYO N° 43 - Iden.

$\Delta V$  = 21.0 ml

$\Delta V$  corr. = 19.2 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 60'

Peso de la tetraciclina base = 0.8424 g

Rendimiento base = 68.5 %

Rendimiento clorhidrato = 74.0 %

Cromatografía = 91 % tetraciclina + 9 % clorotetraciclina

Actividad biológica = 590  $\mu$ /ml

Punto de fusión = 171 °C

Color = amarillo pálido.

ENSAYO N° 44 - CATALIZADOR Pd/C - ETANOL

En esta serie de ensayos se hidrogenaron 0.500 g de clorotetraciclina  
/anol  
con 0.150 g de catalizador, 0.25 ml de trietilamina en 10 ml de etanol puro.

$\Delta V$  = 25.8 ml

$\Delta V$  corr. = 21.0 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 100'

Peso de tetraciclina base = 0.8677 g

Rendimiento base = 75.5 %

Rendimiento clorhidrato = 78.4 %

Cromatografía = 95 % tetraciclina + 7 % clorotetraciclina

Actividad biológica = 440  $\mu$ /ml

Punto de fusión = 172°C

Color = amarillo pálido.

ENSAYO N° 45 - Iden anterior - Fig. 17. Pág. 62

$\Delta V$  = 24.9 ml

$\Delta V$  corr. = 22.7 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 75'



Peso de la tetraciclina base = 0.8416 g

Rendimiento base = 68.8 %

Rendimiento clorhidrato = 73.8 %

Cromatografía = > 96 % de tetraciclina

Actividad biológica = 480  $\gamma$ /ml

Punto de fusión = 171.5°C

Color = amarillo pálido.

ENSAYO N° 46 - Idem - Fig. 18. Pág. 62

$\Delta V = 25.2$  ml

$\Delta V_{\text{corr.}} = 25.0$  ml       $\Delta V_{\text{teor.}} = 22.96$  ml       $\Delta t' = 80'$

Peso de la tetraciclina base = 0.8652 g

Rendimiento base = 73.0 %

Rendimiento clorhidrato tetraciclina = 78.8 %

Cromatografía = > 96 % tetraciclina + < 4 % clorotetraciclina

Actividad biológica = 500  $\gamma$ /ml

Punto de fusión = 172°C

Color = amarillo.

ENSAYO N° 47 - Idem - Fig. 19. Pág. 62

$\Delta V = 22.0$  ml

$\Delta V_{\text{corr.}} = 20.1$  ml       $\Delta V_{\text{teor.}} = 22.96$  ml       $\Delta t' = 75'$

Peso de la tetraciclina base = 0.8758 g

Rendimiento base = 75.2 %

Rendimiento clorhidrato de tetraciclina = 81.2 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 560  $\gamma$ /ml

Punto de fusión = 171°C

Color = amarillo pálido.

ENSAYO N° 48 - Idem - Fig. 20. Pág. 62

$\Delta V = 26.2$  ml

$\Delta V_{\text{corr.}} = 25.7$  ml       $\Delta V_{\text{teor.}} = 22.96$  ml       $\Delta t' = 80'$

Peso de la tetraciclina base = 0.8828 g

Rendimiento base = 76.6 %

Rendimiento clorhidrato tetraciclina = 82.7 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 600  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 171°C

Color = amarillo.

ENSAYO N° 49 - CATALIZADOR Pt 5%/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - METILCELOSOLVE - Fig. 21 Pág. 63

En estos ensayos se hidrogenizaron 0.500 g de clorhidrato de clorotetraciclina disueltos en 10 ml metilcellosolve y con 0.150 g de catalizador de Pt al 5% sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; se agregaron como en los otros, 0.25 ml de triet<sup>anol</sup>amina.

$\Delta V = 24.0$  ml

$\Delta V$  corr. = 22.1 ml       $\Delta V$  teor. = 2296 ml       $\Delta t' = 60'$

Peso de la tetraciclina base = 0.3949 g

Rendimiento base = 79.0 %

Rendimiento clorhidrato de tetraciclina = 85.8 %

Cromatografía = 99 % tetraciclina + 1 % clorotetraciclina

Actividad biológica = 470  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 172°C

Color = arena

ENSAYO N° 50 - Idem - Fig. 22. Pág. 63

$\Delta V = 23.9$  ml

$\Delta V$  corr. = 21.8 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t' = 55'$

Peso de la tetraciclina base = 0.5736 g

Rendimiento base = 74.7 %

Rendimiento clorhidrato tetraciclina = 80.8 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 470  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 173°C

Color = amarillo arena.

ENSAYO N° 51 - Idem - Fig. 23. Pág. 63

$\Delta V = 21.0$  ml

$\Delta V$  corr. = 21.0 ml       $\Delta V$  teor. = 2296 ml       $\Delta t' = 50'$

Peso de la tetraciclina base = 0.3786 g

Rendimiento base = 75.7 %

Rendimiento clorhidrato tetraciclina = 81.7 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 480  $\delta$ /ml

Punto de fusión = 174°C

Color = amarillo arena.

ENSAYO N° 52 - Idem - Fig. 24. Pág. 63 $\Delta V = 24.2 \text{ ml}$  $\Delta V \text{ corr.} = 22.0 \text{ ml}$        $\Delta V \text{ teor.} = 22.96 \text{ ml}$        $\Delta t' = 60'$ 

Peso tetraciclina base = 0.8421 g

Rendimiento base = 68.4 %

Rendimiento clorhidrato tetraciclina = 72.9 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 520  $\delta/\text{ml}$ 

Punto de fusión = 173°C

Color = amarillo arena

ENSAYO N° 53 - Idem $\Delta V = 25.5 \text{ ml}$  $\Delta V \text{ corr.} = 23.2 \text{ ml}$        $\Delta V \text{ teor.} = 22.96$        $\Delta t' = 55'$ 

Peso de la tetraciclina base = 0.8750 g

Rendimiento base = 75.0%

Rendimiento clorhidrato tetraciclina = 61.0 %

Cromatografía = 100% tetraciclina

Actividad biológica = 500  $\delta/\text{ml}$ 

Punto de fusión = 172.5°C desc.

Color = amarillo arena

ENSAYO N° 54 - CATALIZADOR Pt 5%/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - METANOL Pág. 64

Una serie de ensayos hidrogenando 0.500 g de clorhidrato de clorotetraciclina en 10 ml de metanol con 0.150 g de catalizador de Pt al 5% sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en presencia de 0.25 ml de triet<sup>anol</sup>amina.

 $\Delta V = 23.4 \text{ ml}$  $\Delta V \text{ corr.} = 21.4 \text{ ml}$        $\Delta V \text{ teor.} = 22.96 \text{ ml}$        $\Delta t' = 65'$ 

Peso de la tetraciclina base = 0.8753 g

Rendimiento base = 75.1 %

Rendimiento clorhidrato tetraciclina = 81.1 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 600  $\delta/\text{ml}$ 

Punto de fusión = 175°C des.

Color = amarillo pálido.

ENSAYO N° 55 - Idem $\Delta V = 25.5 \text{ ml}$

$\Delta V$  corr. = 21.5 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 65'

Peso de la tetraciclina base = 0.5806 g

Rendimiento base = 76.12 %

Rendimiento clorhidrato = 82.2 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 600  $\gamma$ /ml

Punto de fusión = 174°C desc.

Color = amarillo pálido.

ENSAYO N° 56 - Idem

$\Delta V$  = 22.5 ml

$\Delta V$  corr. = 20.7 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 70'

Peso de la tetraciclina base = 0.3762 g

Rendimiento base = 75.2 %

Rendimiento clorhidrato = 81.2 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 600  $\gamma$ /ml

Punto de fusión = 174°C

Color = amarillo pálido

ENSAYO N° 57 - Idem

$\Delta V$  = 22.9 ml       $\Delta V$  corr. = 21.0 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 55'

Peso de la tetraciclina base = 0.3750 g

Rendimiento base = 75.0 %

Rendimiento clorhidrato = 81.0 %

Cromatografía = 100 % tetraciclina

Actividad biológica = 580  $\gamma$ /ml

Punto de fusión = 174°C desc.

Color = amarillo pálido

ENSAYO N° 58 - Idem

$\Delta V$  = 24.5 ml       $\Delta V$  corr. = 22.2 ml       $\Delta V$  teor. = 22.96 ml       $\Delta t'$  = 45'

Peso de la tetraciclina base = 0.3715 g

Rendimiento base = 74.2 %

Rendimiento clorhidrato = 80.2 %

Cromatografía = 98 % tetraciclina

Actividad biológica = 580  $\gamma$ /ml

Punto de fusión = 175°C desc.

Color = amarillo pálido.

RINDICIONES A PRESION EN BOMBA PARR

Con la base de las mismas cantidades de reactivos de los ensayos anteriores se efectuaron algunas hidrogenaciones a presión en la bomba Modelo Parr para bajas presiones de trabajo. El catalizador usado fué Pd/C obtenido a partir del precatalizador de  $Cl_2Pd$ , el que se redujo en las mismas condiciones del proceso principal. Los resultados fueron de bajo rendimiento de producto final cristalizado, sobre el cual no se hicieron determinaciones de constantes por dicho motivo.

La serie de hidrogenaciones se efectuó con metanol como solvente de 0.500 g de clorhidrato de clorotetraciclina y con triet<sup>anol</sup>amina como base precipitadora del HCl producido en la deshalogenación de la clorotetraciclina. La presión del proceso fué de 1 atmósfera, no pudiéndose determinar el descenso de la presión en el transcurso del mismo por ser de magnitud no acusable en el manómetro de la bomba.

ENSAYO N° 1

$\Delta t$  reducción catalizador = 22'  
 $\Delta t$  reducción clorotetraciclina = 45'  
 Peso tetraciclina base = 0.2744 g  
 Rendimiento base = 54.9 %  
 Rendimiento clorhidrato = 59.5 %

ENSAYO N° 2

$\Delta t$  reducción catalizador = 20'  
 $\Delta t$  reducción clorotetraciclina = 30'  
 Peso tetraciclina base = 0.2662 g  
 Rendimiento clorhidrato = 57.49 %  
 Rendimiento base = 58.2 %

ENSAYO N° 3

$\Delta t$  reducción catalizador = 30'  
 $\Delta t$  reducción clorotetraciclina = 20'  
 Peso tetraciclina base = 0.260 g  
 Rendimiento base = 52.0 %  
 Rendimiento clorhidrato = 58.2 %

ENSAYO N° 4

$\Delta t$  reducción catalizador = 30'

$\Delta t$  reducción clorotetraciclina = 30'

Peso base tetraciclina = 0.295 g

Rendimiento base = 59.0 %

## METODO DE HIDROGENACION

### a) DISOLUCION Y AGREGADO DEL CATALIZADOR

Se pesa la sustancia y se disuelve en el erlenmeyer con el solvente elegido; se agregan base fijadora, el catalizador y la barra imantada que servirá de agitador. Se cierra perfectamente, para lo cual se engrasan las llaves y uniones esmeriladas.

### b) EVACUACION

Con la llave de 5 vías, conectada a la trompa de vacío se evacúa el sistema durante 5 minutos.

### c) ALIMENTACION DE HIDROGENO

Se admite luego  $H_2$  por la otra entrada de la misma llave, desde una bomba intermedia al almacenaje que está a unas 45 lb/□" de presión y que se alimenta desde un tubo de  $H_2$  comprimido, hasta que el nivel del mercurio baje razonablemente. Se repite la evacuación, y carga dos veces más, y luego se hace la carga de  $H_2$  definitiva, hasta una lectura en el tubo graduado de mercurio, de acuerdo con lo que se calcula será absorbido durante la hidrogenación por la cantidad de sustancia pesada. Se igualan niveles de los tubos en U con la pera y se lee y anota el valor en la rama graduada ancha. Se fija la altura de la pera de manera de producir una pequeña sobrepresión sobre la solución, a fin de facilitar la absorción del  $H_2$ .

### d) AGITACION E HIDROGENACION

Se pone en marcha el agitador magnético dándose por iniciado así el proceso; cada uno un tiempo dado, se hacen lecturas del nivel de  $H_2$ , previa igualación de niveles con la pera. El ensayo se da por finalizado después de constancia de 3 lecturas, lo que indica que la absorción ha finalizado.

Se construye la curva a partir de los valores de los ml de  $H_2$  absorbidos en función del tiempo.

### e) FILTRACION

Se filtra la solución por capa de ayuda filtrante (Celite) para separar el catalizador; se lava la torta con el mismo solvente, hasta que no arrastre mas color (amarillo).

### f) CRISTALIZACION

A la solución se le agregan 5 volúmenes de agua destilada, se ajusta el pH a 4.5 con  $CH_3CO_2Na$  al 10 % y se rascan las paredes con una varilla y agitan-

do, hasta que comienza a enturbiarse; se deja luego agitando unas 5 horas en frío para favorecer la cristalización.

g) FILTRACION Y SECADO DE LOS CRISTALES

Después se filtran por trompa de vacío sobre papel, se lavan con pequeñas porciones de agua destilada y se secan en desecador al vacío sobre O<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.

Se pesan y calculan rendimientos.

Quedan así los cristales listos para determinar sus constantes y para los ensayos de pureza y actividad.

Pueden también ser recristalizados para mejorar su pureza.



## DESCRIPCION DE LOS APARATOS

### APARATO CHICO DE VIDRIO (Fig. pág. 51)

Consta de un vaso de reacción de unos 10 cc. de capacidad con una llave de ventilación en la parte superior y lateral y está unido por un tubo de vidrio a otro tubo en U con rama abierta, que contiene mercurio. La rama comunicada al vaso de reacción está graduada de 0 a 7 ml y en la parte inferior de la U se conecta mediante un tubo de goma con la ampolla que contiene el mercurio y que regula la altura del mismo en las ramas.

Mediante una llave de 3 vías se puede comunicar el vaso con el tubo en U o con la alimentación de hidrógeno, la que se efectúa con manguera de goma para vacío desde una bomba intermedia al tubo de  $H_2$ , para reducir la presión excesiva del mismo. También por la línea de alimentación, se conecta la trompa de vacío para la evacuación previa del aire.

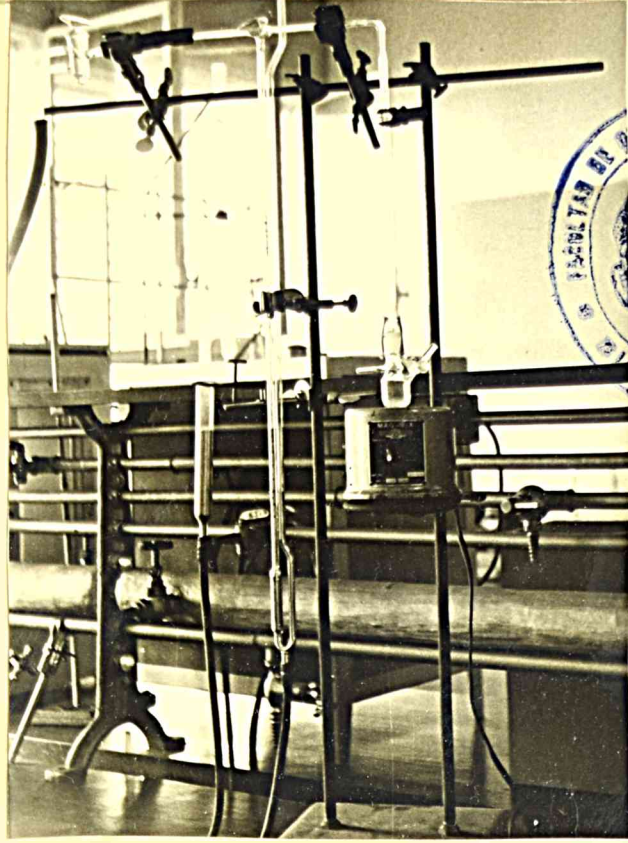
La agitación se efectúa mediante un agitador magnético eléctrico o de aire comprimido, habiéndose encontrado una dificultad en el uso de aquél, ya que se eleva algo la temperatura en el vaso de reacción. El agitador consiste en una barrita de imán encamisada con un tubo de vidrio cerrado en los extremos.

En este aparato se efectuaron todas las hidrogenaciones previas.

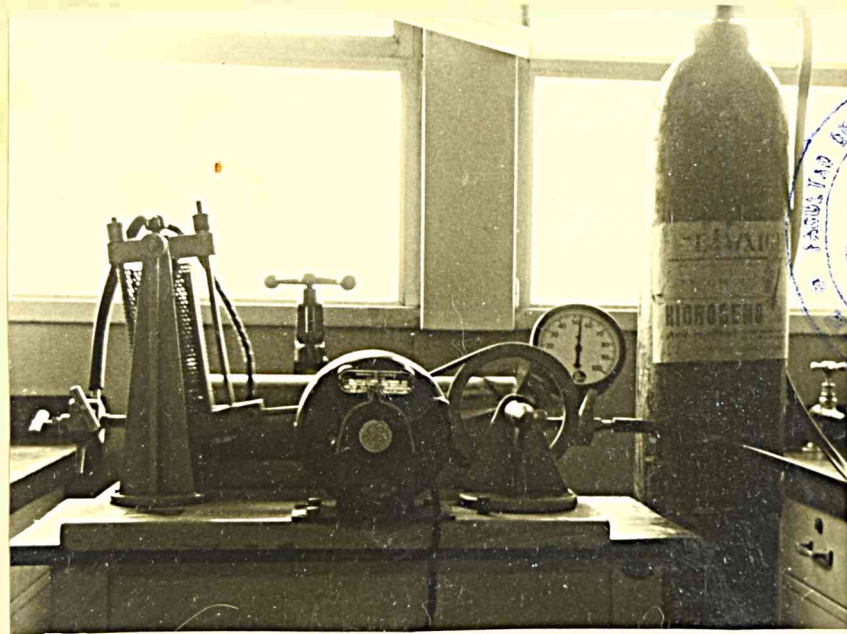
### APARATO GRANDE DE VIDRIO (Fig. pág. 51)

Se compone de los mismos elementos que el aparato chico, pero de mayor capacidad (125 ml de capacidad del vaso de reacción). Además de trabajar con columna de mercurio, puede hacerlo con agua, pero sólo fué utilizada aquella en todos los trabajos. La graduación de la rama de la U es de 0 a 50 ml. En este aparato se efectuaron todas las hidrogenaciones de confirmación.

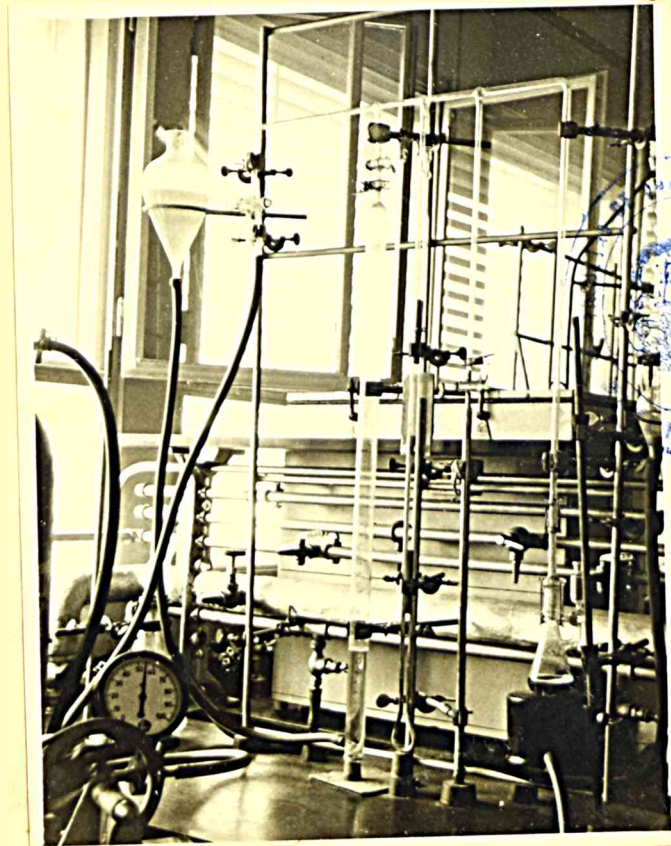
APARATO CHICO VIDRIO



BOMBA PARR



APARATO GRANDE VIDRIO



ANÁLISIS DE LA TETRACICLINA CRISTALIZADA OBTENIDA

La tetraciclina base cristalizada obtenida en la serie de ensayos confirmatorios en la escala mayor de sustancia hidrogenada, (N° 54-58) fué sometida a una serie de análisis para confrontar con los análisis de una tetraciclina pura standard para el referido antibiótico. Cada muestra analizada proviene de la mezcla de las bases cristalizadas hidrogenadas bajo las mismas condiciones operatorias y en el mismo solvente.

Los métodos aplicados serán detallados al final del capítulo en la parte correspondiente.

Se denominará: MUESTRA N° 1 a la obtenida por hidrogenación de clorhidrato de clorotetraciclina disuelto en metilcellosolve con catalizador de Pd/C, con triet/<sup>anol</sup>amina como base.

MUESTRA N° 2 es la obtenida en las mismas condiciones que la N° 1, pero con metanol como solvente.

MUESTRA N° 3 es la obtenida en las mismas condiciones que la N° 1, pero con etanol como solvente.

MUESTRA N° 4 es la obtenida por hidrogenación de clorhidrato de clorotetraciclina disuelto en metilcellosolve con catalizador de Pt al 5 % sobre  $Al_2O_3$ , con triet/<sup>anol</sup>amina como base.

MUESTRA N° 5 es la obtenida en las mismas condiciones que la N° 4, pero usando metanol como solvente.

Observando los límites del análisis estándar se encuentra que las muestras N° 1 y 4 tienen humedad un poco superior al estipulado que es 5 % (6.25 % y 5.62 %) respectivamente), siendo su valor algo relativo ya que las muestras fueron secadas simplemente en desecadores al vacío sobre CaK y a temperatura ambiente durante 15 hrs. La extinción está dentro de rango en la N° 5, siendo cercanas las restantes al límite inferior. La potencia está dentro de límites, salvo la turbidimétrica en la N° 5 que es sorprendentemente inferior, aún cuando la potencia por ferricianuro es la notablemente más alta de todas.

Resumiendo se encuentra que, de acuerdo a estos datos del análisis y a los rendimientos y condiciones operativas de la hidrogenación, la tetraciclina base cristalizada producida a partir de clorhidrato de clorotetraciclina disuelta en metanol y con catalizador de Pt al 5 % sobre  $Al_2O_3$  como soporte, es la que reúne las condiciones mejores de pureza y actividad biológica y quí-

nica compa rativamente a las restantes.

LOTES ANALIZADOS	1	2	3	4	5	LIMITES
Humedad %	6.23	3.98	3.97	5.62	2.83	< 20
Extinción	382	378	384	384	391	381 - 417
Potencia turbidimétrica mc g / mg	997	1039	1025	1000	958	> 930
Potencia ferricianuro mc g / mg	1029	972	993	1006	1091	> 930

G - CONCLUSIONES

En la TABLA II de la pág. 56 se detallan las condiciones y resultados de los trabajos de confirmación de las hidrogenaciones, empleando mayor cantidad de clorotetraciclina y catalizador, que en las preliminares.

Se observe que la hidrogenación con precatalizador  $\text{Cl}_2\text{Pd/C}$  da mejores rendimientos con metilcellosolve (80.2 %), siguiéndole con etanol (79.2) y metanol (75.7), siendo también más completa la reducción de clorotetraciclina en el primer caso.

Se confirman también las hidrogenaciones con catalizador de Pt al 5%/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  con metilcellosolve y metanol.

Los tiempos de estas experiencias fueron menores que con  $\text{Cl}_2\text{Pd/C}$  y los rendimientos de 80.5 % y 81.1 % respectivamente.

La calidad de la tetraciclina obtenida fué superior a las anteriores, ya que la reducción fué completa en todos los trabajos.

Los cristales de tetraciclina provenientes de la hidrogenación con  $\text{Pt/Al}_2\text{O}_3$  - Metanol cumplieron con todas las especificaciones de análisis, según se indica en la pág.

De esto se deduce que las mejores condiciones de hidrogenación catalítica de clorotetraciclina, se obtuvieron usando catalizador de  $\text{Pt/Al}_2\text{O}_3$  sobre una solución de clorotetraciclina en metanol anhidro, en presencia de trietanolamina, y efectuando la reducción a presión y temperatura ambiente.



III.- T A B L A S

D E

R E S U L T A D O S

HIDROGENACION DE CLOROTETRACICLINA

TABLE IX

Apparato de vidrio pequeño

Sustancia hidrogenada: < 100 mg

Catalizador = 30 mg

Presión = atmosférica

Temperatura: ambiente

Trietilamina = 0.05 ml

Catalizador	Nº de ensayo	Reducción Catalizada. Tiempo	Solvente	H <sub>2</sub> absorbido (ml)		Tiempo (min.)	Peso Base (g)	Color Base	Rendimiento		% Cromatografía		Punto Fusión °C	Actividad biológica %/ml	Observaciones
				Práctico	Teórico				Base	Clorh.	Stetrac.	%clorot.			
Pd/C	1	-	Metilcellosolve	4.48	4.15	25'	-	amar. pálido	-	-	100	-	174° desc.	-	No se calculan rendimientos
"	2	-	"	4.71	4.32	32'	-	"	-	-	100	-	173°	-	
"	3	-	4-Dioxano+1 Metanol	5.79	4.22	24'	-	amarillo	-	-	100	-	173°	-	
"	4	-	"	5.79	3.88	26'	-	"	-	-	100	-	172°	-	
Cl <sub>2</sub> P/C	7	25'	Metilcellosolve	3.77	4.24	60'	0.0553	amar. limón	60.0	84.8	100	-	173°	450	
"	8	25'	"	3.78	4.00	32'	0.070	" pálido	80.4	86.8	100	-	173°	460	
"	9	35'	Metanol	2.54	4.45	113'	0.052	" "	54.0	58.4	95	5	189°	430	
"	10	35'	"	2.88	4.27	80'	0.0582	" limón	62.8	67.6	94	6	174°	460	
"	11	20'	Etanol	3.88	4.32	87'	0.0681	" claro	72.5	77.9	95	5	176°	430	
"	12	27'	"	3.57	4.29	110'	0.0698	" marfil	74.7	80.7	94	6	171°	415	
"	13	30'	Butanol	0.92	4.30	65'	0.045	" arena	45.9	49.6	95	5	170°	-	
"	14	37'	"	0.53	4.20	103'	-	-	-	-	-	-	-	-	No cristaliza
"	15	35'	Cellosolve	3.85	4.27	70'	0.0676	amar. arena	72.8	78.4	96	4	167°	475	
"	16	30'	Agua	-	-	65'	0.0219	gris negruzco	23.5	25.3	-	-	-	-	No se efect. determin.
"	17	25'	"	3.76	4.27	105'	0.039	verde oscuro	42.7	46.1	94	6	-	-	
"	18	38'	Dioxano	2.7	4.27	65'	-	-	-	-	-	-	-	-	ppdo. amorfo rojizo
"	19	71'	"	1.33	4.27	100'	-	-	-	-	-	-	-	-	
"	20	30'	Isopropanol	0.5	4.27	46'	0.0381	marfil	40.96	44.2	97	3	189°	-	
"	21	40'	Butanol saturado	2.73	4.27	105'	0.029	amar. naranja	31.5	34.0	81	19	179°	-	3in trietilamina
"	22	45'	" anhidro	1.12	4.27	115'	0.0254	arena	27.5	29.5	-	-	180°	-	
"	23	40'	Agua	4.0	4.27	95'	0.0613	amar. verdoso	65.9	71.2	91	9	161°	430	
"	24	40'	Cellosolve	1.16	4.27	50'	-	-	-	-	-	-	-	-	
"	25	37'	"	1.04	4.27	45'	-	-	-	-	-	-	-	-	
"	26	34'	Metanol	1.44	4.27	80'	-	-	-	-	-	-	-	-	
"	27	34'	Etanol	1.12	4.27	100'	-	-	-	-	-	-	-	-	
"	28	34'	Metilcellosolve	1.15	4.27	95'	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	29	-	"	4.09	4.15	55'	0.0775	amar. arena	93.3	90.0	95	5	163° desc.	460	Con trietilamina
"	30	-	"	4.37	4.27	56'	0.0553	" pálido	59.5	64.3	100	-	171°	-	"
"	31	-	Metanol	3.48	4.24	37'	0.0618	" limón	66.5	71.8	95	5	163°	460	"
NiRaney	32	-	Metilcellosolve	0.68	4.52	41'	0.0336	amarillo	33.6	36.3	-	100	-	-	No hidrogenó
(OH) <sub>2</sub> Pd/SO <sub>4</sub>	33	-	"	3.80	4.52	63'	0.0206	"	20.6	23.9	-	-	-	-	

TABLA II

HIDROGENACION DE CLOROTETRACICLINA

Aparato de vidrio mediano  
 Presión = atmosférica  
 Temperatura ambiente

Clorotetraciclina hidrogenada = 500 mg  
 Catalizador = 150 mg  
 Trietilamina = 0.25 ml

Catalizador	Nº de ensayo	Reducción catalizad. Tiempo	Solvente	H <sub>2</sub> absorbido(ml)		Tiempo (min)	Peso Base (g)	Color	Rendimiento %		%Cromatografía		Punto de Fusión °C	Actividad biológica %/ml	Observaciones	
				Práctico	Teórico				Base	Clorh.	%tetrac.	%clorot.				
Cl <sub>2</sub> Pd/C	34	20'	Metilcellosolve	25.0	22.96	98'	0.3588	amar.marfil	71.7	77.5	100	2	171 <sup>5</sup> desc.	470		
	"	35	"	21.1	"	80'	0.4037	" "	80.7	87.1	99	1	171 <sup>5</sup> "	440		
	"	36	40'	"	24.9	"	55'	0.3550	" "	71.0	76.7	99	1	171 <sup>5</sup> "	510	
	"	37	38'	"	22.9	"	65'	0.3716	" pálido	74.3	80.3	99	1	172 <sup>5</sup> "	490	
	"	38	31'	"	22.2	"	55'	0.3681	" "	75.6	79.5	99	1	170 <sup>5</sup> "	490	
	"	39	60'	Metanol	22.3	"	65'	0.3303	" "	68.1	71.4	96	4	173 <sup>5</sup> "	500	
	"	40	50'	"	23.5	"	60'	0.3402	" "	68.0	73.4	97.5	2.5	172 <sup>5</sup> "	460	
	"	41	52'	"	21.1	"	75'	0.3770	" "	75.4	81.4	100	-	171 <sup>5</sup> "	530	
	"	42	52'	"	24.8	"	85'	0.3632	" limón	72.6	78.4	90	10	170 <sup>5</sup> "	510	
	"	43	50'	"	19.2	"	60'	0.3424	" pálido	68.5	74.0	91	9	171 <sup>5</sup> "	580	
	"	44	50'	Etanol	21.0	"	100'	0.3677	" "	73.5	79.4	95	7	172 <sup>5</sup> "	440	
	"	45	55'	"	22.7	"	75'	0.3416	" "	68.3	73.8	>96	<4	171 <sup>5</sup> "	480	
	"	46	60'	"	23.0	"	80'	0.3652	" "	73.0	78.8	>96	<4	172 <sup>5</sup> "	500	
	"	47	55'	"	20.1	"	75'	0.3758	" "	75.2	81.2	100	-	171 <sup>5</sup> "	560	
	"	48	53'	"	23.7	"	75'	0.3828	" "	76.6	82.7	100	0	171 <sup>5</sup> "	600	
	Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	49	-	Metilcellosolve	22.1	"	60'	0.3949	" arena	79.0	85.3	99	1	172 <sup>5</sup> "	470	
		"	50	"	21.8	"	55'	0.3736	" "	74.7	80.7	100	-	173 <sup>5</sup> "	470	
		"	51	"	21.0	"	50'	0.3766	" "	75.7	81.7	100	-	174 <sup>5</sup> "	480	
"		52	"	22.0	"	60'	0.3421	" "	68.4	73.9	100	0	173 <sup>5</sup> "	520		
"		53	"	23.2	"	55'	0.3750	" "	75.0	81.0	100	-	172 <sup>5</sup> "	500		
"		54	"	Metanol	21.4	"	65'	0.3755	" pálido	75.1	81.1	100	-	175 <sup>5</sup> "	600	
"		55	"	"	21.5	"	65'	0.3808	" "	76.1	82.2	100	-	174 <sup>5</sup> "	600	
"		56	"	"	20.7	"	70'	0.3762	" "	75.2	81.2	100	-	174 <sup>5</sup> "	600	
"		57	"	"	21.0	"	55'	0.3750	" "	75.0	81.0	100	0	174 <sup>5</sup> "	560	
"		58	"	"	22.2	"	45'	0.3715	" "	74.3	80.2	100	-	175 <sup>5</sup> "	580	

Repetic. = 88 %  
 " = 94%



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kirk - Othmer : *Encyclopedia of Chemical Technology* - vol. 15 - p. 772.
- 2.- Lloyd H. Conover : Patente USA N° 2.699.054 - 9. 10. 1953.
- 3.- E. R. Squibb & Sons - Patentes Argentinas:
  - N° 96.117 - 18. 1. 1955
  - N° 98.936 - 22. 9. 1955
  - N° 98.967 - 22. 9. 1955
- 4.- Boothe, J.H. et al : *Tetracycline*, *J. amer. chem. soc.* 75 : 4621, 1953.
- 5.- Horning, E.C.: *Organic syntheses, collective volume 3, Palladium chloride on carbon (5% Pd)* - p. 686-687.
- 6.- Houdry Process Corp., *British Patent 715.374*, 1954. *Chem. Abstr.* 49,3522 d. Preparación del catalizador Pt 5%/AlO<sub>3</sub> por impregnación.
- 7.- Horning, E.C.: *Organic Syntheses, collective volumen 3, Preparación catalizador NiRaney* - p. 181.
- 8.- Kuhn, Richard et al : *Braunes Palladiumoxyhydrat für katalytische Hydrierungen*, *Angevannte Chemie* 87 : 785, 1955.
- 9.- American Cyanamid Co. - *Fat. 100.445* - Mejoras en la producción de tetraciclina por hidrogenólisis de chlorotetraciclina.
- 10.- Gilman-Blatt, *Síntesis orgánica, tomo I* - p. 62, Reducción ácido maléico.
- 11.- Pack, F. C. et al : *Improved apparatus and methods for quantitative hydrogenation*, *J. amer. oil chem. soc.* 30 : 461-463, 1953.

IV.- CURVAS

ABSORCION H<sub>2</sub> / TIEMPO

Pd/C - Metilcelosolve

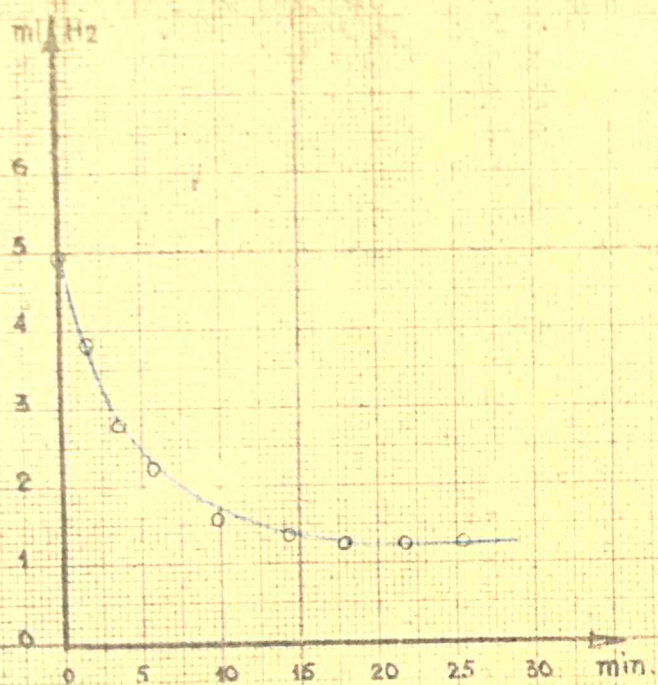


fig. 1

Cl<sub>2</sub>Pd/C - Metilcelosolve

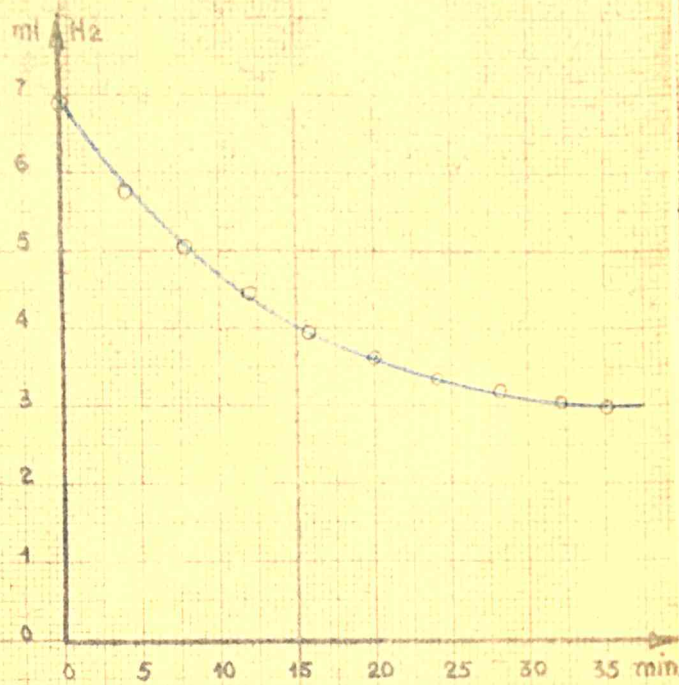


fig. 2

H<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>Pd/C - Metanol

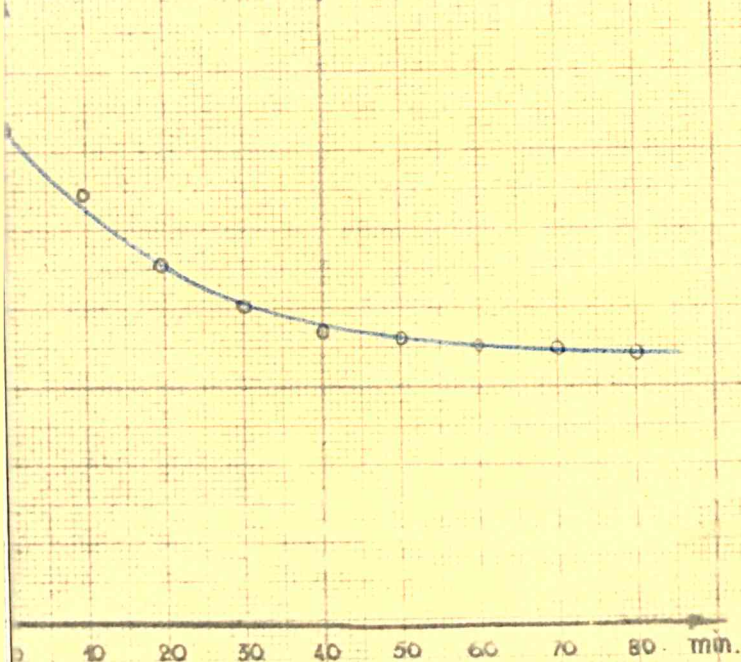


fig. 3

ml H<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>Pd/C - Butanol

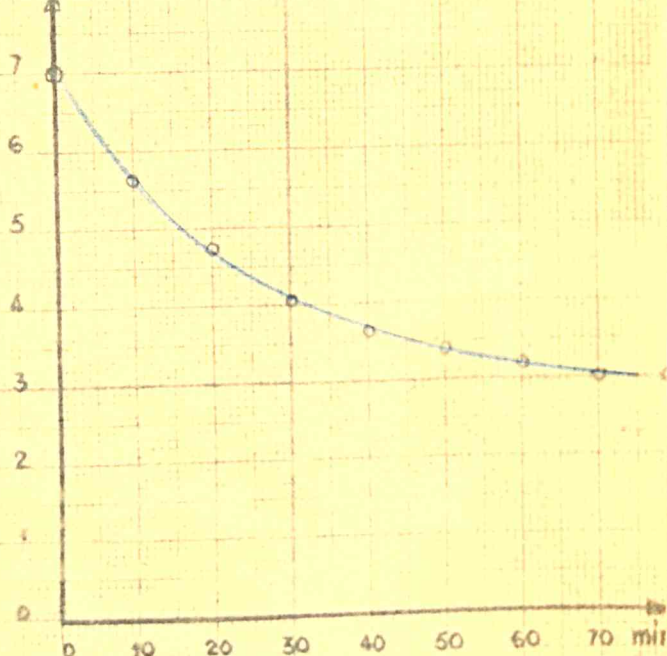


fig. 4



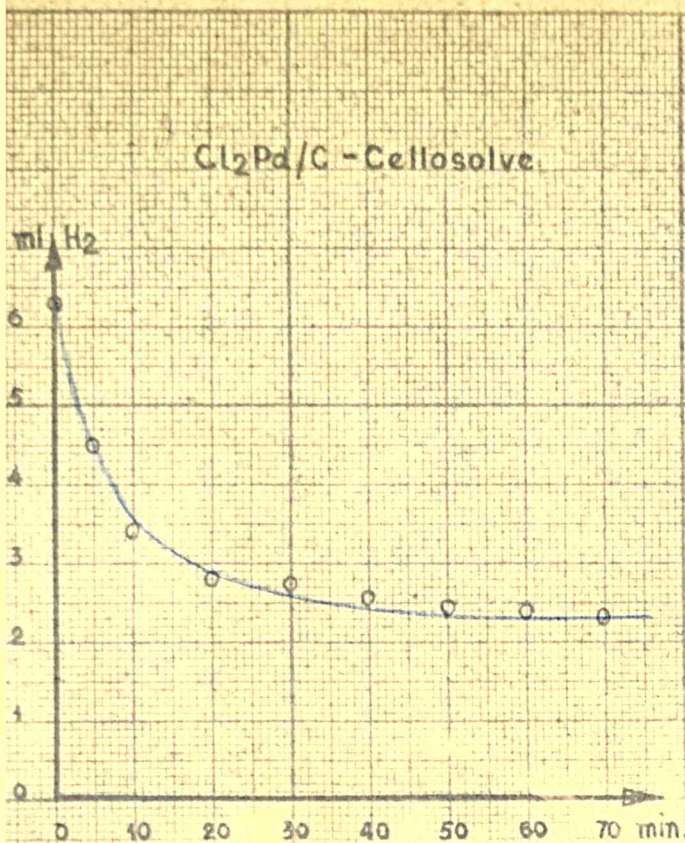


fig. 5

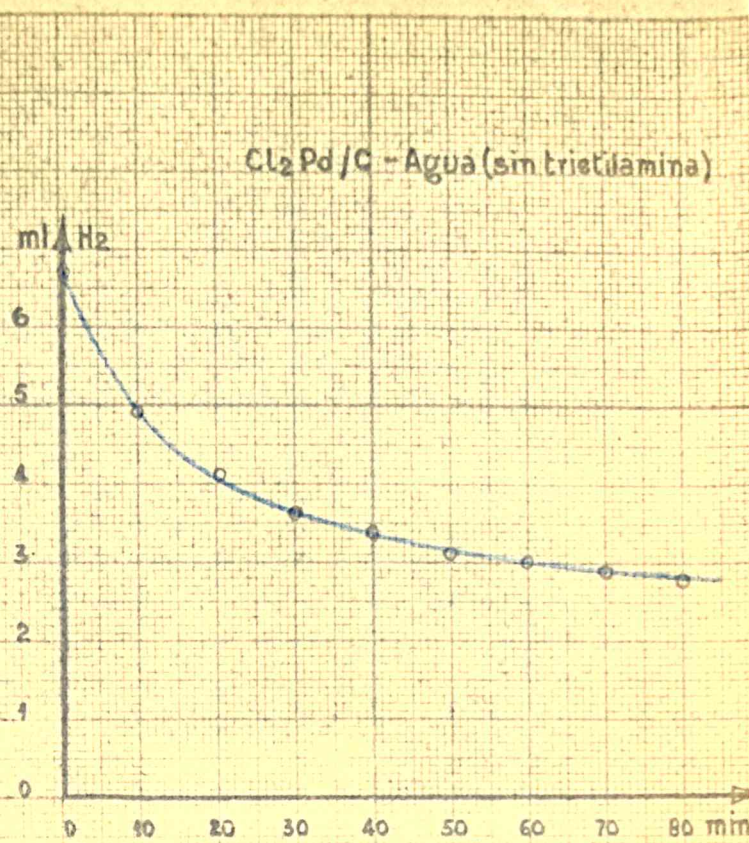


fig. 6

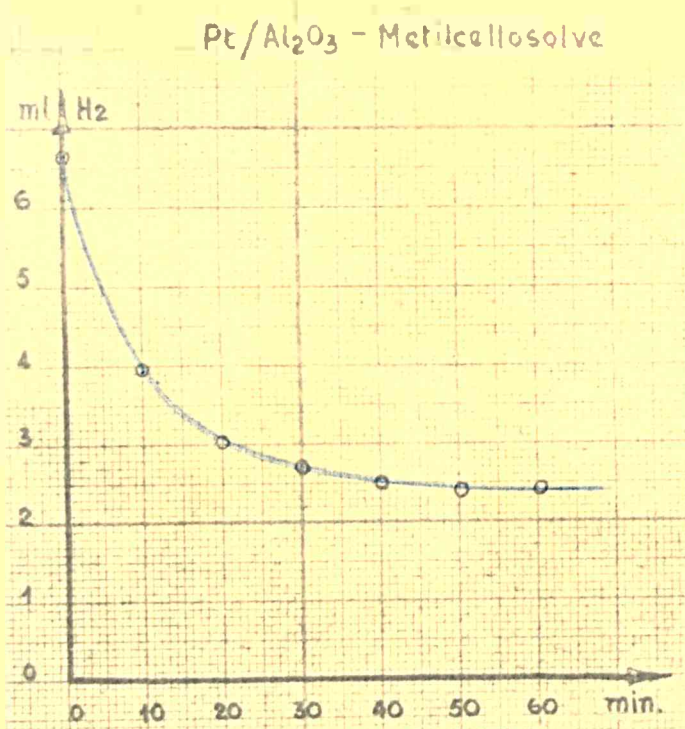


fig. 7

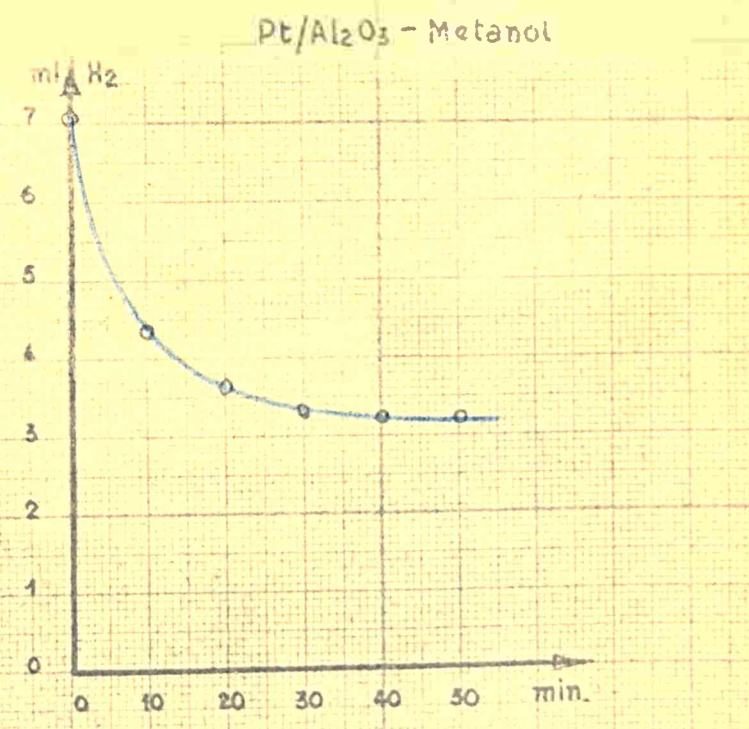


fig. 8



ENSAYOS CON  $\text{Cl}_2$  Pd/C - METILCELOSOLVE

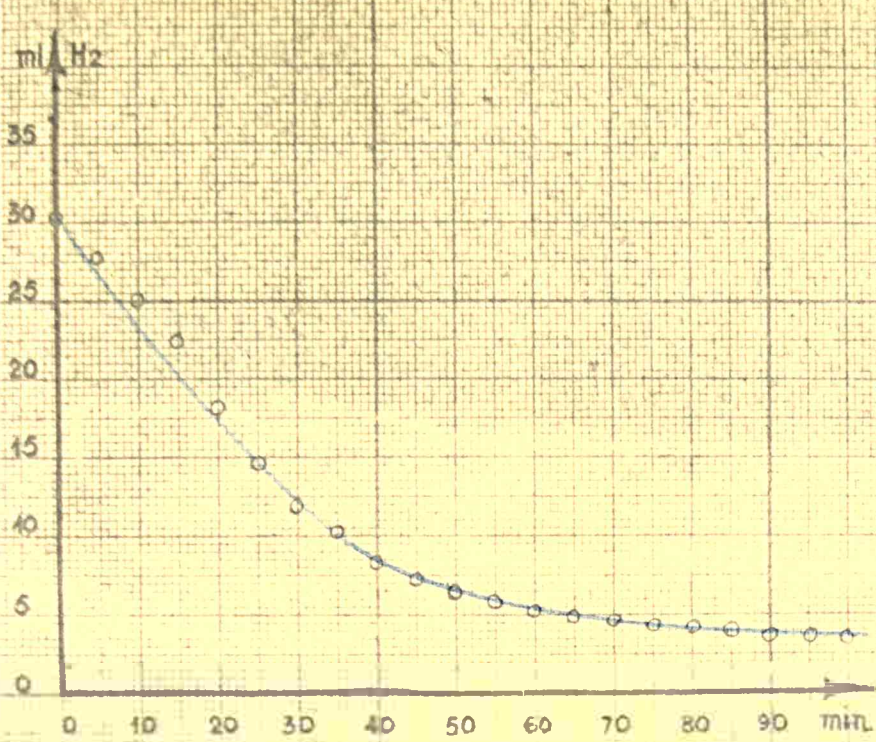


fig 9

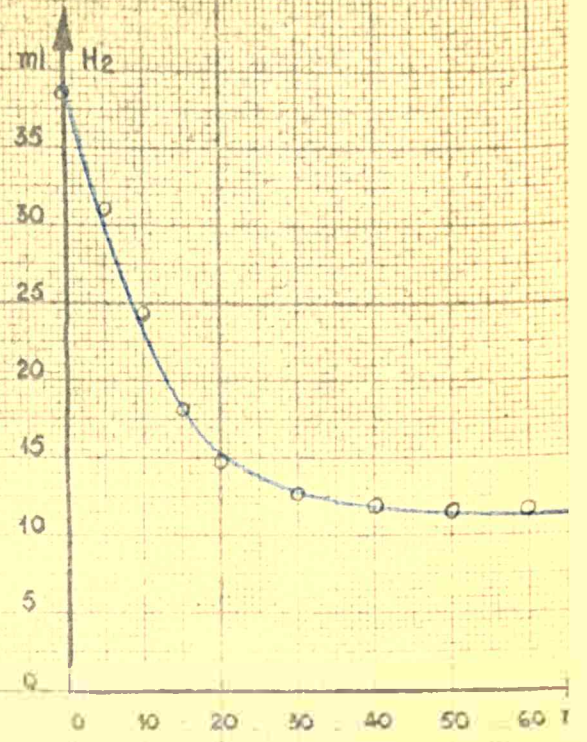


fig 10

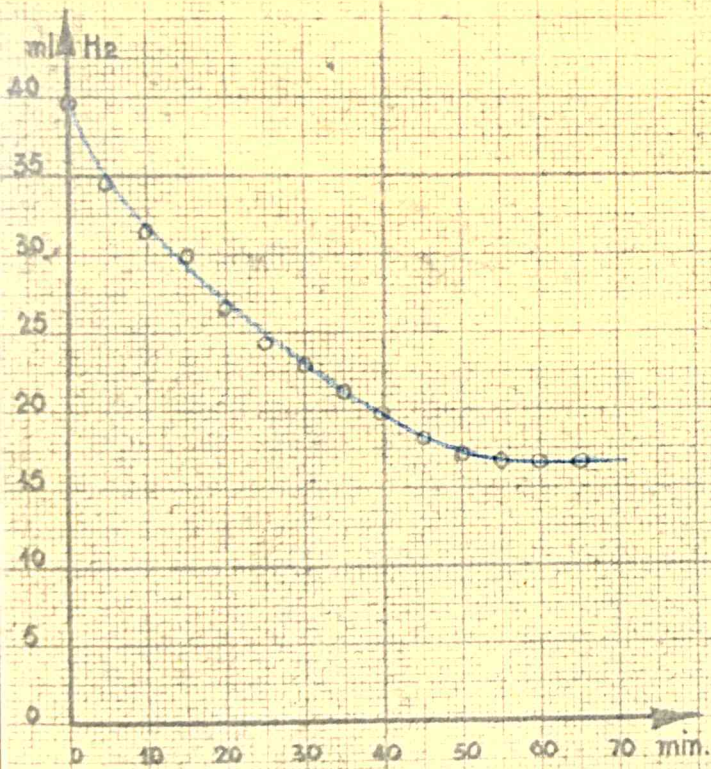


fig 11

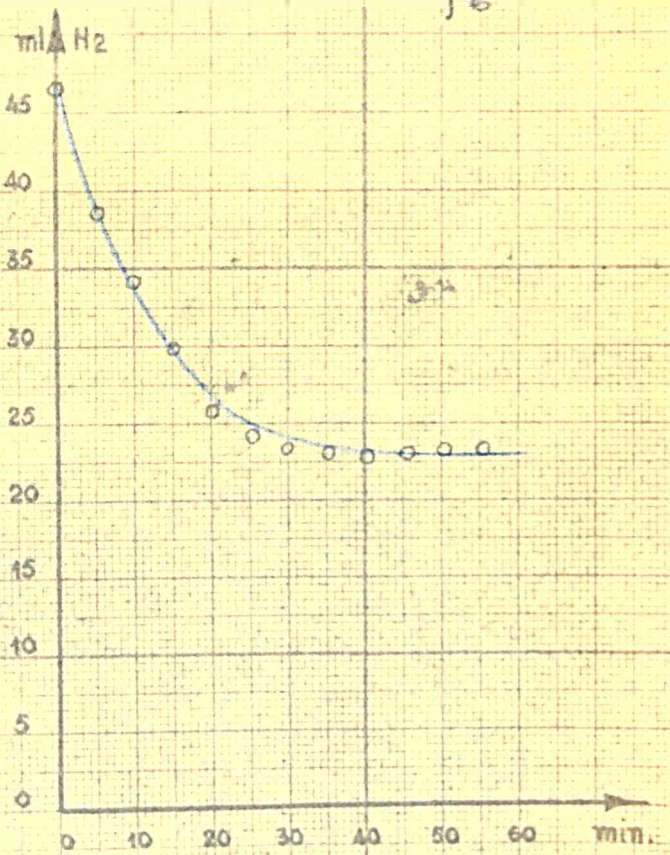


fig 12



ENSAYOS CON  $\text{Cl}_2\text{Pd/C}$  - METANOL

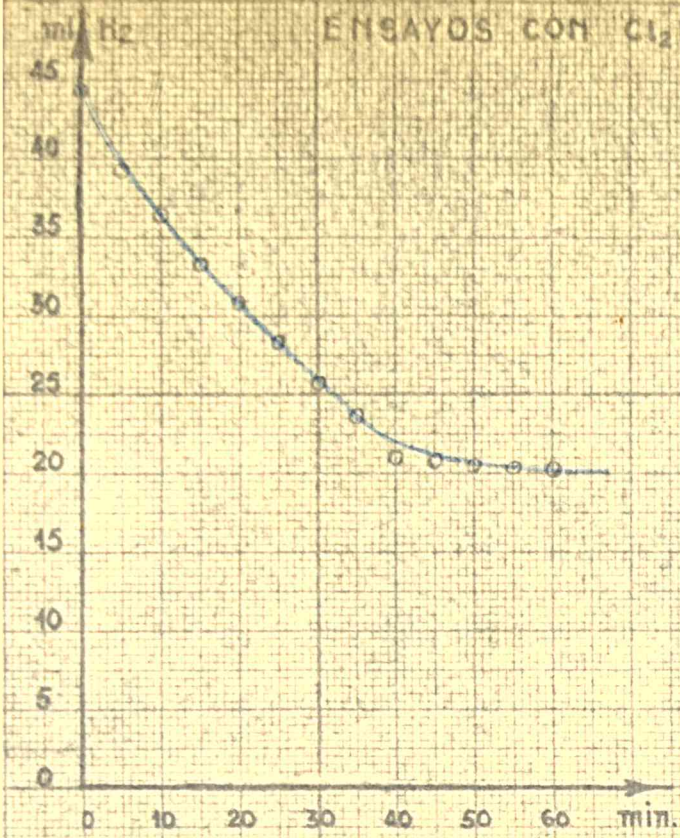


fig. 13

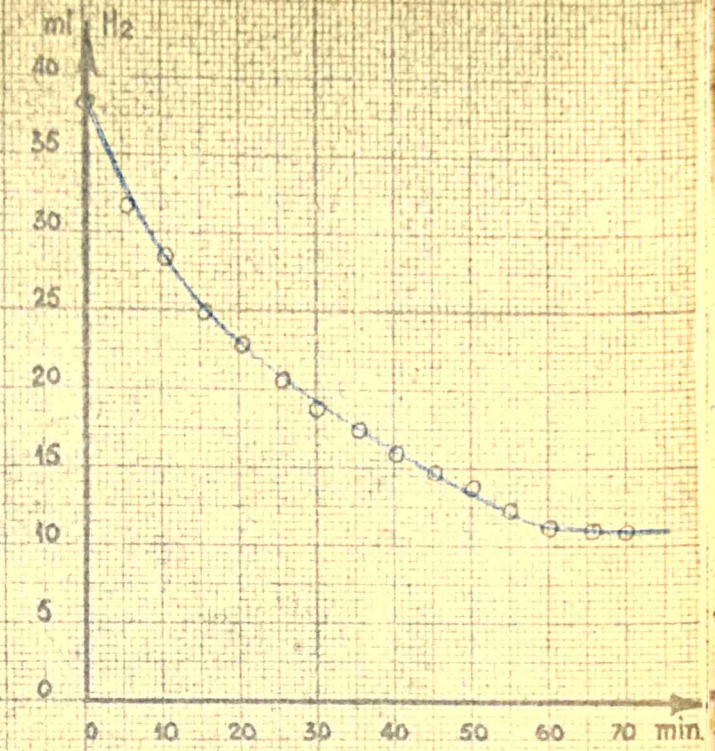


fig. 14

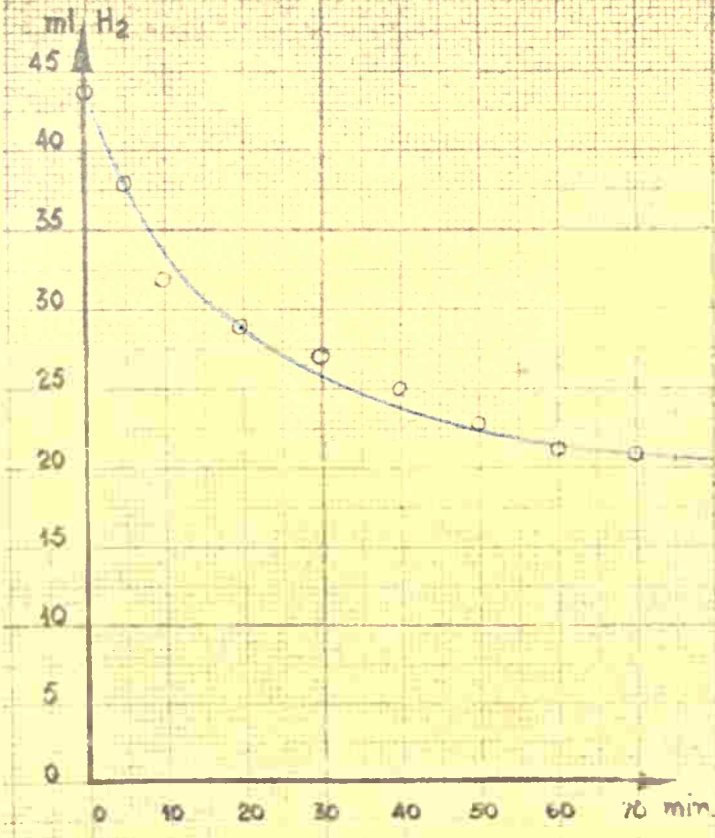


fig. 15

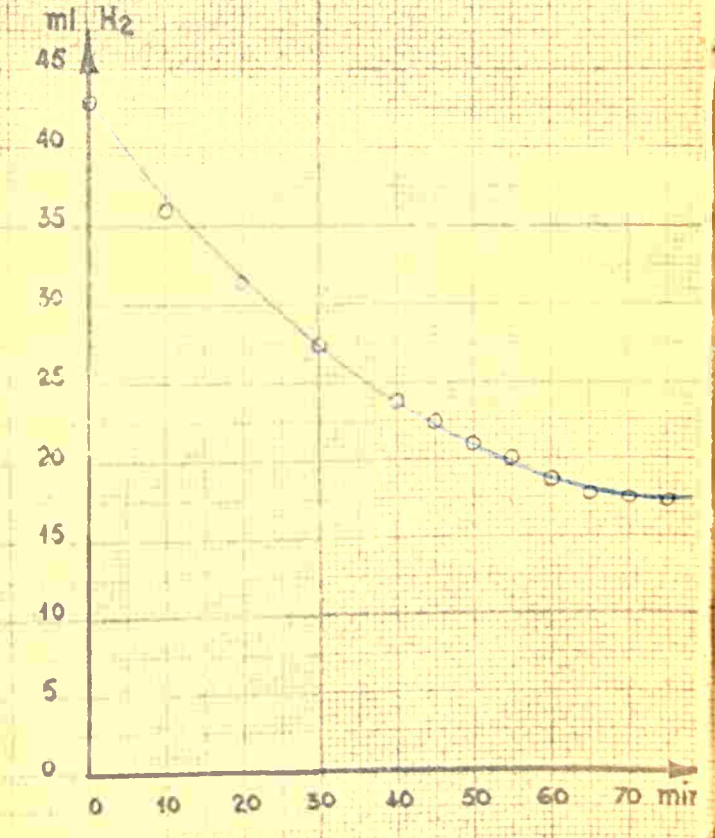


fig. 16



ENSAYOS CON  $\text{Cl}_2\text{Pd/C}$  - ETANOL

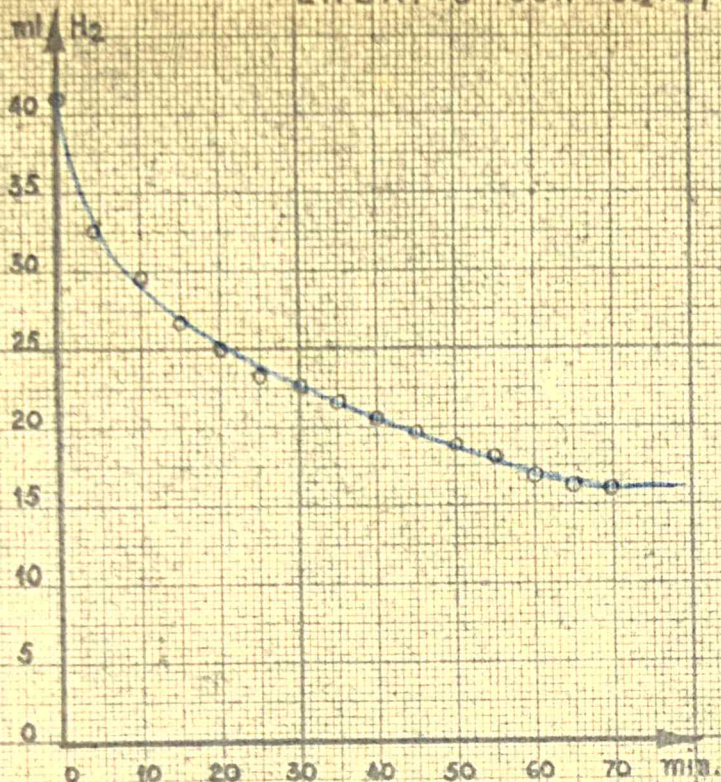


fig. 17

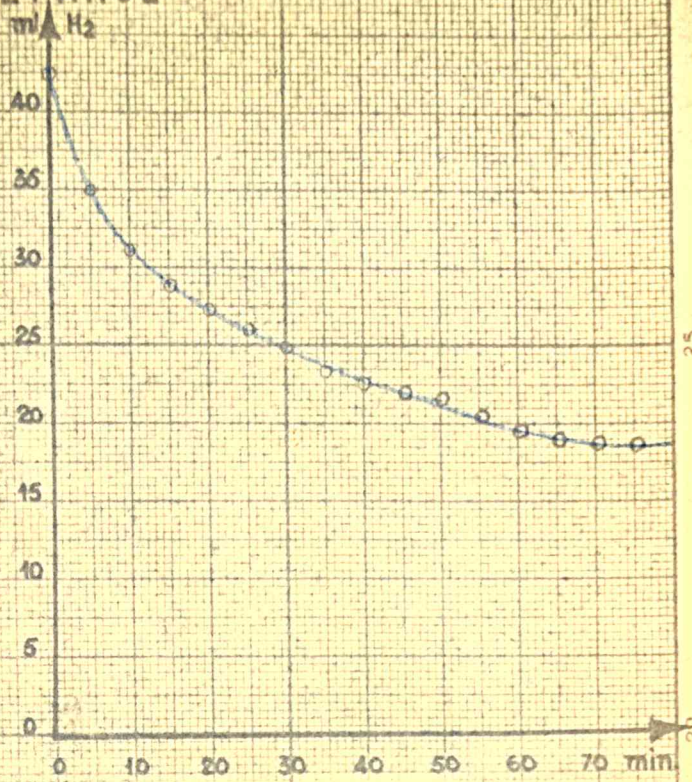


fig. 18

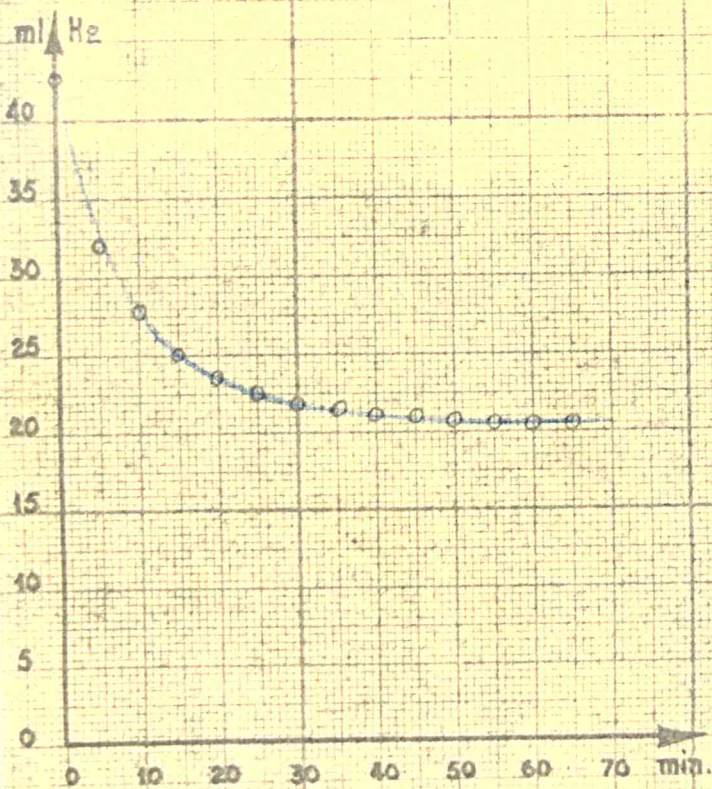


fig. 19

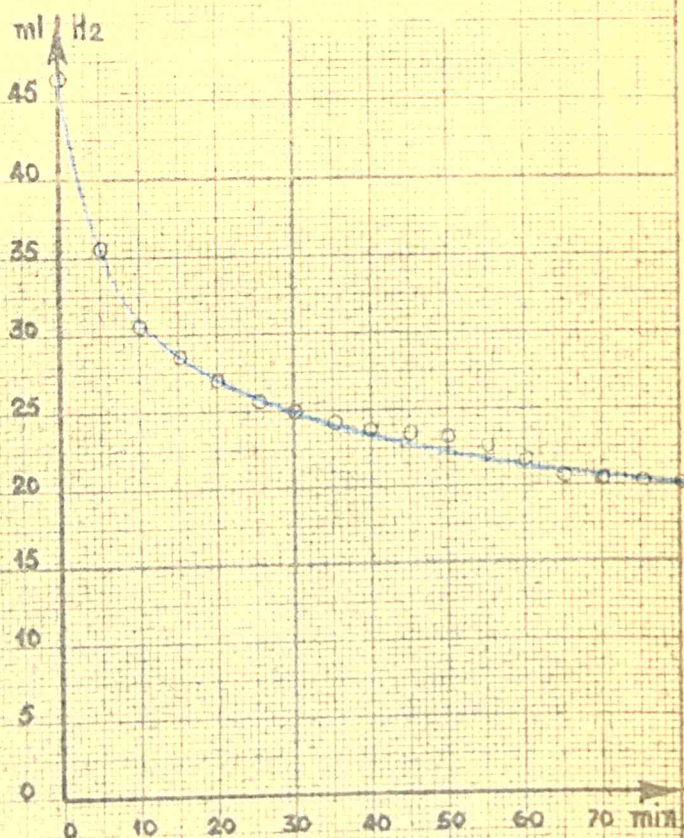


fig. 20



ENSAYOS CON Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - METILCELOSOLVE

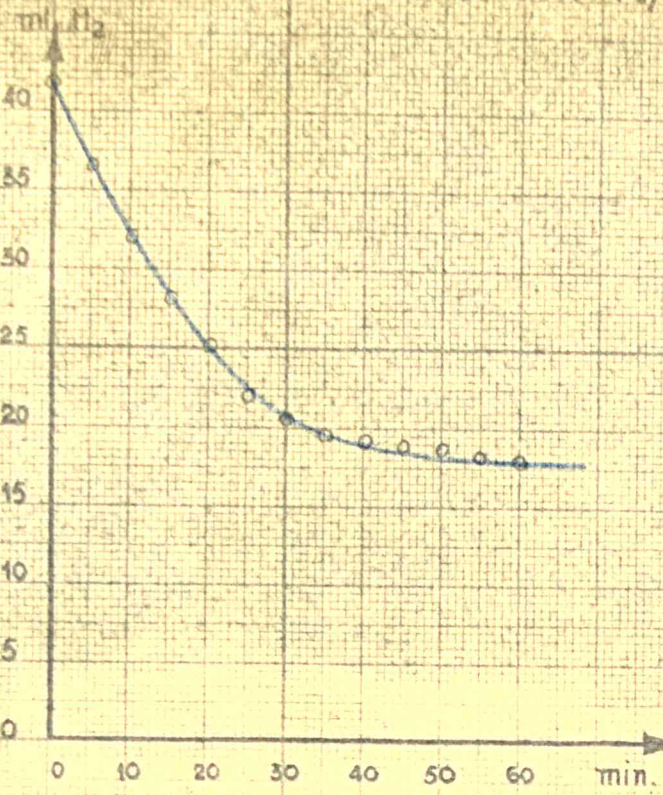


fig. 21

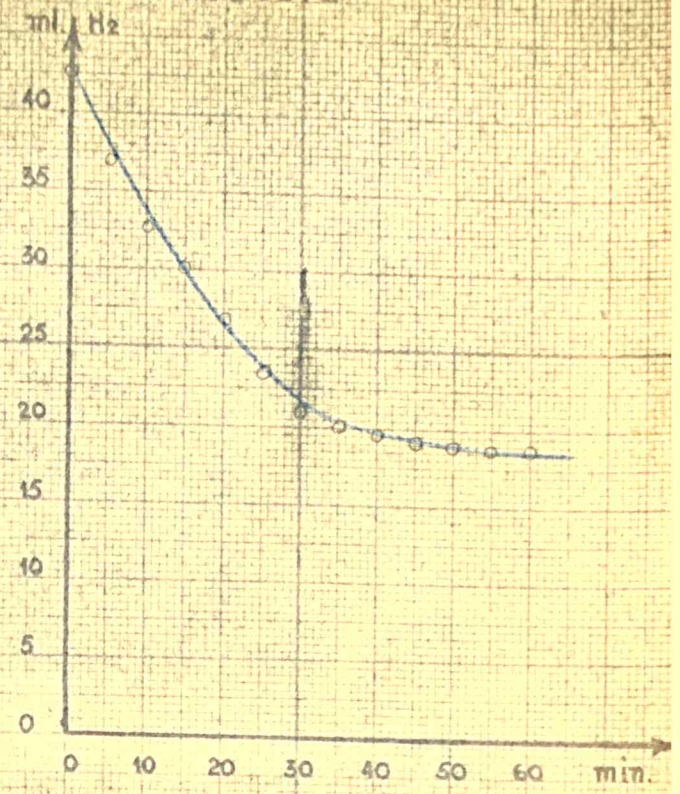


fig. 22

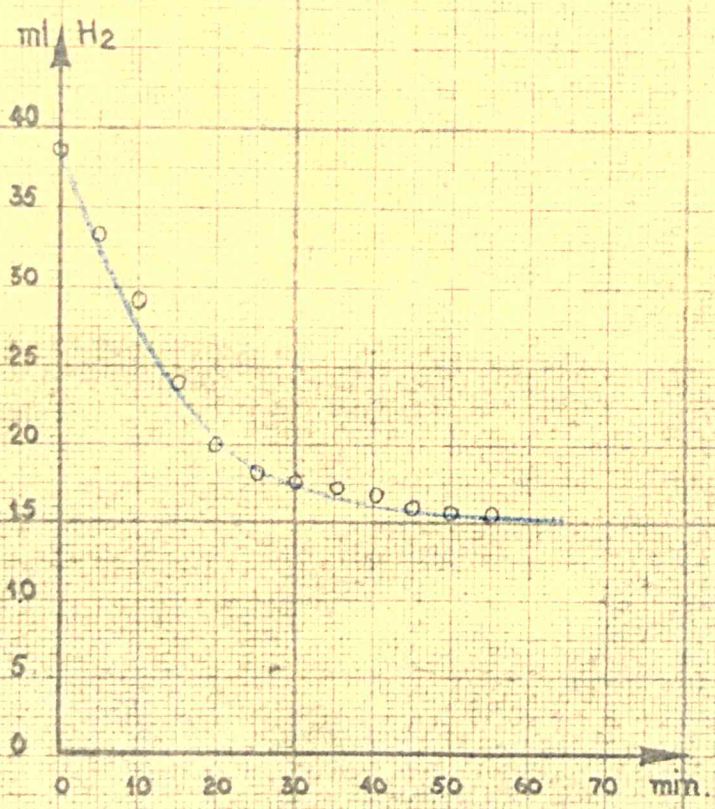


fig. 23

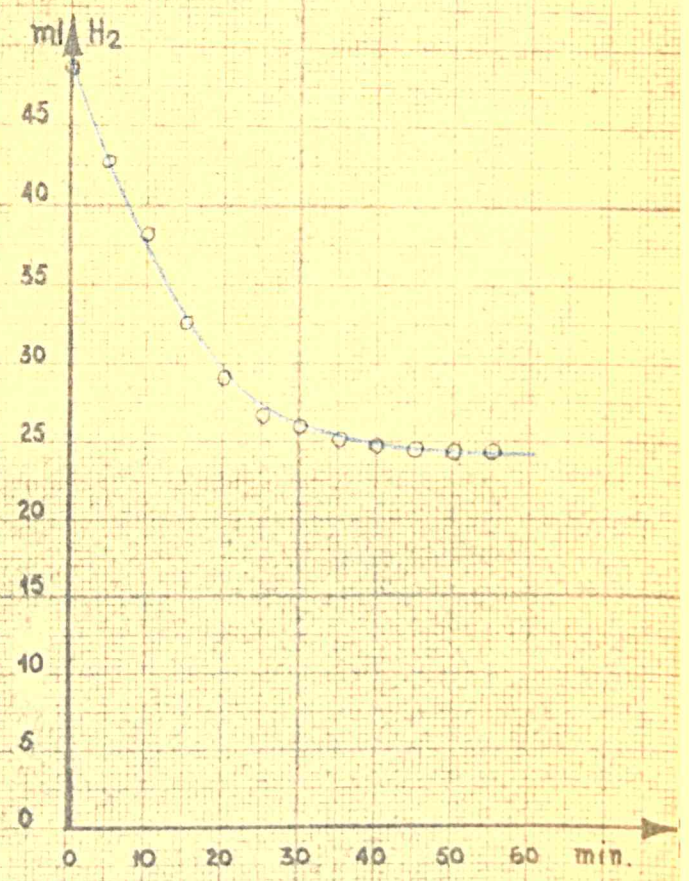


fig. 24





ENSAYOS CON  $Pt/Al_2O_3$  - METANOL

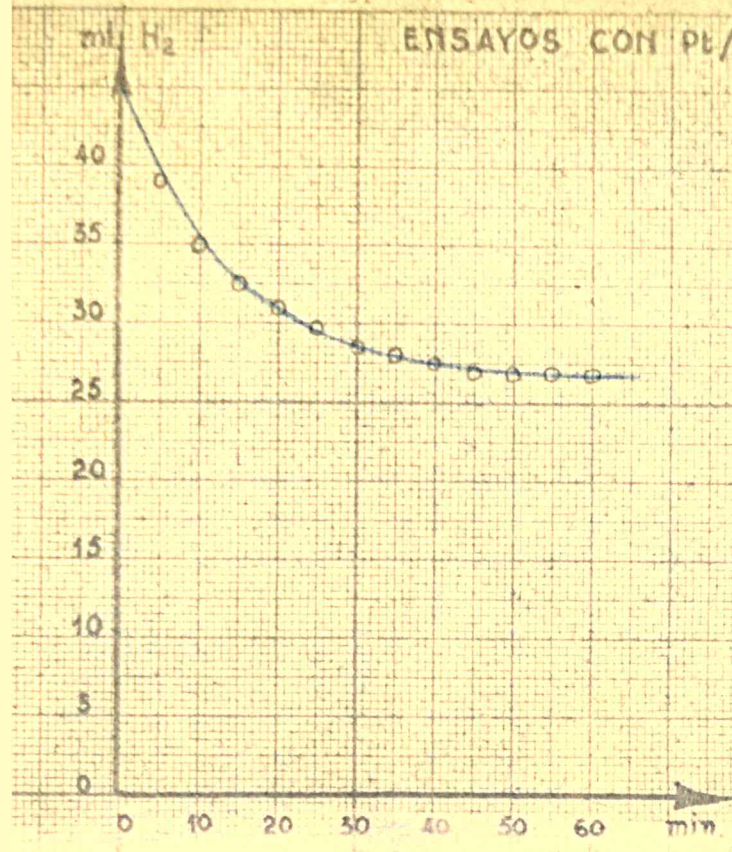


fig 25

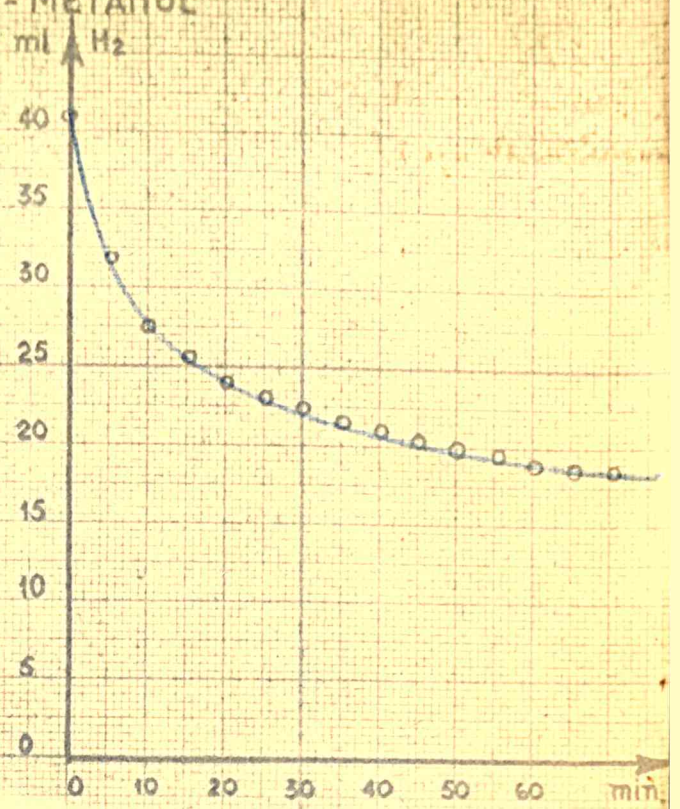


fig 26

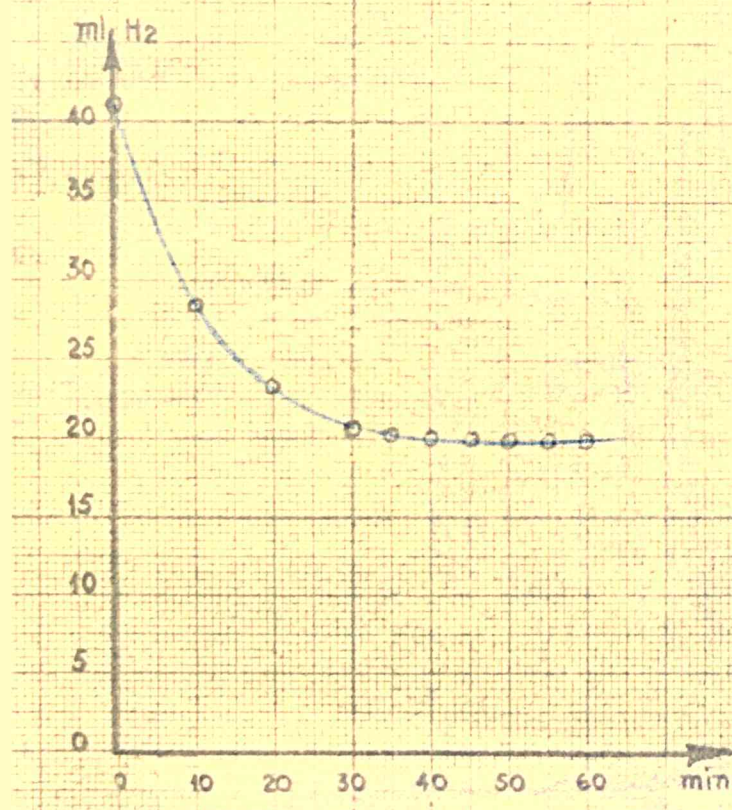


fig 27

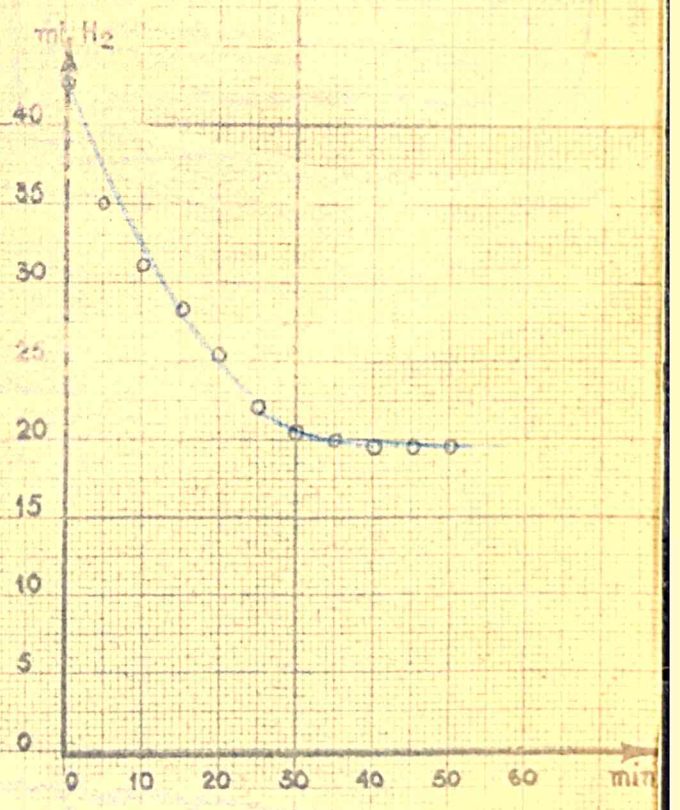


fig 28



V.- MÉTODOS DE ANÁLISIS Y CONTROL

DETERMINACION DE CLOROTETRACICLINA Y TETRACICLINAANALISIS CON PAPEL CROMATOGRAFICO (1)

La clorotetraciclina y la tetraciclina pueden determinarse cuantitativamente por medio de papel cromatográfico. El papel usado es Whatman Nº 1, el que se corta en tiras de 1 a 2 cm de ancho y unos 40 cm de largo y se embeben en buffer de fosfatos de pH = 3,0 dejándose secar a temperatura ambiente.

Se prepara una solución metanólica de 3 mg/ml del antibiótico a analizar. Con una micropipeta de 0,001 ml se aplica una mancha con la solución a cierta altura del mismo (a unos 10 cm del extremo) y se deja secar.

Simultáneamente se preparan soluciones testigos con antibiótico de composición conocida y estimando que la solución problema sea de concentración intermedia de las mismas.

También se preparan otras tiras con manchas de los testigos.

Estas tiras se cuelgan hacia afuera por los bordes de una cápsula de porcelana que contiene butanol saturado con agua, de manera que el extremo superior esté sumergido en el líquido.

La cápsula se coloca en un soporte y todo se pone adentro de una cuba cilíndrica de unos 30 cm de diámetro y 50 cm de alto, de manera que el extremo largo de las tiras cuelgue dentro de la cuba. En el fondo de ésta se pone butanol saturado para mantener una atmósfera uniforme.

El butanol de la cápsula va humedeciendo las tiras y desciende por ellas hasta el extremo libre en unas 24 horas. Esto produce un corrimiento del antibiótico localizándose la clorotetraciclina y la tetraciclina a diferentes alturas, debido a que poseen diferente velocidad de difusión. Se retiran las tiras y se dejan secar a temperatura ambiente.

Se preparan cultivos de *B. subtilis* sobre agar en fuentes planas de vidrio y se extienden las tiras de papel sobre la superficie del cultivo; se dejan unas 10-12 horas de contacto en heladera y luego se retiran las tiras.

Las fuentes se incuban a 37°C durante 24 horas y luego, por comparación de las zonas de inhibición del cultivo obtenidas con la solución analizada y las soluciones testigos, se obtiene la concentración del antibiótico buscada.

DETERMINACION DE TETRACICLINA BASEMETODO POR FERRICIANURO

FUNDAMENTO: Se basa en el color rojo que desarrolla la tetraciclina cuando es oxidada en medio acuoso alcalino con ferricianuro de potasio.

La clorotetraciclina no desarrolla color, cualquiera sea la proporción presente en la misma.

METODO: Se disuelven 200 mg de tetraciclina base en 50 ml de HCl 0.01 N; se hacen diluciones a 400, 800, 1200 y 1600  $\mu$ /ml. Transfieren 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 a matraces de 25 ml y llevan a volumen con agua destilada.

Medir 1 ml de c/matriz y añadir en tubo de 25 x 100<sup>mm.</sup> Agregar 2 ml de solución de ácido etileno diamino tetraacético al 1% (pH = 9.2) y agitar; seguir con 13 ml de solución de ferricianuro de potasio al 0.025%.

BLANCO: 1 ml solución acuosa mas 13 ml de CHNa 0.05 N. Dejar reposar ambos tubos 45 minutos y leer en coloración con filtro verde. Llevar el aparato a 100% de transmisión con cada blanco.

Con soluciones standard se construye previamente una curva con varias diluciones de concentración conocidas; en esta curva se encuentra el valor de la solución problema, a partir de la lectura obtenida.

DETERMINACION DE TETRACICLINA

METODO POR TURBIDIMETRIA (3)

EE.UU. Farmacopea - p. 853

STANDARD. Se prepara con clorhidrato de tetraciclina puro y secado en estufa al vacío durante 3 horas; se disuelve en agua pura estéril a una concentración de 1 mg/ml.

INOCULO. Está constituido por un cultivo de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, sobre agar con peptona-caseína.

Se siembra previamente en estrías sobre agar fresco y se incuba una noche en estufa a 32° - 35°.

Para cada ensayo se suspende una pequeña cantidad del cultivo en caldo peptonado y se transfiere a un frasco con 150 ml del mismo caldo entibiado a 37°C. Usar para cada litro de caldo peptonado unos 40 - 50 ml de aquella suspensión.

PROCEDIMIENTO. Se diluye el standard de tetraciclina con buffer fosfato 0.1 M. pH = 4,5 a 0.1 mcg/ml; tomar 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 ml y agregar a los tubos respectivamente; llevar a 1 ml todos los tubos (1 al 9) con el mismo buffer.

Se diluye la solución de la muestra con el buffer a una concentración estimada en 0.06 mcg/ml; agregar 1 ml a cada uno de 3 tubos. Agregar a todos los tubos (standard y muestras) 9 ml de inóculo y llevar a baño de agua de 37° ± 0.5 de 3 a 4 horas; después agregar a cada tubo 0.5 ml de formadehido, solución 1 : 3, y leer el por ciento de transmisión en electrofotómetro calibrado a 580 milimicrones.

DETERMINACION DE LA EXTINCION (2)

Pesar exactamente 40 mg, adicionar 2.0 ml de HCl 0.1 N, agitar 30 minutos, hasta disolución completa. Llevar en matraz aforado a 250 ml y repetir la agitación 30 minutos.

Transferir a matraz x 100 ml 10 cc de la solución, añadir 75 ml de agua destilada y 5 ml de OHNa, 5 N.

Trasladar a 100 ml y mezclar bien.

Después de exactamente 6 minutos de agregado el álcali, determinar la absorbancia en Espectrofotómetro Beckman a 380 milimicrones de longitud de onda, con lámpara de descarga de hidrógeno o equivalente.

$$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = \frac{A_{380} \times 2.500}{\text{gr base} \times 100}$$

$$\text{Límites de } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 402 \pm 15$$

DETERMINACION DE LA HUMEDAD DE TETRACICLINA

METODO DE KARL FISCHER (4)

EE. UU. Farmacopea - p. 942

FUNDAMENTO. La titulación por este método se basa en la reacción estequiométrica que se produce entre una solución de anhídrido sulfuroso e iodo en piridina y metanol y agua.

Esta reacción requiere estricta exclusión de la humedad ambiente. Con soluciones poco coloreadas, el punto final puede determinarse eléctrica o visualmente, por el cambio de color de amarillo canario a ámbar. En cambio, con soluciones muy coloreadas son necesarios circuitos eléctricos para apreciar la finalización.

REACTIVO DE KARL FISCHER. Se adicionan 125 g de iodo a una solución de 670 ml de metanol y 170 ml de piridina y se enfría.

Colocar 100 ml de piridina en cilindro graduado de 250 ml, enfriar en baño de hielo y pasar a través de la misma por burbujeo anhídrido sulfuroso, previamente secado y hasta que el volumen alcance a 200 ml; lentamente y agitando, agregarlo a la solución enfriada de iodo. Agitar bien hasta disolución del iodo; transferir al aparato y dejar una noche antes de standardizar. 1 ml de esta solución fresca es equivalente a 5 mg de agua, pero se descompone gradualmente con el tiempo y por la luz; se debe proteger de ésta al usar.

STANDARDIZACION PRIMARIA. Se colocan en el vaso del aparato 36 ml de metanol y se agrega reactivo hasta punto final.

Cuidadosamente agregar 150 - 350 mg de tartrato de sodio, pesado exactamente y volver a titular a punto final.

El factor de equivalente de agua F (mg de agua) por ml de reactivo es dado por la fórmula:

$$F = \frac{0.1566 \times W}{V}$$

W = peso en mg del tartrato de sodio

V = volumen en ml del reactivo

SEGUNDA STANDARDIZACION. El reactivo debe standardizarse cada día antes de su uso, contra soluciones standard de agua en metanol. Se agregan 2 ml de agua a 1000 ml de metanol; se separa también una porción de metanol para

usarlo como blanco.

Se miden 25 ml de aquella en vaso de titulación y se titula con el reactivo de K. F.; igualmente se hace con 25 ml del blanco.

Se hace la corrección en relación al blanco y luego se calcula el contenido en agua en mg/ml por la fórmula:

$$\frac{V' \times F}{25}$$

V' = volumen reactivo K.F. corregido con blanco

F = factor equivalente de agua determinado contra tarttrato de sodio en la standardización primaria

PROCEDIMIENTO. Agregar 25 ml de metanol en el vaso y titular con reactivo K. F., leyendo volumen. Pesar o medir suficiente muestra que contenga 10 - 50 mg de agua y transferir cuidadosamente al vaso; agitar vigorosamente y titular.

El agua contenida en la muestra es dada por: S x F

S = volumen de reactivo para la muestra

F = factor equivalente de agua definido arriba.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Block, Richard J. - Paper Chromatography. A Laboratory Manual - 1952 - cap. III - Pág. 15.
- 2.- Garrat, D. C. - The Quantitative Analysis of Drug - Pág. 595 y sig.
- 3.- U.S. Pharmacopeia XV, p. 853, Determinación de tetraciclina por turbidimetría.
- 4.- U.S. Pharmacopeia XV, p. 942, Determinación de la humedad por método de Karl Fischer.

SOLUBILIDADES DE TETRACICLINA

<u>SOLVENTES</u>	<u>SOLUBILIDADES EN mg/ml</u>		
	<u>BASE</u>		<u>CLORHIDRATO</u>
	<u>5°C</u>	<u>25°C</u>	<u>25°C</u>
Agua	0.24	1.5	122
" sat. de BuOH	0.74	1.8	> 150
Metanol anhidro	> 15		> 100
" - H <sub>2</sub> O (1:1)	1.8		
" - H <sub>2</sub> O (1:2)	1.1	3.5	> 150
Etanol 96 <sup>u</sup>	3.7		21.0
" - H <sub>2</sub> O (1:1)	1.2		
" + H <sub>2</sub> O (1:2)	0.74	2.2	136
Propanol anhidro	15.3		4.4
" - H <sub>2</sub> O (2:1)	1.4		
" - H <sub>2</sub> O (1:1)	1.1		
" - H <sub>2</sub> O (1:2)	1.2	2.7	> 150
Isopropanol anhidro	3.7		1.6
" - H <sub>2</sub> O (2:1)	0.88		
" - H <sub>2</sub> O (1:1)	0.98		
" - H <sub>2</sub> O (1:2)	1.59	2.2	128
Butanol anhidro	15.7		2.6
" + 5 % H <sub>2</sub> O		1.5	10.5
" + 10% H <sub>2</sub> O		0.9	23.1
" + 15% H <sub>2</sub> O		1.2	34.2
" sat. de H <sub>2</sub> O	0.40	1.1	58.0
Acetona anhidra	9.8		1.6
" - H <sub>2</sub> O (2:1)	2.4		
" - H <sub>2</sub> O (1:1)	1.4		
" - H <sub>2</sub> O (1:2)	1.6		
Formamida - H <sub>2</sub> O (1:1)	12.5		
" - H <sub>2</sub> O (1:2)	5.7		

<u>SOLVENTES</u>	<u>SOLUBILIDADES EN mg/ml</u>		
	<u>BASE</u>		<u>CLORURO</u>
	<u>5°C</u>	<u>25°C</u>	<u>25°C</u>
Cellosolve		207	15
" - H <sub>2</sub> O (1:1)	2.6		210
" - H <sub>2</sub> O (1:2)	1.5		224
Dioxano - H <sub>2</sub> O (2:1)	12.5		
" - H <sub>2</sub> O (1:1)	10.5		
" - H <sub>2</sub> O (1:2)	8.8		
Acetato de etilo			
Cellosolve - H <sub>2</sub> O	1.1		

METODO DE DETERMINACION DE LA SOLUBILIDAD: Se puso en equilibrio durante 5 horas un volumen de solvente, por lo general 10 cc con un exceso de antibiótico. Se filtró a la temperatura de la operación y se dosó la concentración del antibiótico en el filtrado por el método colorimétrico del cloruro férrico.

M A T E R I A S P R I M A S U S A D A S

C A T A L I Z A D O R E S

Pd metálico: Pd puro adquirido en la Casa Mohlo.

Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Catalizador para hidrogenaciones, dehidrogenaciones, dehalogenaciones, etc. marca Baker & Co, Inc.

El Pt está soportado sobre alúmina activada; el porcentaje de Pt es del 5 % y se presenta como polvo muy fino gris negruzco.

Ni-Al Alloy 50/50: Para preparación del catalizador Ni Raney. Es un "BDH Laboratory Reagent" - The British Drug Houses Ltd.

D R O G A S

Carbon Activo: Darco G-60 de Atlas Power Co. Darco es la marca registrada de una línea de carbones altamente activados para la purificación de líquidos. Se presenta en polvo y granulado con varios grados de capacidad de adsorción y pureza.

Celite: Nombre comercial de un producto preparado por Johns Manville y utilizado como ayuda-filtrante. Está compuesto por tierras fósiles de diatomeas de gran pureza de un depósito situado en White Hills, Lompoc, California. Existen 9 grados de celite, habiéndose usado el N° 5: Hyflo Supercel.

Ácido oxálico: HOOC-COOH.2H<sub>2</sub>O. Purísimo. E. Merck, Darmstadt.

Hidróxido de Sodio: Puro en lentejas. E. Merck, Darmstadt.

Hidróxido de Potasio: Puro en lentejas. E. Merck, Darmstadt, fracc. Arg.

Ácido Clorhídrico: Para análisis - ACS - (1950) - P.M. = 36.50

Aspecto: incoloro y límpido  
 Título : 35/38 p/p %  
 Cenizas: 0.0005 %  
 Sulfatos: 0.0002 %  
 Sulfitos: 0.005 %  
 Cloro libre: 0.0002 %  
 Amoníaco : 0.0005 %  
 Arsénico : 0.00001 %  
 Metales pesados (Pb) : 0.0001 %  
 Hierro : 0.00005 %

Acido Maleico : Técnico - Eastman Kodak

Hidróxido de Bario: Analar - BDH

Trietanolamina: Eastman Kodak

### S O L V E N T E S

#### Metanol Atapox:

Título	99.5 %
Interv. dest.	1.0 °C
Residuo dest.	0.001 %
Acidez (H.COOH)	0.002 %
Alcalinidad (NH <sub>3</sub> )	0.0003 %
Sustancias carbonic. (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	satisfactorio
Sustancias reductoras (KMnO <sub>4</sub> )	satisfactorio

#### Butanol - Atapox - Redestilado :

Caracteres organolépticos	satisfactorios
Índice refracción (25°C)	1.3972
Densidad (25°C)	0.809
Residuo no volátil	4.8 mg/100 ml
Acidos libres	0.12 ml NaOH N/10
Peróxidos	8 p.p.m.

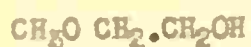
CELLOSOLVE

Eter monoetílico del etilen-glicol

P.M. = 90,12 - P.e. = 0,9311 - Puntosbull. = 185°1 C

Soluble en agua y miscible en hidrocarburos.

Nombre comercial del producto de: Carbide and Carbon Chemicals Co.

METIL - CELLOSOLVE

Eter metílico del etilen glicol

P.M. = 76,09 - P.e. = 0,9664 - P. ebul. = 124°2 C

Soluble en agua.

Miscible con la mayor parte de solventes orgánicos.

Nombre comercial del producto de: Carbide and Carbon Chemicals Co.

