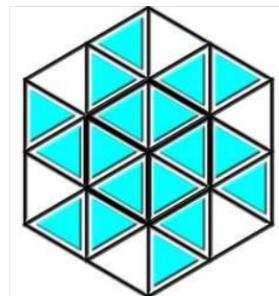




Universidad de los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Laboratorio de Cristalografía-LNDRX  
Mérida, Venezuela



## Caracterización del Estolato de Eritromicina, un Principio

Farmacéuticamente Activo ampliamente usado en nuestro país, mediante

Espectroscopía Infrarroja, Análisis Térmico y Difracción de Rayos X

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Br. Ivaydee Pérez Marquina.

Tutor: Profesor José Miguel Delgado.  
Cotutora: Profesora Graciela Díaz de Delgado  
Mérida, Febrero 2022

## DEDICATORIA

*En primer lugar, le agradezco a nuestro **Señor Jesucristo** por permitirme culminar mi carrera.*

*De todo corazón le ofrezco este triunfo a mi **Dios Amado**. Eres lo más hermoso y valioso de mi vida. Te adoro.*

*A mi familia, mi esposo, mi madre y mi hermana por el apoyo brindado.*

*Especialmente a mis hijos por regalarme su amor, sus alegrías, tristezas, el ánimo que muchas veces necesité para continuar hacia adelante y no mirar atrás.*

*Gracias por no dejarme sola y acompañarme en este camino. Este triunfo también es de ustedes.*

*Dios los Bendiga siempre. Los amo.*

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, te doy las gracias a tí, mi Cristo y Rey, por regalarme la vida y la salud para poder disfrutar del regalo de ver la culminación de mi carrera. Por siempre estaré agradecida. Mi DIOS, SIN TI nada es posible.

A mis tutores, Profesores José Miguel Delgado y Graciela Díaz de Delgado, por recibirme, dirigirme y ayudarme siempre. De todo corazón estoy muy agradecida por creer en mí, por el cariño, la paciencia y la enseñanza impartida en todo momento. Que Dios los bendiga en vida y salud. Éxito en todo lo que emprendan.

Este trabajo también fue posible gracias a la ayuda de todos mis compañeros del Laboratorio de Cristalografía. Que Dios los bendiga a todos.

Al Profesor Jines Contreras porque en todo momento ha estado dispuesto a ayudar con paciencia a todos los estudiantes. A la Dra. Julia Bruno (IVIC) y M.Sc. Iris Santos y M.Sc. Marlin Villarroel (ULA) por su generoso apoyo en la realización del presente trabajo. A la Dra. Maren Pink y Dr. Josh Chen de la Universidad de Indiana por el registro de datos en *Argonne National Laboratory*, E.U.A. También agradezco al Prof. José Antonio Henao y Dr. Robert Toro de la Universidad Industrial de Santander, de Bucaramanga, Colombia.

A los Profesores Francisco López y Juan Carlos Villegas, miembros del Jurado, quienes colaboraron con sus observaciones para lograr un mejor trabajo.

A mi esposo, a mis hijos, a mis padres, a mi hermana por su apoyo. Que Dios los bendiga siempre.

## ÍNDICE GENERAL

		Página
	Resumen	8
I	Introducción General.	11
II	Sobre el Principio Farmacéuticamente Activo en estudio.	15
III	Fundamentos de las Técnicas de Cristalización y Caracterización utilizadas.	15
III.1	Técnicas de Cristalización de Principios Farmacéuticamente Activos.	16
III.2	Técnicas de Caracterización de Materiales Farmacéuticos.	19
III.2.1	Espectroscopía Infrarroja ( <i>FT-IR</i> ).	19
III.2.2	Análisis Térmico.	22
III.2.2.1	Análisis Termogravimétrico ( <i>TGA</i> )	24
III.2.2.2	Calorimetría de Barrido Diferencial ( <i>DSC</i> ).	26
III.2.3	Difracción de Rayos X	27
III.2.3.1	Difracción de Rayos X en un material cristalino.	29
III.2.3.2	Técnicas Difractométricas.	31
III.2.3.2.1	Técnicas de Difracción de Muestras Policristalinas.	31
III.2.3.2.2	Técnicas de Difracción de Cristal Único	35
IV	Hipótesis.	40
V	Objetivos.	40
V.1	Objetivo General.	40
V.2	Objetivos Específicos.	40
VI	Resultados y Discusión.	41
VI.1	Cristalización del Estolato de Eritromicina.	41
VI.2	Caracterización del Estolato de Eritromicina mediante <i>FT-IR</i> .	42
VI.3	Análisis Térmico del Estolato de Eritromicina.	45
VI.4	Caracterización mediante Difracción de Rayos X del Muestras Policristalinas del Estolato de Eritromicina	46
VI.5	Determinación de la estructura del Estolato de Eritromicina.	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Diagrama molecular del Estolato de Eritromicina.	12
Figura 2	Algunas presentaciones del Estolato de Eritromicina comercializadas en nuestro país.	16
Figura 3	Diagrama esquemático del método de evaporación lenta del solvente.	18
Figura 4	Cristal de cloruro de tiosemicarbazida de cadmio monohidratado, obtenido por evaporación lenta de solvente.	19
Figura 5	Tensión simétrica (a) y asimétrica (b) de enlaces C-H.	20
Figura 6	Vibraciones de tensión y flexión.	21
Figura 7	Espectrofotómetro Infrarrojo marca Perkin Elmer modelo RX1 perteneciente al Laboratorio de Docencia de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias.	23
Figura 8	Analizador Térmico perteneciente al Laboratorio de Cinética y Catálisis de la Facultad de Ciencias.	24
Figura 9	Termograma de la degradación térmica del polietileno.	25
Figura 10	Termograma del oxalato de calcio mono hidratado ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).	26
Figura 11	DSC característico de un polímero.	27
Figura 12	Representación geométrica de la derivación de la Ley de Bragg.	30
Figura 13	Patrón de difracción de una muestra policristalina.	32
Figura 14	Representación esquemática de los pasos del proceso de registro de un patrón de difracción de muestras policristalinas.	33
Figura 15	Difractómetro de Rayos X para muestras policristalinas <i>Bruker D8 Advance</i> del Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.	34
Figura 16	Difractómetro de Rayos X de muestras policristalinas <i>Philips PW 1050/25</i> automatizado por <i>Crystal Logic, Inc.</i> del Laboratorio de Cristalografía.	35
Figura 17	Representación esquemática del proceso de determinación estructural.	36
Figura 18	Cristales de buena calidad (izquierda), cristales de mala calidad (derecha).	36

Figura 19	Difractómetro <i>Rigaku XtaLABPro</i> del Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.	38
Figura 20	Difractómetro de Rayos X de Cristal Único de la estación de trabajo <i>15-ID, ChemMatCARS</i> , del <i>Argonne National Laboratory</i> , EUA.	39
Figura 21	Cristales de Estolato de Eritromicina obtenidos.	42
Figura 22	Espectro <i>FT-IR</i> registrado para el estolato de eritromicina materia prima.	43
Figura 23	Espectro <i>FT-IR</i> registrado para el estolato de eritromicina recristalizado.	44
Figura 24	Termograma <i>TGA-DSC</i> del Estolato de Eritromicina materia prima.	45
Figura 25	Termograma <i>TGA-DSC</i> del Estolato de Eritromicina recristalizado.	46
Figura 26	Patrón de difracción del Estolato de Eritromicina materia prima, registrado en el equipo <i>Philips PW 1050/25</i> del Laboratorio de Cristalografía.	47
Figura 27	Patrón de difracción del Estolato de Eritromicina recristalizado, registrado en el equipo <i>Bruker D8 Advance</i> del Laboratorio de Rayos X de la UIS, Bucaramanga, Colombia.	47
Figura 28	Superposición del patrón de difracción registrado para el Estolato de Eritromicina materia prima y el del material recristalizado.	48
Figura 29	Mapa de densidades electrónicas obtenido con el programa <i>SHELXS</i> .	53
Figura 30	a) Asignación de átomos en cuatro moléculas independientes por el programa <i>SHELXT</i> . b) Dos de las cuatro moléculas independientes en la estructura del Estolato de Eritromicina.	55
Figura 31	Disposición del anillo macrocíclico y de los dos monosacáridos presentes en la estructura del estolato de eritromicina. (Los átomos grises representan átomos de carbono, los rojos son átomos de oxígeno y los azules son átomos de nitrógeno). Se omitieron los átomos de hidrógeno para mayor claridad.	56
Figura 32	Estructura cristalina del Estolato de Eritromicina representada en base a la celda triclínica <i>P1</i> .	57
Figura 33	Estructura cristalina del estolato de eritromicina representada en base a la celda triclínica <i>C2</i> .	58
Figura 34	Estructura cristalina del estolato de eritromicina representada en base a la celda triclínica <i>I2</i> .	59

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Valores típicos de tensión en el infrarrojo para algunos grupos funcionales.	22
Tabla 2	Pruebas de Solubilidad del Estolato de Eritromicina materia prima.	41
Tabla 3	Señales características observadas en el espectro <i>FT-IR</i> del Estolato de Eritromicina materia prima.	43
Tabla 4	Señales características observadas en el espectro <i>FT-IR</i> del Estolato de Eritromicina recristalizado.	44
Tabla 5	Parámetros de celda obtenidos para el Estolato de Eritromicina recristalizado a partir del patrón de difracción de polvo.	48
Tabla 6	Indexado del patrón de difracción registrado para el estolato de eritromicina recristalizado.	49
Tabla 7	Datos Cristalinos y Condiciones Experimentales del registro de Datos de Difracción de Cristal Único del Estolato de Eritromicina.	52
Tabla 8	Parte de los resultados del programa SHELXS para la determinación de la estructura del Estolato de Eritromicina.	54

## RESUMEN

En la actualidad existe una amplia diversidad de Principios Farmacéuticamente Activos (PFAs), entre los cuales se encuentra una clase de antibióticos llamados macrólidos. Estos compuestos son ampliamente usados en el tratamiento de una amplia gama de procesos infecciosos, especialmente en pacientes alérgicos a la penicilina. Los macrólidos presentan un anillo macrocíclico de lactona de 14 a 16 átomos al que se unen varios desoxiazúcares (monosacáridos en los cuales un radical hidroxilo ha sido reemplazado por un hidrógeno). Entre los macrólidos más utilizados está la eritromicina.

En este Trabajo Especial de Grado se presenta la caracterización estructural del estolato de eritromicina, la presentación farmacéutica más comúnmente utilizada de la eritromicina. La caracterización de este compuesto se realizó mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (*FT-IR*), Análisis Térmico (*TGA*, *DSC*) y Difracción de Rayos X, tanto de Polvo como Cristal Único,

El estolato de eritromicina es un sólido de color blanco, insoluble en cloroformo, 2-propanol, metanol y etanol. Es parcialmente soluble en acetona y agua. Su fórmula molecular es  $C_{52}H_{97}NO_{18}S$  y su peso molecular 1.056,39 g/mol. Es comúnmente comercializado en nuestro país por los Laboratorios Calox *C.A*, Pharma y Spefar como Eritromicina (nombre genérico) e Ilosone, en cápsulas, suspensión, tabletas y jarabes.

Curiosamente la estructura del estolato de eritromicina no ha sido reportada, a pesar de ser un PFA de uso común y de comercializarse desde hace muchos años. En la búsqueda realizada en el base de datos de Cambridge, *CSD (Cambridge Structural Database)* del *CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre)* [Groom *et al.*, 2016] no se encontró ningún reporte sobre la caracterización estructural de este material. Por otra parte, en la base de datos de polvo *PDF-4/Organics* del *ICDD (International Centre for Diffraction Data)* [Gates-Rector y Blanton, 2019], existen tres reportes de patrones de difracción

registrados para este compuesto. Sin embargo, ninguno de ellos contiene información cristalográfica. No se reportan los parámetros de celda de dicho material. Esto es, los patrones reportados no están indexados. Debido a la falta de información estructural sobre este compuesto, el objetivo principal de este trabajo de tesis es registrar e indexar su patrón de difracción de polvo y determinar su estructura cristalina por medio de la técnica de difracción de rayos X de cristal único. Previo a la determinación de la estructura se realizó la caracterización del material por Espectroscopía Infrarroja y Análisis Térmico.

Tanto en el espectro *FT-IR* registrado para el estolato de eritromicina materia prima como para el estolato de eritromicina recristalizado se observaron las distintas bandas de absorción asociadas con los grupos funcionales presentes en dicho material. Se observaron la banda O-H, la vibración de tensión C-H, la vibración de tensión que corresponde al grupo carbonilo C=O, la vibración de deformación C-H, la vibración de tensión asimétrica y asimétrica del grupo C-O-C, la vibración de tensión C-O localizada en la región de la huella dactilar, la cual corresponde al grupo O-H y la vibración de deformación O-H fuera del plano. Además, para el estolato de eritromicina recristalizado se observó el balanceo CH<sub>2</sub> (*cadena larga del estolato*).

Para la caracterización térmica del estolato de eritromicina se empleó el análisis termogravimétrico (*TGA*) y la calorimetría de barrido diferencial (*DSC*). Tanto el termograma (*TGA-DSC*) del estolato de eritromicina materia prima como el del estolato de eritromicina recristalizado mostraron una pérdida de masa entre el 8-10 % que se correlaciona con la endoterma observada alrededor de 154-156 °C. En este rango de temperatura funde el estolato de eritromicina.

El indexado del patrón de difracción de rayos X de polvo registrado para el material recristalizado, realizado con el programa DICVol04 [Louër y Boultif, 2004], condujo a una celda triclinica con parámetros  $a=10,960(14)$  Å,  $b=21,013(29)$  Å,  $c=28,219(06)$  Å,  $\alpha=100,49(5)^\circ$ ,  $\beta=93,64(8)^\circ$ ,  $\gamma=91,82(7)^\circ$ . Las figuras de mérito obtenidas,  $M_{20}=14,2$  y

$F_{20}=53,0(0,0066, 57)$ , evidencian que el indexado fue satisfactorio y que la celda unidad obtenida reproduce adecuadamente la posición de los máximos de difracción registrados.

La celda triclinica obtenida a partir de los datos de intensidad medidos en un pequeño cristal obtenido luego del correspondiente proceso de recristalización concuerda con la obtenida en el análisis de los patrones difracción de polvo. La determinación y el refinamiento de la estructura del material bajo estudio, realizado con estos datos de intensidad, se realizó con los programas SHELXT [Sheldrick, 2015a] y SHELXL [Sheldrick, 2015b], respectivamente. Estos programas se usaron a través de la interfase gráfica ShelXle [Hübschle *et al.*, 2011]. Para el análisis de distancias, ángulos de enlace y enlaces de hidrógeno, graficación, validación y preparación de archivos para publicación se utilizaron los programas PLATON [Spek, 2009], Mercury [Macrae *et al.*, 2020], DIAMOND [Brandenburg, 1999] y enCIFer [Allen *et al.*, 2004].

La determinación estructural del Estolato de Eritromicina ha mostrado ser un problema difícil. Sin embargo, se estima que el modelo estructural obtenido representa adecuadamente la estructura cristalina de este importante principio farmacéuticamente activo.

En esta Tesis se presentan los resultados obtenidos en los estudios antes señalados y la discusión detallada de dichos resultados.

## 1. Introducción General.

La Química del estado sólido en sus intentos por contar con mejores técnicas de análisis, para comprender la naturaleza y el comportamiento de la gran cantidad y diversidad de materiales naturales y sintéticos, ha desarrollado a través de los años excelentes técnicas de caracterización. Entre las técnicas más empleadas se encuentra la Espectroscopía Infrarroja (comúnmente conocida como *FT-IR*, por sus siglas inglés), las Térmicas y las de Difracción de Rayos X. Entre las técnicas térmicas destacan el Análisis Termogravimétrico (*TGA*) y la Calorimetría de Barrido Diferencial (*DSC*). Como técnica de caracterización estructural, la más poderosa es la Difracción de Rayos X la cual permite determinar, con una alta precisión, la estructura de sólidos cristalinos. También puede ser utilizada como técnica analítica ya que permite determinar los componentes de muestras policristalinas.

La difracción de rayos X comprende un conjunto de técnicas que permiten la caracterización de la estructura de materiales cristalinos de diversa naturaleza. Gracias a los desarrollos computacionales y a la experiencia acumulada durante décadas se logra determinar en forma precisa la estructura de materiales sólidos cristalinos. Esto es, la disposición en el espacio tridimensional de los átomos que forman el material. La difracción de rayos X, mediante la técnica de muestras policristalinas (o de polvo) también puede ser utilizada como técnica analítica ya que permite determinar los componentes presentes en una determinada muestra que contenga varias fases cristalinas. Una vez determinada la estructura cristalina, que se realiza comúnmente por las técnicas de cristal único (o monocristal), se puede calcular las distancias interatómicas, los ángulos de enlace y de torsión, los planos atómicos y moleculares, entre otras importantes informaciones sobre la estructura del material.

En la amplia diversidad de Principios Farmacéuticamente Activos (PFAs) se encuentra una clase de antibióticos llamados macrólidos. Estos compuestos son generalmente la

primera opción utilizada para tratar una amplia gama de procesos infecciosos, especialmente en pacientes alérgicos a la penicilina. Los macrólidos presentan un anillo macrocíclico de lactona de 14 a 16 átomos al que se unen varios desoxiazúcares (monosacáridos en los cuales un radical hidroxilo ha sido reemplazado por un hidrógeno). Entre los macrólidos más utilizados está la eritromicina [Brunton et al., 2007].

La eritromicina es una base débil, con un (pKa de 8,9), que posee un anillo lactónico de 14 átomos de carbono y forma sales y esteres cuando se pone en contacto con ácidos orgánicos. Es usada comúnmente como sal (estolato), la cual es menos susceptible a ácidos por lo que su absorción en el tracto gastrointestinal es mucho más completa, mejorando su biodisponibilidad oral [O'Neil et al., 2006]. En la figura 1 se muestra el diagrama molecular del estolato de eritromicina.

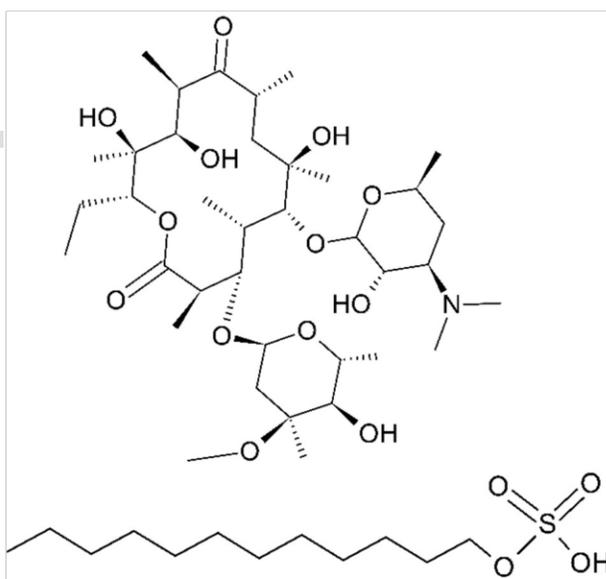


Figura 1. Diagrama molecular del Estolato de Eritromicina.

El estolato de eritromicina es un sólido de color blanco, insoluble en cloroformo, 2-propanol, metanol y etanol. Es parcialmente soluble acetona y agua. Su fórmula molecular es  $C_{52}H_{97}NO_{18}S$  y su peso molecular 1.056,39 g/mol [O'Neil. et al., 2006].

También es llamado sulfato dodecilpropionato de eritromicina y laurilsulfato propionato de eritromicina.

Curiosamente la estructura del estolato de eritromicina no ha sido reportada, a pesar de ser un *PFA* de uso común. En la búsqueda realizada en la base de datos de Cambridge, *CSD (Cambridge Structural Database)* del *CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre)* [Groom *et al.*, 2016], no se encontró ningún reporte sobre la caracterización estructural de este material. Por otra parte, en la base de datos de polvo *PDF-4/Organics* del *ICDD (International Centre for Diffraction Data)* [Gates-Rector y Blanton, 2019] existen tres reportes de patrones de difracción registrados para este compuesto. Sin embargo, ninguno de ellos contiene información cristalográfica. No se reportan los parámetros de celda de dicho material. Esto es, los patrones reportados no están indexados. Debido a la falta de información estructural sobre este compuesto, el objetivo principal de este trabajo de tesis es registrar e indexar su patrón de difracción de polvo y determinar su estructura cristalina por medio de la técnica de difracción de rayos X de cristal único.

Para la mejor caracterización estructural del estolato de eritromicina se recrystalizó dicho material con la finalidad purificarlo y obtener cristales de calidad y tamaño adecuado para usar las técnicas de cristal único. Luego de varias pruebas de solubilidad con distintos solventes y numerosos intentos de recrystalización se obtuvieron cristales adecuados a partir de una solución 1:1 acetona-agua. Tanto al material recrystalizado como a la materia prima que se recibió de Laboratorios CAM se le realizaron, por separado, los estudios por espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (*FT-IR*), Análisis Térmicos (*TGA-DSC*) y de Difracción de Rayos X de Muestras Policristalinas. Del material recrystalizado se aisló un pequeño fragmento cristalino con el que se realizó la determinación estructural por técnicas de Difracción de Rayos X de Cristal Único.

Como es bien conocido, la espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier, *FT-IR* es una de las técnicas analíticas de mayor utilidad en la identificación de los grupos funcionales presentes en especies moleculares orgánicas y organometálicas. Es muy utilizada en la industria farmacéutica. Tanto en el espectro *FT-IR* registrado para el estolato de eritromicina materia prima como para el estolato de eritromicina recristalizado se observaron las distintas bandas de absorción asociadas con los grupos funcionales presentes en dicho material, como se evidenciará oportunamente.

El análisis térmico registra el comportamiento de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la temperatura mientras la sustancia se somete a un programa de calentamiento bajo un régimen controlado de temperatura. Para la caracterización del estolato de eritromicina se empleó el análisis termogravimétrico (*TGA*) y la calorimetría de barrido diferencial (*DSC*). En el análisis termogravimétrico (*TGA*) se registra continuamente la masa de una muestra, colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra (normalmente de forma lineal con el tiempo). En la calorimetría de barrido diferencial (*DSC*) se miden las diferencias en la cantidad de calor de una sustancia bajo estudio con respecto a una referencia en función de la temperatura, cuando ambas son sometidas a un programa de calentamiento controlado.

La presente tesis se fundamenta en la caracterización del estolato de eritromicina, usando técnicas espectroscópicas (*FT-IR*), térmicas (*TGA*, *DTA* y *DSC*) y difractométricas (difracción de rayos X, tanto de muestras policristalinas como de cristal único). Particular interés se centra en registrar e indexar su patrón de difracción de polvo y determinar la estructura cristalina de dicho principio activo por medio de la técnica de difracción de rayos X de cristal único que, curiosamente, no ha sido reportada en la literatura científica.

## **II. Sobre el Principio Farmacéuticamente Activo en estudio.**

El principio farmacéuticamente activo bajo estudio es la eritromicina, un antibiótico macrólido de primera elección en el tratamiento de numerosas infecciones. Es usado como alternativa a las penicilinas, en especial en pacientes alérgicos a ellas. La eritromicina se emplea comúnmente como sal (estolato, estearato, etilsuccinato, propionato, entre otras) ya que de esa forma se mejora su biodisponibilidad oral y es más estable en medio ácido. En particular, el estolato es menos susceptible al ácido y exhibe muy baja toxicidad. Sin embargo, tras su administración, en algunas personas, pueden aparecer dolores abdominales, náuseas, vómitos o diarreas [Brunton *et al.*, 2007].

El estolato de eritromicina es comercializado en nuestro país por los laboratorios *Calox, C.A, Pharma* y *Spefar* como *Eritromicina* (nombre genérico) e *Ilosone*, en cápsulas, suspensión, tabletas de 250 mg y 500 mg y jarabes de 125mg/5 ml y 250mg/5ml por las compañías Glaxo-Smith-Kline y Lilly. También es producido por otros laboratorios, como Pfizer, S.A., Cafar, Leti, Vivax Pharmaceuticals, entre otros [Spilva de Lehr *et al.*, 2009]. En la figura 2 se muestran algunos de los medicamentos comercializados en nuestro país.

## **III. Fundamentos de las Técnicas de Cristalización y Caracterización utilizadas.**

Durante el desarrollo de este trabajo especial de grado se revisaron los fundamentos de las técnicas de cristalización y caracterización de principios farmacéuticamente activos. Se prestó particular atención a estudios reportados en la literatura sobre la cristalización y caracterización de la eritromicina y de sus sales más comunes. A continuación se presenta un breve resumen de los fundamentos de las técnicas empleadas: Espectroscopía Infrarroja (FT-IR), Análisis Térmico (Análisis termogravimétrico, TGA, y Calorimetría

de barrido diferencial, DSC) y Difracción de Rayos X. Previamente, se revisa brevemente las técnicas de cristalización más comunes.



Figura 2. Algunas presentaciones del Estolato de Eritromicina comercializadas en nuestro país.

### III.1. Técnicas de Cristalización de Principios Farmacéuticamente Activos.

En la industria farmacéutica se utiliza comúnmente la cristalización como técnica de separación y purificación de los compuestos orgánicos e inorgánicos que se emplean en la fabricación de medicamentos. En el proceso de cristalización ocurre un ordenamiento de iones, átomos o moléculas de un compuesto dado, produciéndose el material cristalino [Byrn *et al.*, 2003].

La formación y crecimiento de cristales en una red ordenada de forma lenta permite la incorporación de moléculas del compuesto, separando de esta red cristalina las moléculas de las impurezas, de modo que al final se obtiene un sólido enriquecido en el compuesto que se quiere purificar.

En estas técnicas se suele aprovechar el hecho de que la mayoría de los compuestos incrementan su solubilidad con la temperatura, de modo que la muestra a recrystalizar se disuelve en un solvente o mezcla de solventes a una temperatura cercana a la temperatura de ebullición del solvente. Posteriormente, se deja enfriar muy lentamente de modo que se genere una solución sobresaturada del compuesto lo que generalmente conduce a la formación de cristales en dicho compuesto [Byrn *et al.*, 2003].

El primer paso para abordar un proceso de recrystalización, en solución, es la elección del solvente. Para ello, previamente, se suelen realizar pruebas de solubilidad en distintos solventes. El solvente óptimo será aquel que disuelva completamente el compuesto en caliente y nada o muy poco en frío.

Además de esto, es importante que el solvente posea un punto de ebullición moderado o alto y que sea inerte frente al compuesto a recrystalizar para no modificar la integridad de éste. Cada principio activo se puede recrystalizar en distintos solventes bajo distintas condiciones. En general, se deben precisar las condiciones que conduzcan a una cristalización adecuada. La supersaturación de una solución produce generalmente una cristalización rápida con formación de cristales muy pequeños, no bien desarrollados. Por este motivo, se requiere que la evaporación del solvente sea muy lenta y en un ambiente libre de vibraciones mecánicas.

En algunas ocasiones, no es posible encontrar un solvente puro, en este caso, se puede utilizar una mezcla compuesta por dos o más solventes en cantidades adecuadas. Normalmente, ocurre que el compuesto a purificar es muy soluble en unos solventes y muy insoluble en otros. Por ello, se escogen mezcla de solventes. Por supuesto, en este caso, además de elegir las proporciones adecuadas de cada uno, es necesario que los solventes escogidos sean miscibles. Otra manera de llevar a cabo la recrystalización es disolver bien y adicionar una proporción adecuada del solvente en el que no es soluble

para favorecer su cristalización [Byrn *et al.*, 2003].

La evaporación lenta del solvente es adecuada para compuestos altamente solubles. Este método consiste en preparar una solución del compuesto en un solvente adecuado; la cual deberá estar saturada o casi saturada. Luego se transfiere la solución a un envase limpio y se cubre de manera que el solvente pueda evaporarse lentamente. Para cubrir el envase se puede usar papel parafinado o papel aluminio. En la figura 3 se muestra esquemáticamente este procedimiento [Byrn *et al.*, 2003].

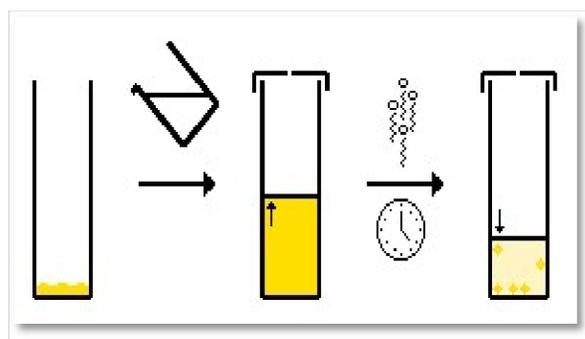


Figura 3. Diagrama esquemático del método de evaporación lenta del solvente.

En general, los fármacos son compuestos de bajo o medio peso molecular. Para obtener cristales óptimos y determinar la estructura por difracción de rayos X de estos materiales se debe conocer su solubilidad y buscar las mejores condiciones de cristalización con distintas estrategias. Entre los tipos de cristalización, como se mencionó anteriormente, la más usada por su sencillez es la evaporación lenta de un solvente o de una mezcla de solventes. La figura 4 muestra un ejemplo de cristales obtenidos por evaporación. [Byrn *et al.*, 2003].



*Figura 4. Cristal de cloruro de tiosemicarbazida de cadmio monohidratado, obtenido por evaporación lenta de solvente.*

### **III.2. Técnicas de Caracterización de Materiales Farmacéuticos.**

En el proceso de selección de la fase activa de un dado principio farmacéutico sólido, que se emplea en la fabricación de un medicamento, se debe caracterizar la fase sólida de dicho principio activo y examinar la posible formación de polimorfos. Como se mencionó anteriormente, para ello se hace necesario emplear distintas técnicas de análisis como Espectroscopía Infrarroja (*FT-IR*), Análisis Termogravimétrico (TGA), Calorimetría de Barrido Diferencial (*DSC*) y Difracción de rayos X (DRX), entre otras [Byrn *et al.*, 2003]. En los siguientes secciones se presenta una breve descripción de dichas técnicas.

#### **III.2.1. Espectroscopía Infrarroja (*FT-IR*).**

La Espectroscopía Infrarroja es una de las técnicas analíticas de mayor utilidad en la identificación de los grupos funcionales presentes en especies moleculares orgánicas y organometálicas, en la industria farmacéutica. Se basa en la caracterización de las vibraciones de los átomos en el material bajo estudio.

Para absorber radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar. Ello ocurre al cambiar las posiciones de los átomos debido a los

diferentes tipos de vibraciones y rotaciones que tienen lugar alrededor de los enlaces en la molécula. Las señales que se observan en un espectro de absorción en el infrarrojo surgen por transiciones de un estado de energía vibracional a otro [Silverstein *et al.*, 2005].

Para una molécula sencilla diatómica o triatómica es fácil definir el número y la naturaleza de las vibraciones presentes y relacionarlas con las energías de absorción. Sin embargo, para las moléculas poliatómicas, ello se hace difícil por el gran número de vibraciones posibles.

Esencialmente, en un espectro infrarrojo se puede distinguir dos categorías básicas de vibraciones: las vibraciones de tensión y las de flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Entre las vibraciones de tensión se puede mencionar la tensión simétrica y la asimétrica. La tensión simétrica es un modo de vibración que tiene lugar cuando dos enlaces se alargan o se contraen simultáneamente, mientras que en la asimétrica uno de los dos enlaces se alarga mientras el otro se contrae. En la figura 5 se presentan ambos modos de tensión

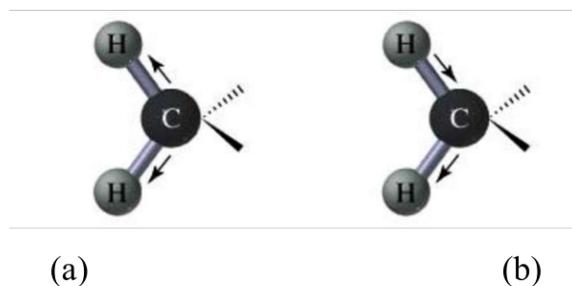


Figura 5. Tensión simétrica (a) y asimétrica (b) de enlaces C-H.

Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son esencialmente de cuatro tipos: tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión, como se muestra en la figura 6 [Silverstein *et al.*, 2005].

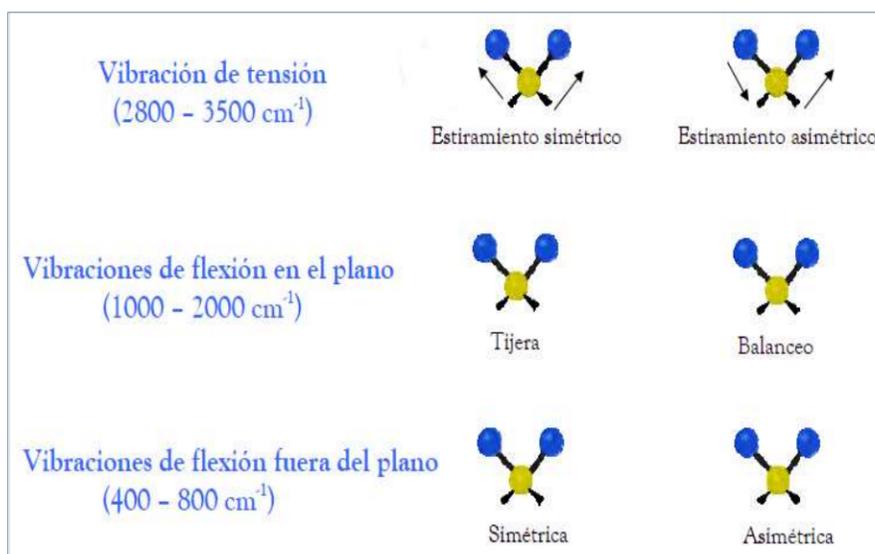


Figura 6. Vibraciones de tensión y flexión.

En el espectro infrarrojo, las absorciones se registran como picos o bandas en distintas posiciones debido a que los distintos enlaces y grupos funcionales absorben energía a diferente frecuencia [Pretsch *et al.*, 2003]. La denominada área de la huella dactilar contiene información particular que permite precisar y ratificar la identidad de la muestra examinada. En el proceso de identificación se tienen presentes los valores típicos de tensión que se han reportado en la bibliografía. Estos valores suelen presentarse en forma tabulada. La tabla 1 contiene los valores de las frecuencias más comunes asociadas a diversos grupos funcionales [Lambert *et al.*, 2005].

El espectro infrarrojo se suele dividir en tres regiones: Infrarrojo cercano, el cual comprende un rango de 12800-4000  $\text{cm}^{-1}$ , Infrarrojo medio de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , Infrarrojo lejano de 400-10  $\text{cm}^{-1}$ . La región más utilizada es el infrarrojo medio, comprendida entre los 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabla 1. Valores típicos de tensión en el infrarrojo para algunos grupos funcionales.

Grupo funcional	Banda (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad
C-H	2960-2850	Media
C=C-H	3100-3020	Media
C=C	1680-1620	Media
Alquino	3350-3300	Fuerte.
Ar-H	3030-3000	Media
OR-H	3650-3400	Fuerte, ancha
-C-O-	1150-1050	Fuerte.
C=O	1780-1640	Fuerte
R <sub>2</sub> N-H	3500-3300	Fuerte, ancha
-C-N-	1230-1030	Media
RNO <sub>2</sub>	1540	Fuerte

Existe una variedad de instrumentos, que pueden clasificarse en dos categorías: los Espectrofotómetros con Transformada de Fourier, que realizan un análisis simultáneo de toda la banda espectral a partir de medidas interferométricas, y los espectrofotómetros de tipo dispersivo, utilizados en el IR cercano [Pretsch *et al.*, 2003]. Los más comunes son los espectrofotómetros de Transformada de Fourier, llamados usualmente *FT-IR*. Para este análisis se utilizará el espectrofotómetro infrarrojo marca Perkin Elmer modelo RX1 perteneciente al Laboratorio de Docencia de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, que se muestra en la figura 7.

### III.2.2 Análisis Térmico.

Los Métodos Térmicos se pueden definir como un grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la temperatura mientras la sustancia se somete a un programa de calentamiento controlado [Haines, 1995].



*Figura 7. Espectrofotómetro Infrarrojo marca Perkin Elmer modelo RX1 perteneciente al Laboratorio de Docencia de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias.*

Existen numerosos métodos térmicos, que difieren en las propiedades medidas en función de la temperatura y en los propios programas de calentamiento. Estos métodos se aplican tanto en el control de calidad como en la investigación de productos industriales, tales como polímeros, productos farmacéuticos, arcillas y minerales, metales y aleaciones. En el presente estudio se utilizaron dos métodos térmicos: el análisis termogravimétrico (*TGA*) y la calorimetría de barrido diferencial (*DSC*) [Haines, 1995; Callister, 1997].

Los métodos de análisis térmico son muy usados por su rapidez, sencillez y disponibilidad en el estudio y caracterización de una serie de procesos fisicoquímicos (adsorción, desorción, reducción, oxidación y reacciones en el estado sólido) y en el estudio de diagramas de fases (transiciones entre fases cristalinas).

Para obtener información de los cambios que pudiera sufrir el estolato de eritromicina, tanto de la materia prima como el material recristalizado, en función de la temperatura a ambos se les realizaron los estudios térmicos correspondientes (*TGA*, *DSC*). Para el registro de los correspondientes termogramas se sometieron las muestras, colocadas en atmósferas inertes y en las condiciones óptimas que se requieren para el buen funcionamiento del equipo, a cambios de temperatura. Estos se llevaron a cabo en el

Analizador Térmico marca Perkin–Elmer TGA7, perteneciente al Laboratorio de Cinética y Catálisis de la Facultad de Ciencias (ver figura 8). Para la realización de estos estudios se contó con el apoyo de la M.Sc. Marlin Villarroel.



*Figura 8. Analizador Térmico perteneciente al Laboratorio de Cinética y Catálisis de la Facultad de Ciencias.*

### **III.2.2.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)**

En un análisis termogravimétrico (TGA) se registra continuamente la masa de una muestra, colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra (normalmente de forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina termograma o curva de descomposición térmica [Callister, 1997].

Los instrumentos comerciales modernos empleados en termogravimetría constan esencialmente de: 1) una balanza analítica sensible, 2) un horno, 3) un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte y 4) un microprocesador/microordenador para el control del instrumento y la adquisición y visualización de datos. Además, existe

la opción de contar con un sistema para cambiar el gas de purga en algunas aplicaciones particulares [Callister, 1997].

Estos métodos suministran información sobre las reacciones de descomposición y de oxidación que pueden ocurrir en la muestra y sobre procesos como vaporización, sublimación, entre otros, que ésta puede sufrir.

Un ejemplo del uso de esta técnica en el análisis cuantitativo de un material polímero se presenta en la figura 9. La muestra es un polietileno que ha sido dopado con partículas finas de carbón para disminuir el paso de la luz. En el análisis se puede precisar la cantidad de cada componente.

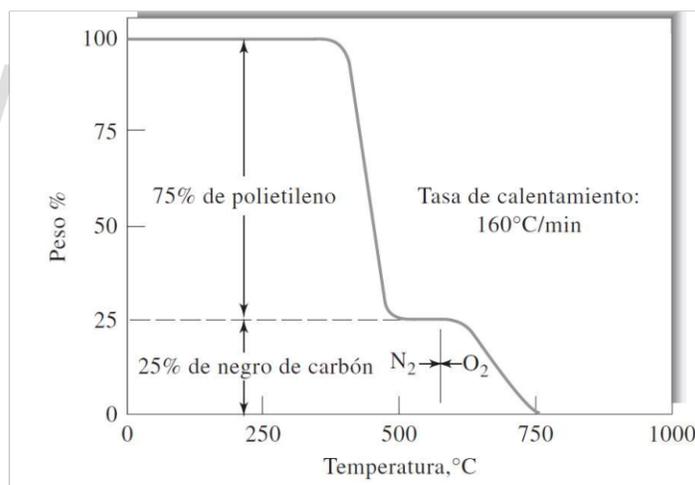


Figura 9. Termograma de la degradación térmica del polietileno. Tomado de Skoog *et al.*, 2008.

Un segundo ejemplo muestra el termograma obtenido al someter a calentamiento en atmósfera inerte el oxalato de calcio monohidratado ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a una velocidad de 5 °C/min (figura 10). Las regiones horizontales perfectamente definidas corresponden a los intervalos de temperatura en los que los diversos compuestos de calcio, producto de la descomposición del oxalato de calcio monohidratado, son estables [Skoog *et al.*, 2008].

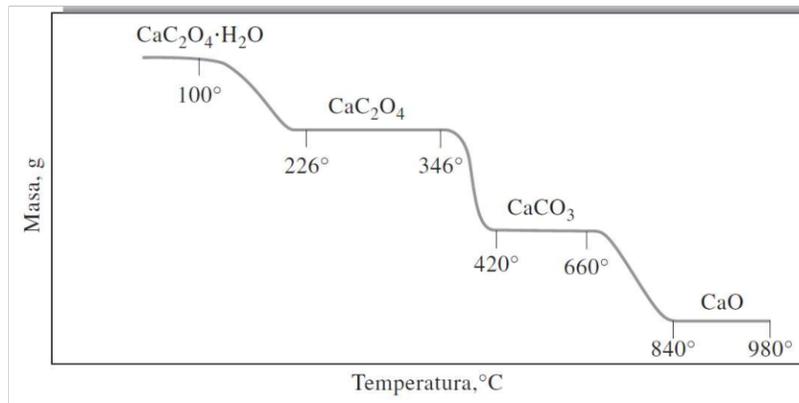


Figura 10. Termograma del oxalato de calcio monohidratado ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).  
Tomado de Skoog et al., 2008.

### III.2.2.2 Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación del contenido calórico en la muestra, por lo que se pueden determinar entalpías de reacción, calores específicos, puntos de ebullición y cristalización, pureza de compuestos cristalinos, entre otros procesos.

En el DSC se miden la diferencia en el contenido calórico del material bajo estudio con respecto a una referencia en función de la temperatura, cuando las dos son sometidas a un programa de calentamiento controlado. El sistema de calentamiento sube la temperatura a una tasa específica (generalmente  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ) o bien mantiene la muestra a una temperatura determinada. Existen tres tipos distintos de instrumentos para la calorimetría de barrido diferencial DSC como son: instrumentos para el DSC de potencia compensada, DSC de flujo de calor y DSC modulada, en el cual cada uno genera una gráfica de potencia o flujo de calor *versus* temperatura [Skoog et al., 2008].

La figura 11 muestra un DSC característico (idealizado) del calentamiento un polímero

hasta que ocurre su total descomposición. El descenso inicial de  $\Delta T$  es debido a la transición vítrea  $T_g$  (temperatura característica a la cual los polímeros amorfos vitrificados se hacen flexibles o parecen de goma). A esa temperatura se inicia el movimiento coordinado de los largos segmentos de las moléculas del polímero. También se observan dos máximos y un mínimo, comúnmente llamados picos. Los dos máximos resultan de procesos exotérmicos en los que el calor se desprende de la muestra ocasionando que su temperatura aumente. El mínimo, asociado con el proceso de fusión, es la consecuencia de un proceso endotérmico donde el calor es absorbido por la muestra. El proceso del primer pico exotérmico se corresponde con la formación de cierta cristalinidad en el polímero. Los cristales formados se funden en el proceso endotérmico siguiente. El último pico, exotérmico, se encuentra solo si el calentamiento se lleva a cabo en presencia de aire o de oxígeno ya que es el resultado de la oxidación del polímero [Skoog *et al.*, 2008].

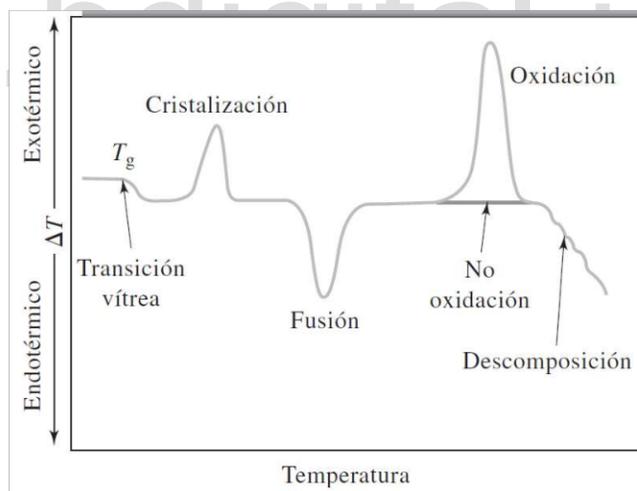


Figura 11. DSC característico de un polímero. Tomado de Skoog *et al.*, 2008.

### III.2.3 Difracción de Rayos X

En 1895, Wilhelm C. Röntgen descubrió los rayos X mientras realizaba experimentos con la luminosidad producida en determinadas sustancias químicas bajo la acción de un tubo

de rayos catódicos. Estos experimentos revelaron la presencia de una radiación, la cual contenía características interesantes como:

- ✓ La propagación de la misma se realizaba en línea recta y a una velocidad similar a la de la luz.
- ✓ Tenía la capacidad de emulsionar las placas fotográficas y atravesar cuerpos opacos.

Por este descubrimiento, a Röntgen se le otorgó el Premio Nobel de Física en 1901. Posteriormente, en 1912, el científico alemán Max von Laue y sus colaboradores, estimando que la longitud de onda de los rayos X era similar a la distancia interatómica existente en el arreglo regular periódico de un cristal, demostraron el fenómeno de difracción cuando un haz de rayos X incidía sobre un cristal. Ello no sólo demostró la naturaleza ondulatoria de los rayos X sino también la existencia de un arreglo periódico tridimensional en el cristal, definida por una unidad básica llamada celda unidad [Glusker y Trueblood, 2010].

Luego de los experimentos de Laue, se comprendió que los rayos X son radiaciones electromagnéticas. Ellas pueden ser producidas por la desaceleración de electrones de elevada energía o por transiciones electrónicas que implican electrones de los orbitales internos de los átomos. Su longitud de onda está en el rango de 0,001 nm a 10 nm. Se tiene que cuanto menor es la longitud de onda de los rayos X mayor es su energía y su poder de penetración. Los rayos de mayor longitud de onda cercanos a la banda UV del espectro electromagnético se conocen como rayos X blandos y los de menor longitud, que se encuentran próximos a la zona de los rayos gamma, se conocen como rayos X duros.

Un aspecto importante asociado con la difracción de rayos X es la necesidad de contar con cristales. Un cristal se puede definir como un sólido homogéneo cuyos átomos o moléculas están dispuestos ordenadamente lo que permite definir una unidad básica que se repiten regular e indefinidamente en tres dimensiones. La repetición de esta unidad,

llamada celda unidad, llena completamente el espacio tridimensional, llegando a existir miles de ellas en todas las direcciones.

Mediante el estudio de la interacción de un haz de rayos X con un cristal, llamado comúnmente *patrón de difracción*, se puede obtener información muy precisa sobre la forma y tamaño de la celda unidad y la disposición estructural de los átomos dentro de esta celda. Con esta información se puede reconstruir la estructura cristalina del material, por lo que se pueden establecer las distancias interatómicas, los ángulos de enlace y de torsión, los planos atómicos y moleculares, entre otros aspectos geométricos de la estructura del material. Esta técnica presenta la ventaja que no es destructiva y requiere poca muestra para hacer el estudio. Se debe señalar que el patrón de difracción de un dado material es característico de ese material. Por esta razón las técnicas difractométricas se pueden utilizar para identificar la naturaleza del o los materiales presentes en una muestra [Glusker y Trueblood, 2010].

### **III.2.3.1 Difracción de Rayos X en un material cristalino.**

La mayor parte de los materiales son cristalinos. Como se mencionó con anterioridad, esta cristalinidad lleva implícita la periodicidad tridimensional de la celda unidad. Esta unidad está definida por tres vectores no co-planares **a**, **b** y **c**. La magnitud de estos vectores y los ángulos que se forman entre pares de dichos vectores son los llamados *parámetros o constantes de la celda unidad*: **a**, **b**, **c**,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Como las dimensiones de la celda unidad son del mismo orden de magnitud de la longitud de onda de la radiación de la región de los rayos X, la interacción de este tipo de radiación con la materia genera el fenómeno de difracción, al dispersarse la radiación coherentemente [Glusker y Trueblood, 2010].

En 1913, W.H. Bragg y W.L. Bragg describieron la difracción de cristales de forma más simple tomando en cuenta que el fenómeno de difracción podría ser descrito como una

reflexión de planos en la red. De esta manera, pudieron deducir una expresión sencilla que explica geoméricamente dicho fenómeno.

Para esta deducción, los Bragg consideraron que un haz de rayos X incide a ángulo  $\theta$  sobre un conjunto de planos paralelos, los cuales están separados por una distancia interplanar  $d$ , son difractados como se muestra en la figura 12. Cuando los haces emergen con el mismo ángulo que el que forma el haz incidente con los planos, se puede considerar que estos son haces reflejados por los planos separados por la distancia  $d$  obteniéndose un haz de máxima intensidad cuando las ondas de los haces se encuentran en fase. Esto es, interfieren constructivamente.

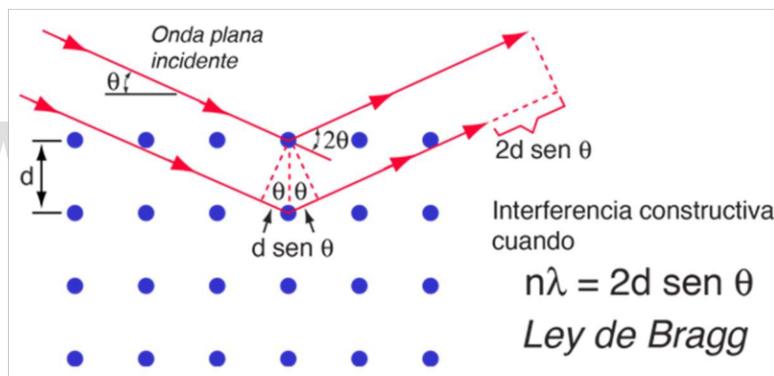


Figura 12. Representación geométrica de la derivación de la Ley de Bragg.

La interferencia constructiva entre las ondas dispersadas por los puntos de la red da lugar a la aparición de haces de rayos X difractados solo cuando ángulos de incidencia satisfacen la ecuación de Bragg, la cual, es la ecuación fundamental de la difracción de rayos X.

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Ec.(1)}$$

La diferencia del camino recorrido entre los dos haces reflejados es de  $2d \sin (\theta)$ . Para que exista una interferencia constructiva, esta diferencia debe ser igual a un múltiplo de la

longitud de onda del haz ( $n\lambda$ ). Así, se obtiene la condición, expresada de forma general en la ecuación 2 de Bragg para la difracción [Glusker y Trueblood, 2010].

En forma general

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} \quad \text{Ec.(2)}$$

donde:  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X

$d_{hkl}$  = es la distancia de separación entre los planos  $hkl$ .

$\theta_{hkl}$  = es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos difractantes.

Cuando un haz de rayos X con una longitud de onda  $\lambda$  incide sobre un cristal, la mayoría de los fotones atraviesan los planos del cristal sin sufrir cambios de dirección. En el proceso, una pequeña porción del haz choca con los electrones de los átomos ordenados en planos, por lo que son dispersados a determinados valores del ángulo  $\theta$ . La resultante son ondas difractadas que surgen con diferentes grados de interferencias constructivas y destructivas. El registro obtenido contiene información sobre la posición e intensidad de cada uno de los máximos de difracción al que, como se mencionó anteriormente, se le denomina patrón de difracción.

### III.2.3.2 Técnicas Difractométricas.

Dependiendo de la naturaleza de la muestra a ser estudiada, las diversas técnicas de difracción pueden clasificarse en dos grandes bloques: Las técnicas de muestras policristalinas y las técnicas de monocristal (o cristal único) [Delgado y Díaz de Delgado, 2004].

#### III.2.3.2.1 Técnicas de Difracción de Muestras Policristalinas.

Este método permite realizar el estudio cristalográfico a muestras que no se pueden obtener en forma de monocristales de cierto tamaño. El método puede ser usado tanto en

análisis cualitativo como cuantitativo. En general, la radiación utilizada es monocromática y el registro del patrón de difracción se suele realizar en modernos difractómetros, controlados por una computadora, que poseen detectores electrónicos.

Cada material presenta un patrón de difracción característico (su “huella dactilar”) por lo que identificando el patrón por comparación con los patrones contenido en una base de datos que contiene casi un millón de patrones de difracción se puede identificar el material que produjo el patrón. En la figura 13 se muestra un difractograma de un determinado material farmacéutico, el cual se expresa en una gráfica de la intensidad vs el ángulo  $2\theta$ . La figura 14 muestra los pasos más importantes del proceso de registro de un patrón de difracción de muestras policristalinas.

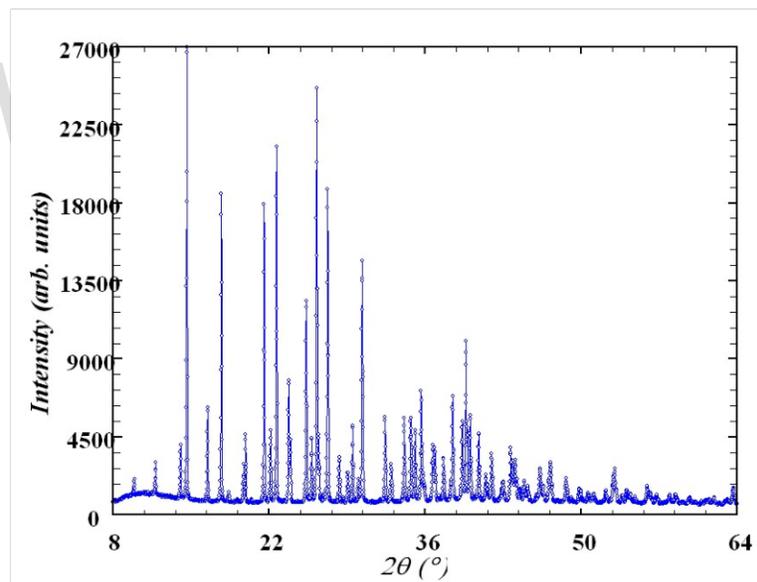


Figura 13. Patrón de difracción de una muestra policristalina.

Los máximos de difracción se observan en forma de picos. A partir de las posiciones de dichos máximos de difracción se determina el tamaño y forma de la celda unidad de la estructura cristalina del material. Por otra parte, la intensidad de los máximos contiene

información sobre el tipo de átomo que forma el material y la naturaleza del arreglo de esos átomos en la celda unidad, esto la estructura. Por último, se puede mencionar la anchura de los máximos de difracción del patrón, la cual contiene información sobre el tamaño de los cristales y las tensiones y defectos de la red cristalina [Delgado y Díaz de Delgado, 2004].

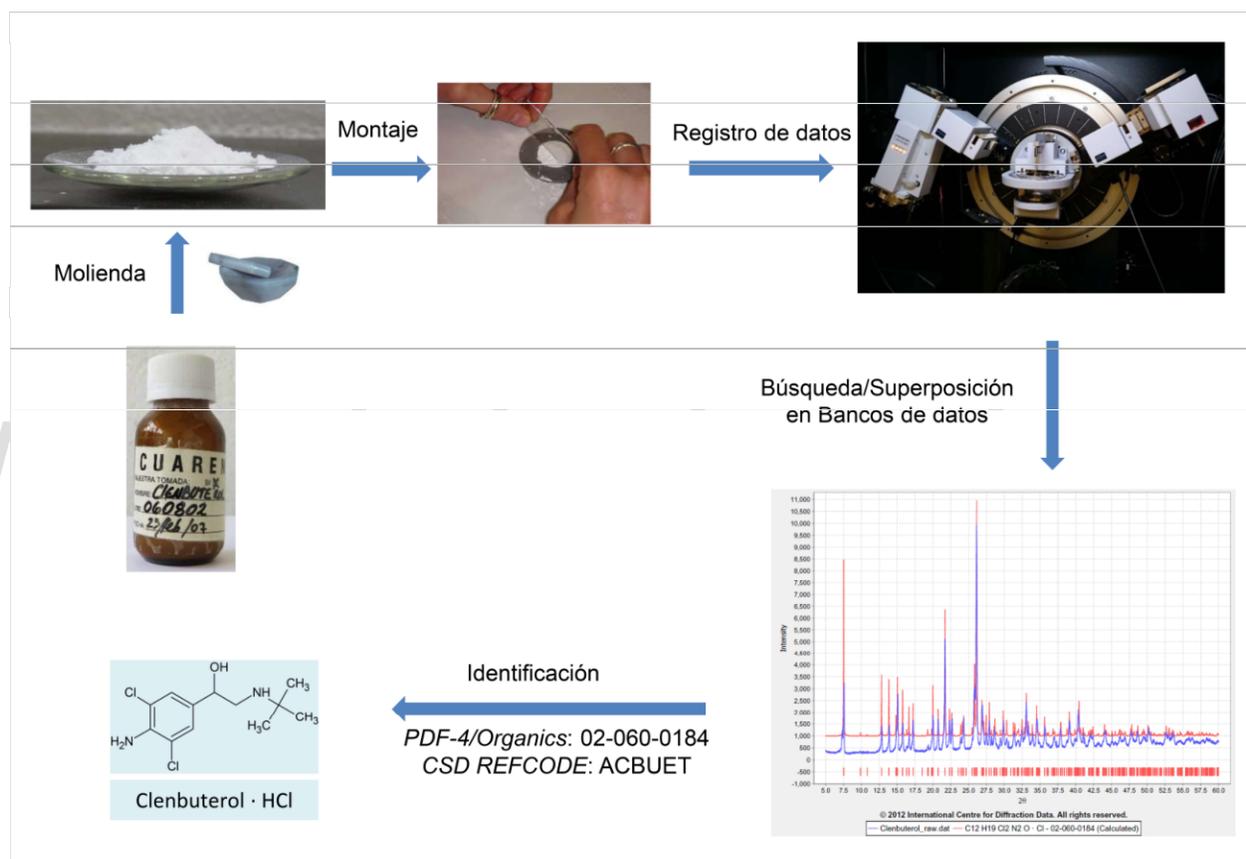
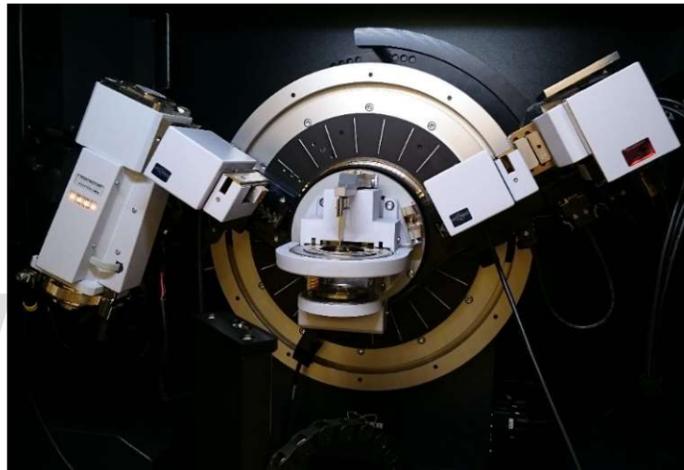


Figura 14. Representación esquemática de los pasos del proceso de registro de un patrón de difracción de muestras policristalinas.

Con el objeto de registrar e indexar debidamente el patrón de difracción de polvo de este material, luego de la recristalización correspondiente, para su eventual incorporación en el banco de datos de polvo *Powder Diffraction File (PDF)* del *International Centre for Diffraction Data (ICDD)* [Gates-Rector y Blanton, 2019] se realizó el registro y análisis de dicho patrón. El registro se realizó con el equipo Bruker D8 Advance, con geometría Bragg-Brentano, del Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander (UIS) de Bucaramanga, Colombia, que se muestra en la figura 15.



*Figura 15. Difractómetro de Rayos X para muestras policristalinas Bruker D8 Advance del Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.*

Se debe mencionar que previamente se realizaron numerosos registros de los patrones de difracción de los materiales obtenidos, luego de los diversos intentos de recristalización de la materia prima suministrada por Laboratorios C.A.M. Estos registros se realizaron en el difractómetro con goniómetro *Philips PW-10 50/25* automatizado por *Crystal Logic, Inc.*, del Laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes (ver figura 16). En este equipo también se registró el patrón de difracción de la materia prima.



*Figura 16. Difractómetro de Rayos X de muestras policristalinas Philips PW 1050/25 automatizado por Crystal Logic, Inc. del Laboratorio de Cristalografía.*

### **III.2.3.2.2 Técnicas de Difracción de Cristal Único**

El registro de los datos de intensidad de cristal único (o monocristal) con los cuales se lleva a cabo la determinación y el refinamiento estructural se realiza mediante un difractómetro controlado por computadora. En general, el procedimiento que se realiza para el análisis por difracción de rayos X de monocristal está compuesto de varias etapas, las cuales se muestran esquemáticamente en la figura 17.

La calidad de los datos que se obtienen depende de la calidad del cristal. Para determinar la calidad del cristal se hace uso de un microscopio óptico con luz polarizada. El cristal apropiado es aquel fragmento homogéneo que no presenta fisuras, conglomerados, incrustaciones de materiales extraños, etc. El tamaño del cristal debe estar entre 0,3 y 0,5 mm (en su máxima dimensión).

Con la ayuda del microscopio de luz polarizada, se pueden escoger aquellos cristales que extingan el haz de luz sistemáticamente cada  $90^\circ$  al ser rotados en el microscopio. Por lo que un buen cristal, cuando se examina bajo la luz polarizada, presenta zonas iluminadas

y oscuras alternadas cada 90°. Si dos o más zonas del cristal se extinguen o iluminan en forma diferente al rotar, se considera que el cristal este maclado, es decir, hay una yuxtaposición de más de un cristal en la muestra analizada. En la figura 18 se muestran cristales de buena y mala calidad.

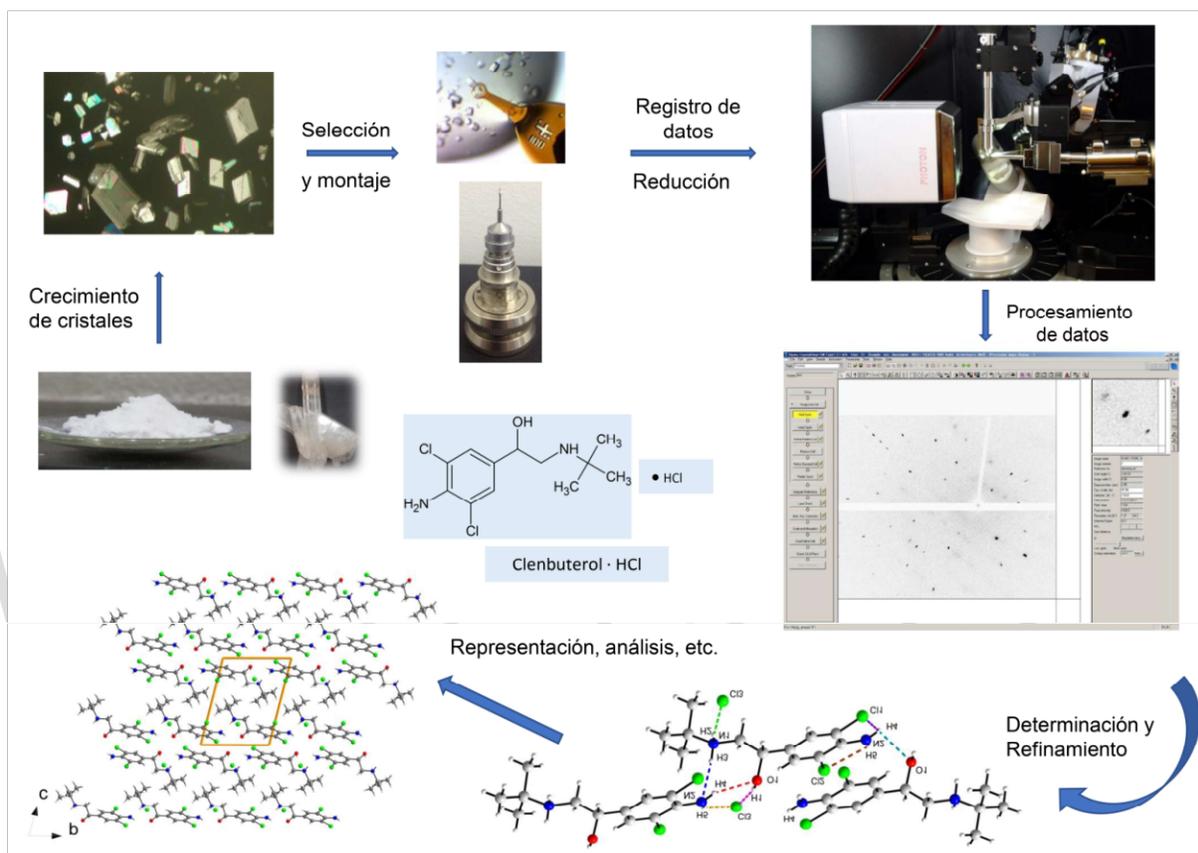


Figura 17. Representación esquemática del proceso de determinación estructural.

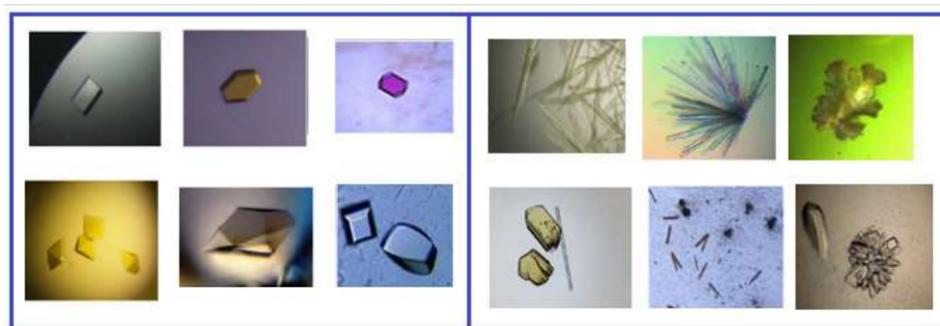


Figura 18. Cristales de buena calidad (izquierda), cristales de mala calidad (derecha).

El registro de la posición y la intensidad de cada uno de los haces difractados constituyen los datos primarios con los cuales se realiza el proceso de determinación estructural. Este proceso se lleva a cabo con el apoyo de sofisticados programas de computación. Debido a la velocidad de registro de los sistemas de detección de los modernos difractómetros, este registro se puede efectuar en pocas horas. Este aspecto es importante cuando se requieren estudiar compuestos como proteínas u otros compuestos orgánicos que pueden ser susceptibles a degradación o descomposición ocasionada por diversos factores, entre ellos los mismos rayos X.

Como sólo se puede registrar la intensidad de los haces difractados y no la fase, el proceso de resolución de estructuras cristalinas se torna más difícil por lo que se debe recurrir a métodos con fundamentos teóricos matemáticos complejos para llevar adelante el proceso de *Determinación Estructural*. Las metodologías más usadas son aquellas que se basan en el uso de la Función de Patterson y los llamados Métodos Directos. Ambas metodologías, junto al proceso de *Refinamiento Estructural*, han sido implementadas en programas de computación de fácil acceso. SHELXT [Sheldrick, 2015a] y SHELXL [Sheldrick, 2015b] son los programas más utilizados para estos fines.

Para el análisis e interpretación de los resultados se utilizan otros programas como PLATON [Spek, 2009], Mercury [Macrae *et al.*, 2020], DIAMOND [Brandenburg, 1999], entre otros. Estos programas permiten visualizar y representar la molécula en tres dimensiones. También ofrecen las facilidades para calcular las distancias de enlace, ángulos de torsión, planos y ángulos entre planos, analizar la existencia de enlaces de hidrógeno, contactos intra- e intermoleculares, visualizar el contenido de la celda unidad, representar la naturaleza del empaquetamiento a lo largo de las direcciones cristalográficamente importante y cualquier otra característica estructural de interés.

Para el registro de los datos de difracción de cristal único se utilizó inicialmente el difractómetro Rigaku XtaLABPro con un goniómetro con geometría Euleriana de 3

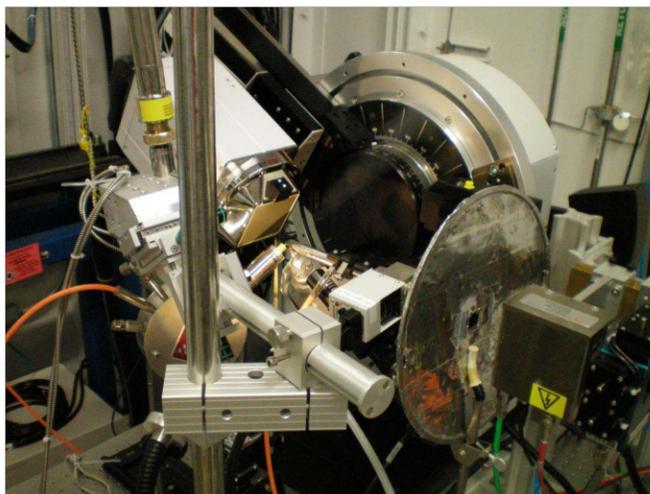
círculos, una fuente dual de Mo/Cu y un detector de área Pilatus 200K. Este equipo, que se muestra en la figura 19, pertenece al Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. A pesar de los numerosos intentos realizados con diferentes fragmentos cristalinos, no se pudo registrar suficientes datos difractométricos que permitieran determinar la estructura del material bajo estudio.



*Figura 19. Difractómetro Rigaku XtaLABPro del Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.*

Debido al tamaño de los cristales obtenidos, en el orden de las micras, se hizo necesario intentar el registro de los datos en un equipo que tuviese una fuente de rayos proveniente de un sincrotrón. Afortunadamente, se logró el acceso a un sincrotrón en los Estados Unidos. El registro de los datos de difracción se llevó a cabo en la línea de Sincrotrón 15-ID del *ChemMatCARS* del *Advanced Photon Source (APS)* del *Argonne National Laboratory*, Illinois, EUA, en el marco del Programa *SCrAPS*, en colaboración con el *Indiana University Molecular Structure Center (IUMSC)*. Se utilizó un goniómetro Bruker D8 con eje  $\chi$  fijo y rotación en  $2\theta$  del detector APEX2 CCD. La longitud de onda seleccionada fue  $0,41328 \text{ \AA}$  (ver figura 20). Se tomaron un total de 123577 reflexiones en 1082 “frames” en el rango  $1,716^\circ \leq \theta \leq 19,915^\circ$  en dos conjuntos de barrido en  $\phi$  cada

0,50° con un tiempo de conteo de 0,30 s por *frame*. El registro de datos, refinamiento de los parámetros de la celda unidad y la reducción de datos se llevó a cabo con los programas APEX2 y SAINT V8.34A, ambos propiedad de Bruker.



*Figura 20. Difractómetro de Rayos X de Cristal Único de la estación de trabajo 15-1D, ChemMatCARS, del Argonne National Laboratory, EUA.*

La determinación de la estructura cristalina y molecular del estolato de eritromicina se realizó luego de un análisis exhaustivo del conjunto de datos de intensidades obtenido, mediante la estrategia de Métodos Directos. Se usó esta metodología debido a que el compuesto bajo estudio contiene sólo átomos livianos (C, H, N, S, O). Dicha estrategia se desarrolló empleando el programa SHELXT [Sheldrick, 2015a], el cual permite la elaboración de un modelo estructural inicial para posteriormente efectuar un refinamiento estructural, empleando el programa SHELXL [Sheldrick, 2015b]. Este programa de refinamiento estructural utiliza la rutina de los mínimos cuadrados. Luego de determinar y refinar la estructura se analizaron las distancias y ángulos de enlace de los átomos que la constituyen con el programa PLATON [Spek, 2009]. Por último, se procedió a la representación tridimensional de la estructura, usando el programa DIAMOND [Brandenburg, 1999].

## IV. Hipótesis

La cristalización del estolato de eritromicina puede producir cristales de calidad y tamaño adecuado para que se pueda, por técnicas de difracción de cristal único, determinar la estructura cristalina y molecular del material, no reportada hasta ahora.

## V. Objetivos

### V.1 Objetivo General

Determinar la estructura cristalina del estolato de eritromicina, un Principio Farmacéuticamente Activo (PFA) ampliamente usado en nuestro país.

### V.2 Objetivos Específicos

- a) Preparar cristales de calidad y tamaño adecuado que permitan la determinación de la estructura cristalina del material.
- b) Caracterizar el estolato de eritromicina mediante espectroscopía infrarroja *FT-IR* y métodos térmicos convencionales: *TGA* y *DSC*.
- c) Registrar e Indexar el patrón de difracción de rayos X de muestras policristalinas del estolato de eritromicina.
- d) Determinar la estructura cristalina y molecular del estolato de eritromicina, por difracción de rayos X de cristal único.

## VI. Resultados y Discusión.

### VI.1. Cristalización del Estolato de Eritromicina

En las pruebas de solubilidad del estolato de eritromicina materia prima se utilizaron varios solventes, entre ellos cloroformo, 2-propanol, metanol, etanol, acetona y agua destilada y mezclas de ellos. Se observó que el material bajo estudio es insoluble en cloroformo, 2-propanol, metanol y etanol. Resultó soluble en acetona y agua y, por supuesto, en mezclas acetona: agua. En la tabla 2 se muestran el resultado de algunas de las pruebas de solubilidad realizadas.

Tabla 2. Pruebas de Solubilidad del Estolato de Eritromicina materia prima

Solvente	Soluble	Insoluble
Cloroformo		<b>X</b>
2-propanol		<b>X</b>
Metanol		<b>X</b>
Etanol		<b>X</b>
Acetona	<b>X</b>	
Agua	<b>X</b>	
Mezcla acetona:agua	<b>X</b>	

Para la cristalización del estolato de eritromicina se prepararon varias soluciones en agua, acetona y en diversas mezclas acetona: agua. Los envases que contenían estas soluciones se cubrieron con papel parafinado para disminuir la velocidad del proceso de evaporación del solvente a fin de facilitar la formación de núcleos de cristalización y el crecimiento de dichos núcleos. De todas las experiencias realizadas, los intentos exitosos se obtuvieron en una mezcla acetona: agua 1:1 con 1,50 g de estolato de eritromicina materia prima. Luego de un mes y medio, se obtuvieron cristales muy pequeños, en el orden las micras,

en forma de placas (elongadas e incoloras), con lo que se intentó realizar el registro de datos de difracción de cristal único (ver figura 21). De este recipiente se separó una cantidad suficiente de material cristalino al que se le realizaron los estudios por espectroscopía infrarroja y los estudios térmicos.



Figura 21. Cristales de Estolato de Eritromicina obtenidos.

## **VI.2. Caracterización del Estolato de Eritromicina mediante *FT-IR*.**

La caracterización, tanto del principio activo obtenido como materia prima suministrada por Laboratorios C.A.M. y como del material recristalizado obtenido en el presente trabajo, se realizó inicialmente mediante espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier, *FT-IR*. Para este fin se utilizó el equipo marca Perkin Elmer modelo RX1, del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, con la asesoría de la Licenciada Iris Santos. En la figura 22 se muestra el equipo utilizado. Pequeñas porciones de cada uno de estos materiales, previamente pulverizadas en un mortero de ágata, se mezcló con bromuro de potasio (KBr) de alta pureza para formar las correspondientes pastillas. Estas se colocaron en el espectrofotómetro infrarrojo para el registro de los espectros.

En el espectro infrarrojo registrado para la materia prima se presenta en la figura 22, destacándose las distintas bandas de absorción observadas para este material. Por otra parte, en la tabla 3 se encuentran las asignaciones de los correspondientes grupos funcionales a cada una de las bandas de absorción observadas en dicho espectro.

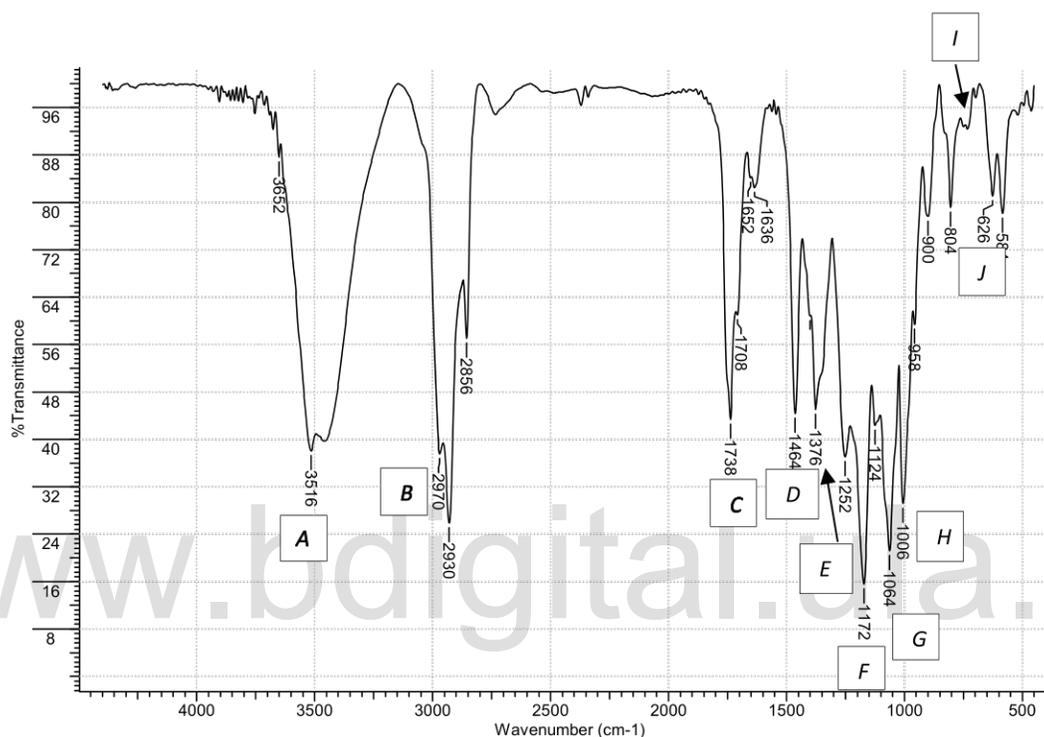


Figura 22. Espectro FT-IR registrado para el Estolato de Eritromicina materia prima.

Tabla 3. Señales características observadas en el espectro FT-IR del Estolato de Eritromicina materia prima

Banda	Vibración característica	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad
A	Tensión O-H	~3516	Fuerte
B	Tensión C-H	2970-2856	Fuerte
C	Tensión C=O	1738-1708	Fuerte
D	Deformación C-H	1464	Media
E	Tensión S=O	1376	Fuerte
F	Tensión C-O-C Asimétrica	1172	Fuerte
G	Tensión C-O-C simétrica	1062	Media
H	Tensión C-O	1004	Media
I	Balaceo CH <sub>2</sub> (cadena larga del estolato).	732	Media
J	Deformación O-H fuera del plano	626	Media

En la figura 23 se presenta el espectro FT-IR del estolato de eritromicina recristalizado con sus respectivas bandas de absorción características y sus asignaciones correspondientes.

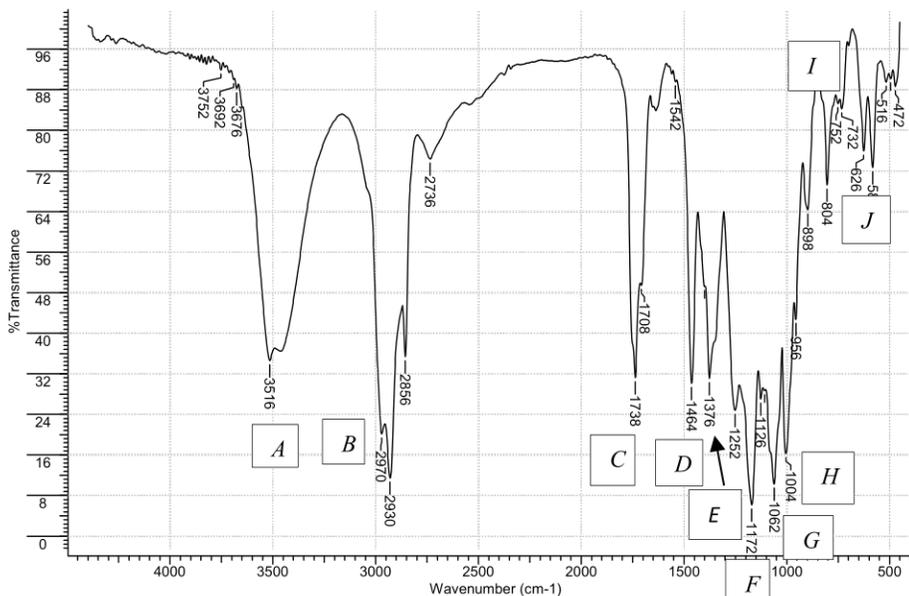


Figura 23. Espectro FT-IR registrado para el Estolato de Eritromicina recristalizado

En la tabla 4 se muestran las bandas observadas, sus frecuencias características y sus intensidades relativas observadas en el espectro infrarrojo del estolato de eritromicina recristalizado.

Tabla 4. Señales características observadas en el espectro FT-IR del estolato de eritromicina recristalizado.

Banda	Vibración característica	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad
A	Tensión O-H	~3516	Fuerte
B	Tensión C-H	2970-2856	Fuerte
C	Tensión C=O	1738-1708	Fuerte
D	Deformación C-H	1464	Media
E	Tensión S=O	1376	Fuerte
F	Tensión C-O-C asimétrica	1172	Fuerte
G	Tensión C-O-C simétrica	1062	Media
H	Tensión C-O	1004	Media
I	Balaceo CH <sub>2</sub> (cadena larga del estolato).	732	Media
J	Deformación O-H fuera del plano	626	Media

### VI.3. Análisis Térmico del Estolato de Eritromicina.

En el termograma de la figura 24 se puede apreciar claramente el cambio significativo del estolato de eritromicina materia prima en función de la temperatura. En el proceso de calentamiento desde la temperatura ambiente hasta los 300 °C se observa una pérdida de masa del 8,246 % equivalente a 0,6760 mg. Esta pérdida se correlaciona con la endoterma observada alrededor de la temperatura de 154-156 °C. En este mismo rango de temperatura se observó la fusión del estolato de eritromicina en el fusiómetro del Laboratorio 2 de Química.

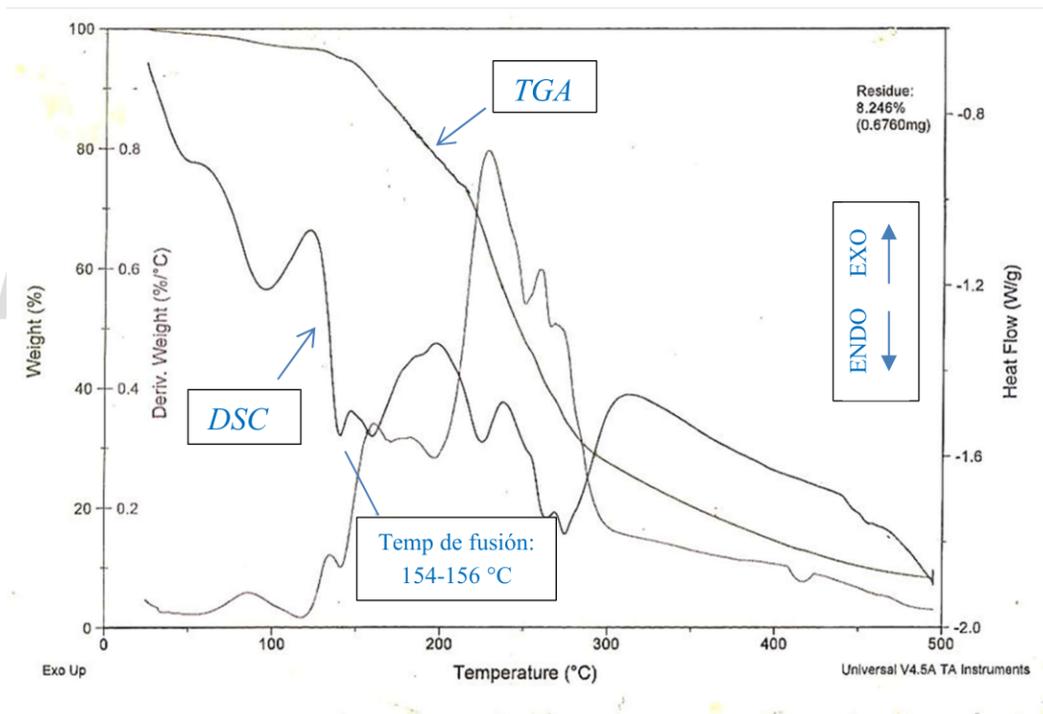


Figura 24. Termograma TGA-DSC del Estolato de Eritromicina materia prima

De igual manera, en el proceso de calentamiento desde la temperatura ambiente hasta los 300 °C del termograma del estolato de eritromicina recristalizado (figura 25) se observa la misma pérdida de masa, esta vez de un 10,81% equivalente a 0,8419 mg. Esta pérdida

corresponde con la endoterma observada aproximadamente en 154-156 °C que, como se mencionó anteriormente, corresponde a la fusión del estolato de eritromicina.

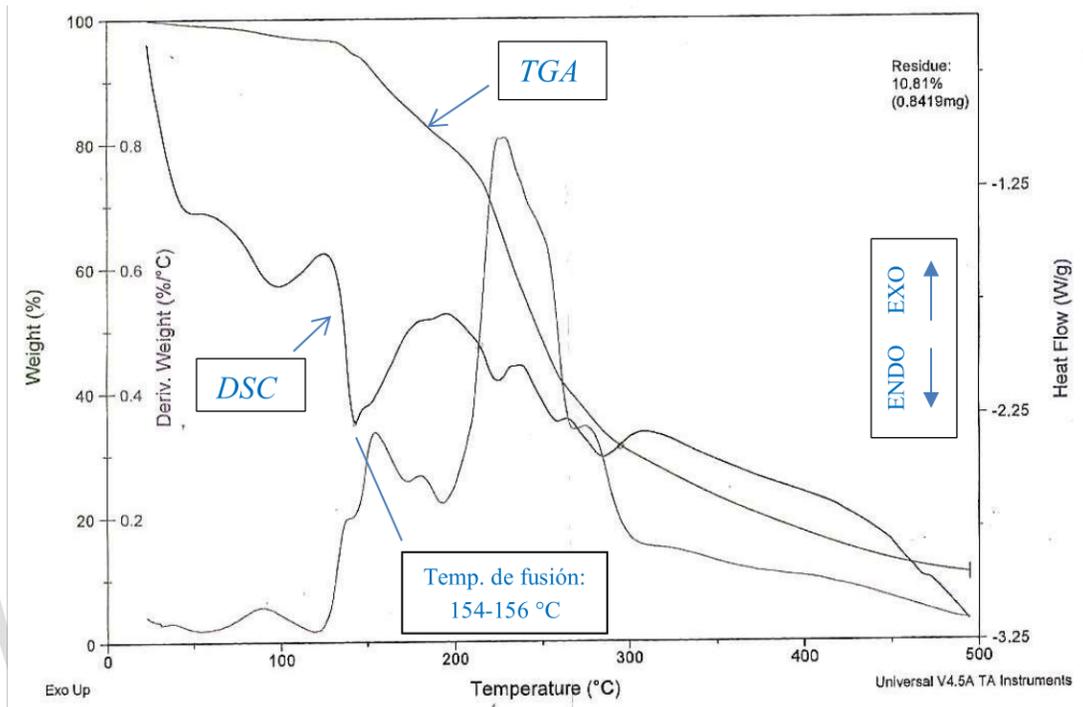


Figura 25. Termograma TGA-DSC del Estolato de Eritromicina recristalizado.

#### VI.4 Caracterización mediante Difracción de Rayos X de Muestras Policristalinas del Estolato de Eritromicina.

El patrón registrado para el estolato de eritromicina materia prima, usando el difractómetro con un goniómetro Philips PW-10 50/25 del Laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes, se presenta en la figura 26 mientras que el patrón del material recristalizado, registrado en el equipo Bruker D8 Advance del Laboratorio de Rayos X de la UIS, Bucaramanga, Colombia, se presenta en la figura 27. Para una mejor comparación de dichos patrones de difracción se muestra la superposición de ambos en la figura 28.

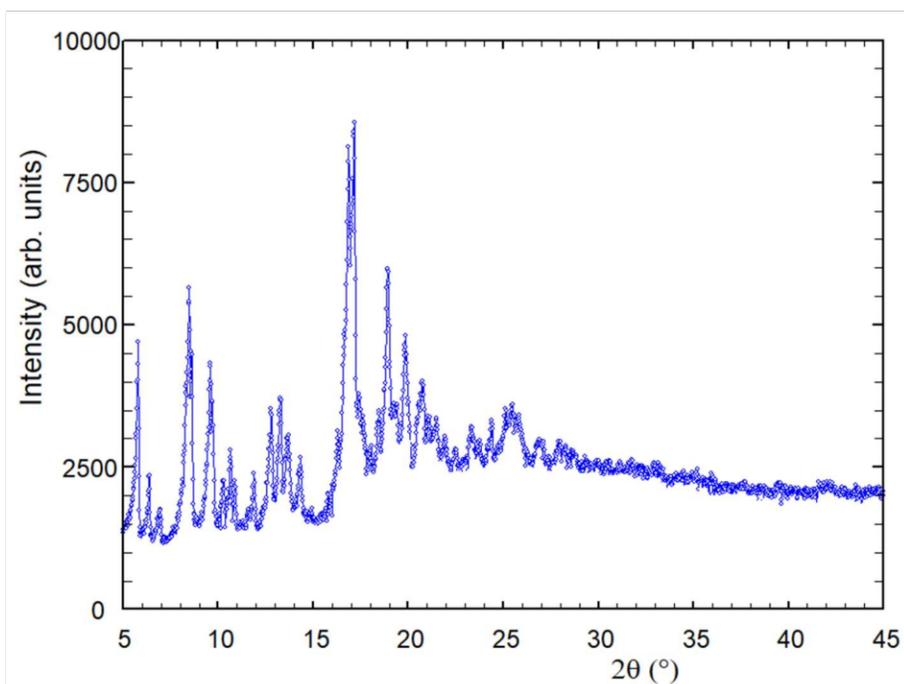


Figura 26. Patrón de difracción del Estolato de Eritromicina materia prima, registrado en el equipo Philips PW 1050/25 del Laboratorio de Cristalografía.

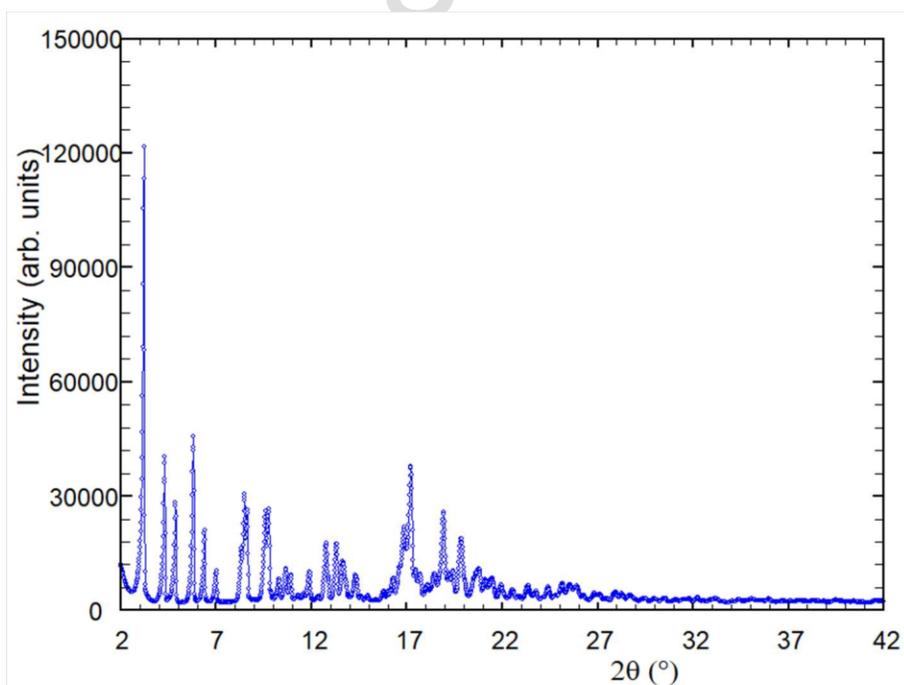


Figura 27. Patrón de difracción del Estolato de Eritromicina recristalizado, registrado en el equipo Bruker D8 Advance del Laboratorio de Rayos X de la UIS, Bucaramanga, Colombia.

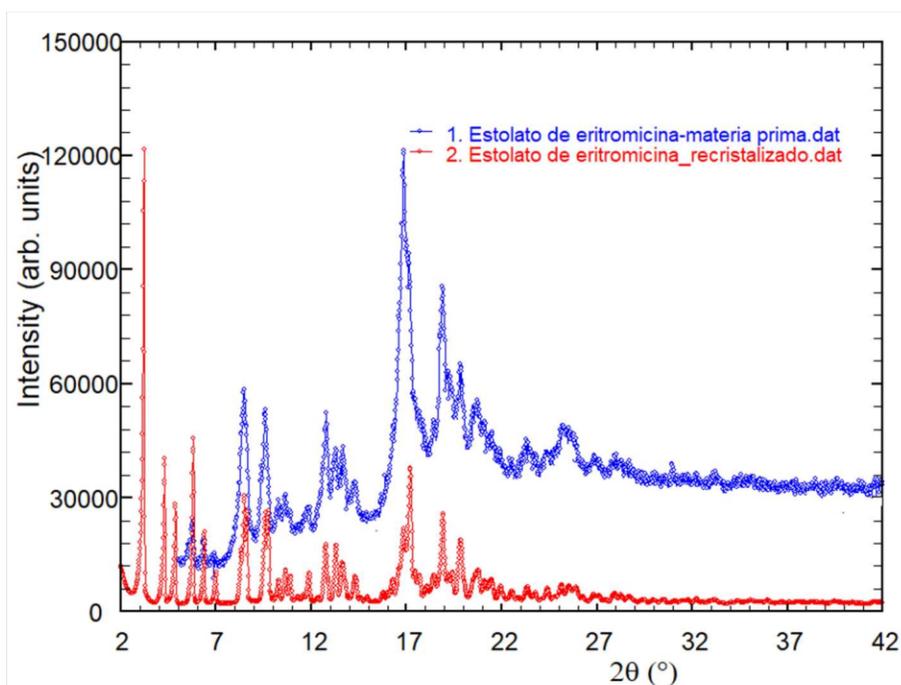


Figura 28. Superposición del patrón de difracción registrado para el Estolato de Eritromicina materia prima y el del material recristalizado.

www.bdigital.ula.ve

Este difractor, de mejor resolución, está equipado con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,54187$  Å), operando a 40 kV y 30 mA y un detector electrónico *LynxEye*. El patrón se registró en pasos de  $0,0156^\circ$  ( $2\theta$ ), desde  $2^\circ$  a  $42^\circ$ , a 5 segundos por paso. El indexado de este patrón, realizado con el programa DICVol04 [Louër *et al.*, 2004], condujo a la celda triclinica cuyos parámetros se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros de celda obtenidos a partir del patrón de difracción de polvo para el estolato de eritromicina recristalizado.

Parámetros de celda	Valor
$a$ (Å)	10,960(14)
$b$ (Å)	21,013(29)
$c$ (Å)	28,219(06)
$\alpha$ (°)	100,49(5)
$\beta$ (°)	93,64(8)
$\gamma$ (°)	91,82(7)

Luego del indexado se realizó el análisis del patrón de difracción con el programa NBS\*AIDS 83 [Mighell et al., 1983]. Se evaluaron las figuras de méritos correspondientes. En la tabla 6 se presenta el resultado de dicho análisis.

*Tabla 6. Indexado del patrón de difracción registrado para el Estolato de Eritromicina recristalizado.*

$h$	$k$	$l$	$2\theta_{obs}$	$d_{obs}$	$2\theta_{calc}$	$d_{calc}$	$\Delta 2\theta$
1	0	0	3,184	27,7294	3,181	27,7528	0,003
0	1	0	4,273	20,6631	4,269	20,6824	0,004
1	-1	0	4,837	18,2561	4,832	18,2718	0,004
1	1	0	5,776	15,2876	5,781	15,2741	-0,005
2	0	0	6,370	13,8639	6,373	13,8577	-0,003
2	-1	0	6,987	12,6409	6,988	12,6390	-0,001
2	1	0	8,315	10,6254	8,308	10,6338	0,007
0	1	1	8,465	10,4367	8,472	10,4281	-0,007
0	2	0	8,595	10,2797	8,552	10,3308	0,043
0	2	1	9,573	9,2312	9,598	9,2077	-0,024
3	-1	0	9,730	9,0824	9,735	9,0781	-0,005
2	0	-1	10,285	8,5939	10,273	8,6036	0,012
3	-1	-1	10,645	8,3037	10,646	8,3032	-0,001
3	-2	-1	10,892	8,1163	10,887	8,1201	0,005
2	2	0	11,591	7,6281	11,586	7,6314	0,005
0	1	-1	11,881	7,4425	11,886	7,4395	-0,005
4	0	0	12,768	6,9277	12,774	6,9241	-0,007
2	-3	0	13,293	6,6552	13,252	6,6759	0,042
1	3	1	13,644	6,4848	13,657	6,4786	-0,013
4	-3	-1	14,320	6,1803	14,329	6,1763	-0,009
3	2	1	15,779	5,6118	15,817	5,5986	-0,037
1	-2	-2	16,265	5,4451	16,292	5,4362	-0,027
2	-2	1	16,624	5,3285	16,612	5,3322	0,012
1	-4	0	16,839	5,2609	16,864	5,2532	-0,025
0	4	0	17,190	5,1541	17,161	5,1628	0,029
0	1	2	17,441	5,0807	17,422	5,0860	0,019
0	3	2	17,681	5,0121	17,652	5,0204	0,029
1	4	0	18,060	4,9078	18,036	4,9143	0,024
5	-4	-1	18,442	4,8070	18,442	4,8072	0,001
3	-5	-1	18,912	4,6886	18,872	4,6984	0,040
6	0	0	19,213	4,6158	19,216	4,6150	-0,003
0	5	1	19,410	4,5695	19,380	4,5765	0,030

Continuación de la Tabla 6.

<i>h</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	$2\theta_{obs}$	$d_{obs}$	$2\theta_{calc}$	$d_{calc}$	$\Delta 2\theta$
2	-3	1	19,843	4,4706	19,846	4,4700	-0,003
1	-5	-2	20,751	4,2771	20,727	4,2819	0,024
0	1	-2	21,119	4,2033	21,083	4,2104	0,036
5	2	1	21,431	4,1429	21,449	4,1394	-0,018
3	1	-2	21,943	4,0474	21,954	4,0453	-0,011
7	-2	0	22,540	3,9415	22,519	3,9451	0,021
0	6	1	23,337	3,8087	23,368	3,8037	-0,031
7	-3	0	23,748	3,7436	23,766	3,7409	-0,017
1	-2	2	24,408	3,6439	24,411	3,6434	-0,004
1	-2	-3	25,129	3,5409	25,165	3,5360	-0,035
1	-6	0	25,495	3,4909	25,465	3,4949	0,029
1	6	2	25,918	3,4349	25,890	3,4386	0,028

Las figuras de mérito obtenidas,  $M_{20}=14,2$  y  $F_{20}=53,0(0,0066, 57)$ , evidencian que el indexado fue satisfactorio y que la celda unidad obtenida reproduce adecuadamente la posición de los máximos de difracción registrados.

## VI.5. Determinación de la estructura del Estolato de Eritromicina.

Como se mencionó anteriormente, luego de numerosos intentos de recristalización, se obtuvieron algunas placas elongadas incoloras muy pequeñas en una solución 1:1 de agua y acetona. Luego de haber examinado en el difractómetro los monocristales seleccionados con el microscopio óptico, se escogió el que mostró los mejores máximos de difracción. Esto es, picos intensos relativamente bien definidos. Para este proceso se utilizó el programa CrysAlisPro [Rigaku, 2015] producido por la compañía fabricante del difractómetro de cristal único del Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander, de Bucaramanga, Colombia. Como parte de esta evaluación previa, se indexan los datos, precisando para cada reflexión su intensidad, con la correspondiente incertidumbre estándar y los índices de Miller.

El registro de los datos de intensidad consiste en alinear el cristal en el centro óptico del difractómetro, indexar las reflexiones registradas, determinar la celda unidad y el posible grupo espacial en el cristaliza el material. Igualmente, se debe ajustar los parámetros instrumentales que permitan el mejor registro posible.

A pesar del esfuerzo realizado, no se pudieron registrar datos de suficiente calidad que permitieran realizar exitosamente el proceso de determinación estructural, por el tamaño demasiado pequeño de los cristales. Se consideró necesario utilizar radiación de sincrotrón, que es más intensa que la radiación del tubo de Mo del difractómetro de la UIS. Adicionalmente, la radiación de sincrotrón permite el registro de datos en cristales mucho más pequeños que los que se requieren para radiación convencional.

El registro de los datos de difracción con radiación de sincrotrón se llevó a cabo en la línea de Sincrotrón 15-ID del *ChemMatCARS* del *Advanced Photon Source* (APS) de *Argonne National Laboratory*, Illinois, EUA.

Los programas SHELXT [Sheldrick, 2015a] y SHELXL [Sheldrick, 2015b] se utilizaron para la determinación y el refinamiento de la estructura, respectivamente, a través de la interfase gráfica shelXle [Hübschle *et al.*, 2011]. Para el análisis de distancias, ángulos de enlace y enlaces de hidrógeno, graficación, validación y preparación de archivos para publicación se utilizaron los programas PLATON [Spek, 2009], Mercury [Macrae *et al.*, 2020], DIAMOND [Brandenburg, 1999] y enCIFer [Allen *et al.*, 2004]. La Tabla 7 contiene los datos cristalinos y condiciones experimentales del registro de datos.

La determinación estructural del Estolato de Eritromicina ha mostrado ser un problema difícil. El análisis de los datos indica que la estructura se puede representar en una celda triclinica, con cuatro moléculas independientes en la celda unidad, la cual concuerda con la celda obtenida en el análisis de los patrones difracción de muestras policristalinas. Los parámetros de la celda triclinica obtenida en el estudio por monocristal se presentan en la

Tabla 7. Dado que la molécula de Eritromicina es quiral, el grupo espacial en el que cristaliza no debe contener centros de inversión ni planos especulares. En el sistema triclinico, este sería el grupo espacial  $P1$ .

Tabla 7. Datos Cristalinos y Condiciones Experimentales del registro de Datos de Difracción de Cristal Único del Estolato de Eritromicina.

Fórmula molecular	$C_{52}H_{97}NO_{18}S$		
Peso fórmula	1056.40		
Sistema cristalino	Triclinico	Monoclinico	Monoclinico
Grupo espacial	$P1$	$C2$	$I2$
$a$	10,7710(12)	40,812(4)	31,3343(21)
$b$	21,1027(28)	10,775(1)	10,7354(8)
$c$ (Å)	28,4213(33)	31,376(4)	37,5294(26)
$\alpha$	77,02(1)	90	90
$\beta$	79,11(1)	119,005(4)	107,84(1)
$\gamma$ (°)	75,22(1)	90	90
$V$ (Å <sup>3</sup> )	6026,99(51)	12067,17(2)	12017,21(3)
$Z$	4	8	8
$D_c$ (g cm <sup>-3</sup> )	1,16	1,16	1,17
<b>Datos Experimentales</b>			
Línea de sincrotrón	15-ID ChemMatCARS / APS / ANL		
Goniómetro	Bruker D8		
Detector	APEXII CCD		
Tamaño del cristal (mm)	0,08 x 0,06 x 0,04 mm <sup>3</sup>		
Color y morfología	Placas elongadas incoloras		
Temperatura (K)	173		
Radiación / Longitud de onda (Å)	Sincrotrón / 0,41328		
$\theta$ Min / Max (°)	1,716° ≤ $\theta$ ≤ 19,915°		
Tipo de barrido	Barridos en $\omega$ cada 0,50° a 0,30 s por imagen.		
Número de reflexiones / Número de imágenes	123.577 / 1.082		

La Figura 29 muestra el mapa de densidades electrónicas obtenido con el programa SHELXS. El análisis de este mapa se debe hacer utilizando la información de distancias y ángulos de enlace producida por este mismo programa y de la cual se presenta una muestra en la Tabla 8. Dado que cada unidad de estolato de eritromicina tiene como

fórmula  $C_{52}H_{97}NO_{18}S$  y que hay 4 de estas unidades en la celda unidad, se requiere identificar  $72 \times 4 = 288$  átomos diferentes.

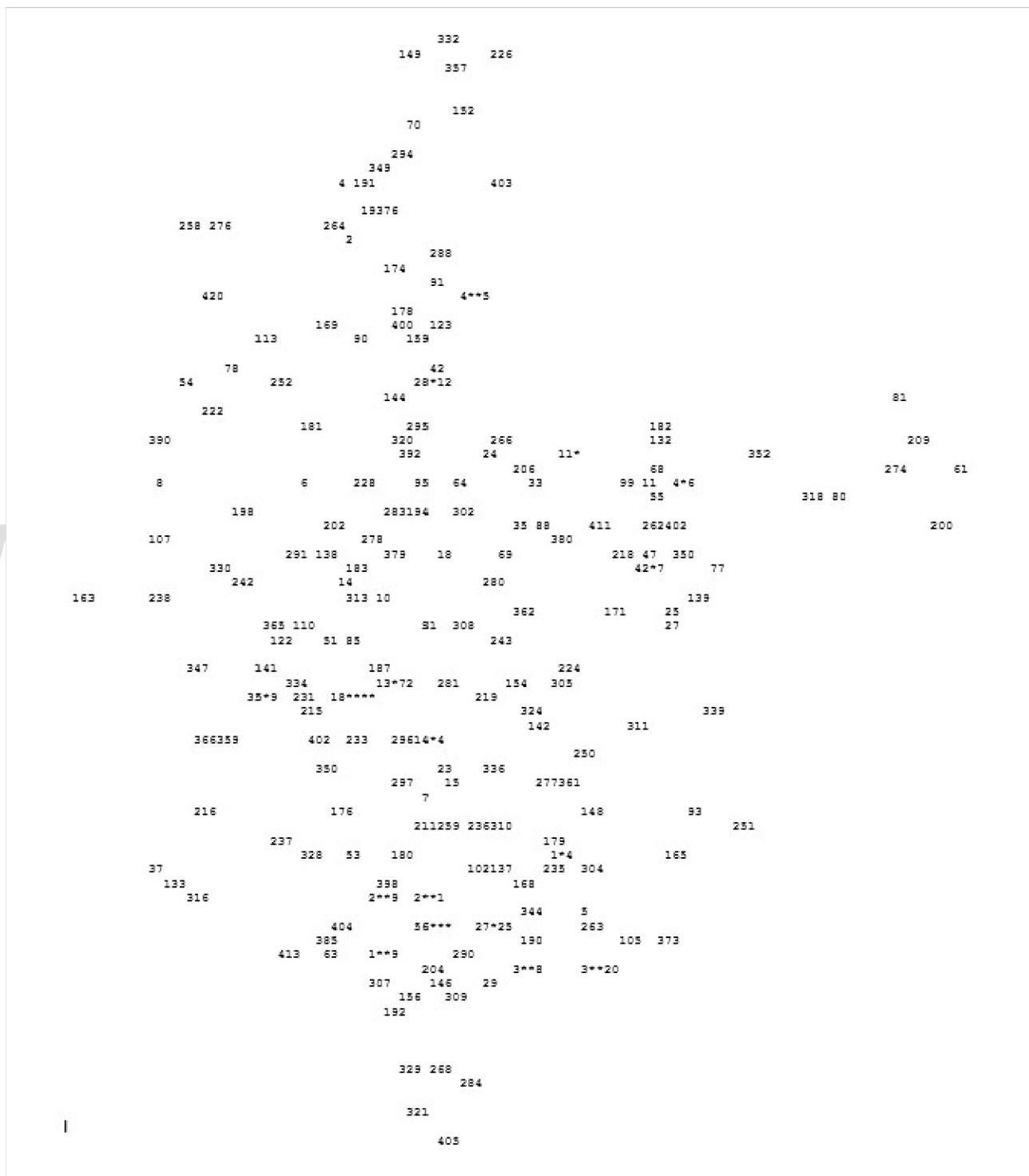


Figura 29. Mapa de densidades electrónicas obtenido con el programa SHELXS.

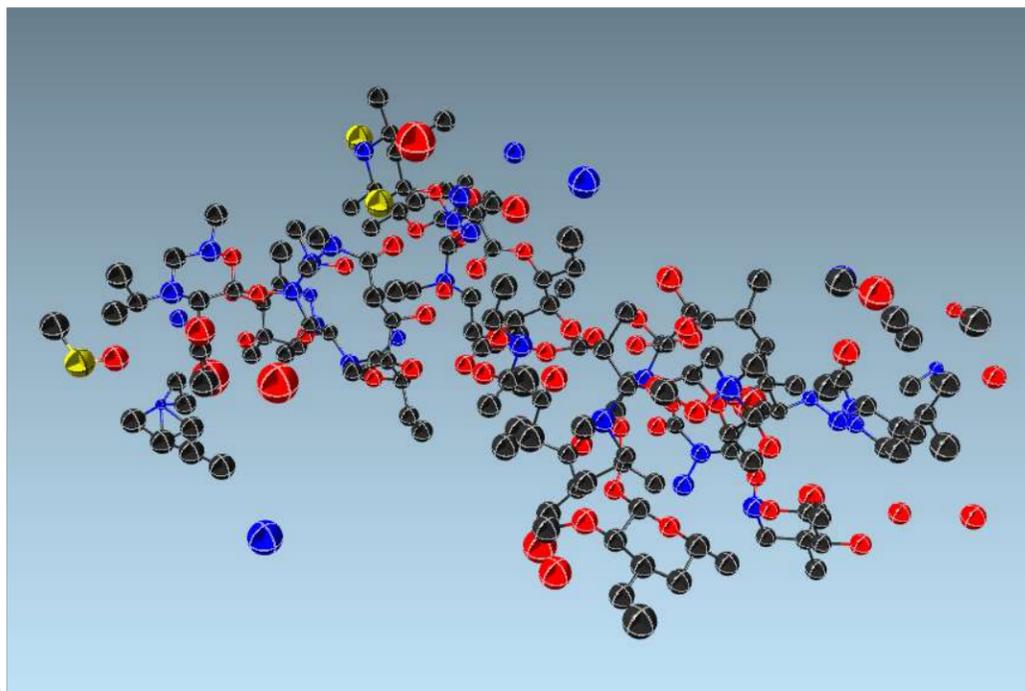
Tabla 8. Parte de los resultados del programa SHELXS para la determinación de la estructura del Estolato de Eritromicina.

Atom Peak	x	y	z	SOF	Height	Distances and Angles	
S1	0.	-0.0077	0.3877	0.1634	1.000	2.66	0 10 1.178 0 14 2.161 6.9 0 15 3.028 120.8 118.2 0 18 2.190 87.3 93.1 135.9 0 35 2.711 110.0 110.1 126.0 58.5 0 51 3.052 43.9 37.7 87.2 130.5 121.9 0 64 3.230 83.3 87.2 152.7 22.6 41.8 120.1 0 69 2.495 114.8 117.8 124.0 39.1 24.7 142.9 32.1 0 74 2.163 115.1 113.2 7.8 133.8 133.1 85.1 153.7 128.5 0 85 1.720 37.0 36.6 84.6 110.9 146.7 37.3 116.2 147.9 78.4 0 88 3.225 118.7 121.0 120.5 46.6 19.4 140.8 37.7 7.5 125.8 153.9 0 95 2.989 62.1 63.2 167.8 53.6 48.2 88.8 33.4 56.4 172.7 99.1 58.1 0 110 3.150 27.6 23.6 94.6 113.9 129.8 21.6 110.7 141.4 90.0 19.8 143.8 0 131 1.612 69.3 65.7 52.8 146.8 151.0 37.2 152.6 174.1 49.0 37.5 166.6 0 138 2.801 20.3 27.2 128.1 69.3 105.9 63.5 70.4 102.3 120.8 45.8 108.1 0 142 3.019 157.0 150.8 43.2 115.7 82.8 113.2 117.1 85.1 50.4 126.4 79.7 0 145 2.669 111.6 115.1 47.2 92.7 127.2 110.5 114.9 105.9 42.3 82.1 108.7 0 154 2.370 138.1 131.2 54.1 126.5 76.5 96.4 117.6 88.6 61.9 122.5 81.6 0 183 2.987 37.8 31.4 113.4 109.2 95.2 28.9 93.4 114.1 112.7 56.4 112.8 0 185 3.043 59.9 55.7 63.4 143.3 144.6 26.2 142.9 168.6 60.1 32.5 163.8 0 187 2.232 61.1 55.3 70.0 148.4 127.5 18.1 137.2 152.0 68.8 44.4 146.6 0 194 2.914 69.2 74.8 148.1 18.2 65.7 112.3 24.0 52.3 143.3 95.9 59.2 0 202 3.188 21.7 19.6 133.7 85.0 90.7 47.0 73.4 101.2 130.2 56.0 103.1 0 219 3.134 111.7 104.9 54.8 149.2 91.5 69.3 132.0 110.2 60.9 98.0 102.7
2	72.	-0.1412	0.6398	-0.0817	1.000	2.87	0 4 1.273 0 76 0.978 69.6 0 174 1.179 143.7 74.4 0 191 1.063 55.4 61.7 110.2 0 193 1.607 48.2 61.7 109.3 94.9 0 264 0.786 76.8 120.8 127.8 59.1 121.9 0 288 1.968 110.1 41.8 33.6 93.1 82.7 141.9 0 294 1.892 54.9 35.8 96.9 26.1 78.2 85.0 71.3 0 349 1.896 27.4 43.4 116.4 57.1 37.9 99.5 82.8 42.1
3	72.	-0.1178	0.3096	0.0090	1.000	3.56	0 11 1.671 0 114 1.432 105.5 0 182 1.698 40.1 98.3
4	71.	-0.2172	0.6925	-0.1002	1.000	2.63	0 2 1.273 0 76 1.306 44.5 0 191 1.102 52.6 50.8 0 193 1.215 80.5 69.1 119.3 0 264 1.334 35.0 71.1 44.3 113.2 0 294 1.559 83.2 50.3 42.1 105.5 86.3 0 349 0.965 115.2 72.0 100.5 63.8 140.8 59.9
5	70.	0.3244	0.0065	0.2489	1.000	4.21	0 16 1.376 0 46 1.313 137.4 0 105 1.513 129.3 38.9 0 304 1.142 48.1 104.9 81.6
6	70.	0.0020	0.5705	0.0891	1.000	2.46	0 138 1.819 0 181 1.431 116.2 0 202 1.100 71.3 137.8

Utilizando el programa SHELXT, se obtuvo una asignación automática de los átomos. Aunque algunas asignaciones no son las apropiadas, el uso de este programa facilita en cierta medida la identificación de algunas partes de las unidades eritromicina y estolato. La Figura 30(a) muestra de manera gráfica la asignación de los átomos. La Figura 30(b) muestra dos de las cuatro moléculas independientes. Se puede notar que algunos átomos del anillo macrocíclico y de los monosacáridos se han identificado como nitrógenos en lugar de oxígenos o carbonos. El análisis minucioso de esta asignación de átomos y los sucesivos mapas de diferencias de Fourier revelaron la estructura molecular de la

eritromicina y algunos de los átomos de la unidad estolato, fundamentalmente los átomos de azufre y de oxígeno.

a)



b)

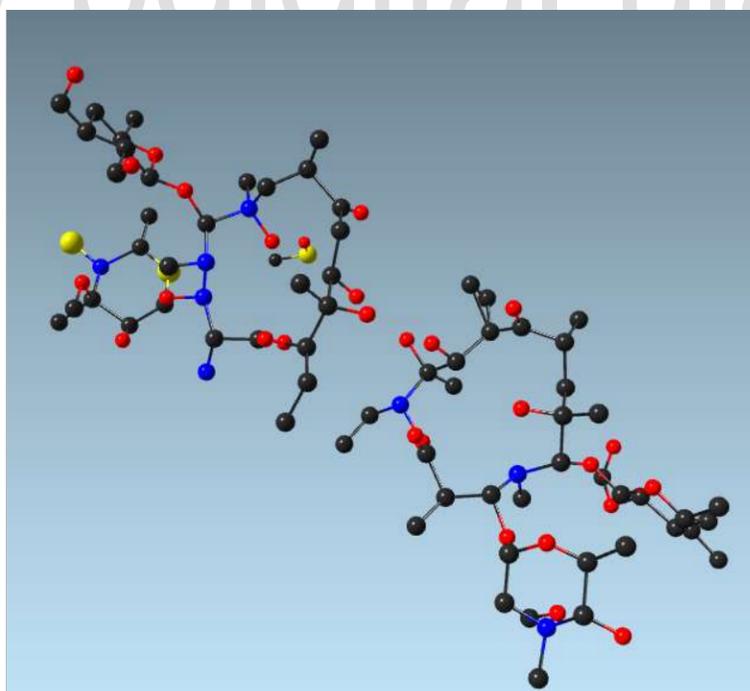
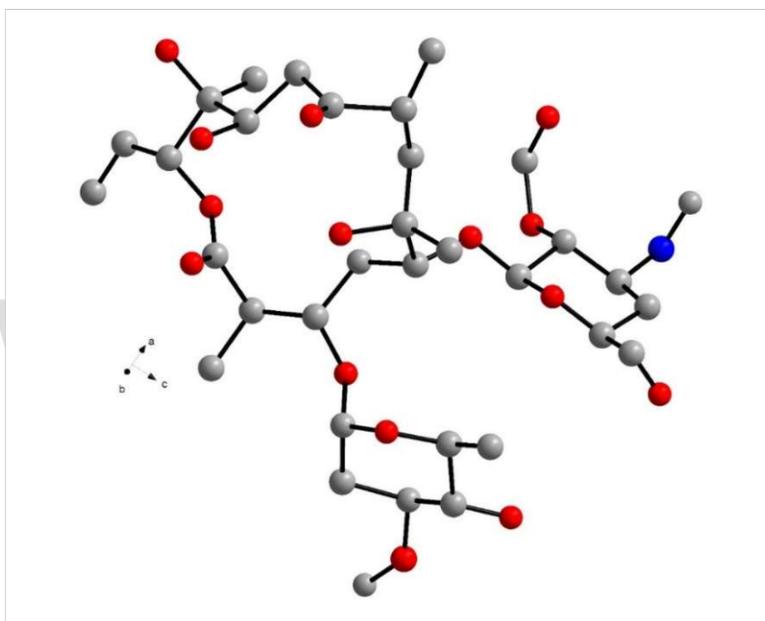


Figura 30. a) Asignación de átomos en cuatro moléculas independientes por el programa SHELXT. b) Dos de las cuatro moléculas independientes en la estructura del Estolato de Eritromicina.

La estructura molecular de uno de los cuatro fragmentos Eritromicina se muestra en la figura 31. A pesar de que no se identificaron algunos de los átomos, la disposición de los átomos y sustituyentes indica que corresponde a la Eritromicina A, la forma de mayor eficacia y más comúnmente encontrada en formulaciones farmacéuticas. La representación de la estructura en base a la celda triclinica obtenida, consistente con los parámetros obtenidos en el estudio realizado en muestra policristalina, se presenta en la Figura 32.



*Figura 31. Disposición del anillo macrocíclico y de los dos monosacáridos presentes en la estructura del estolato de eritromicina. (Los átomos grises representan átomos de carbono, los rojos son átomos de oxígeno y los azules son átomos de nitrógeno). Se omitieron los átomos de hidrógeno para mayor claridad.*

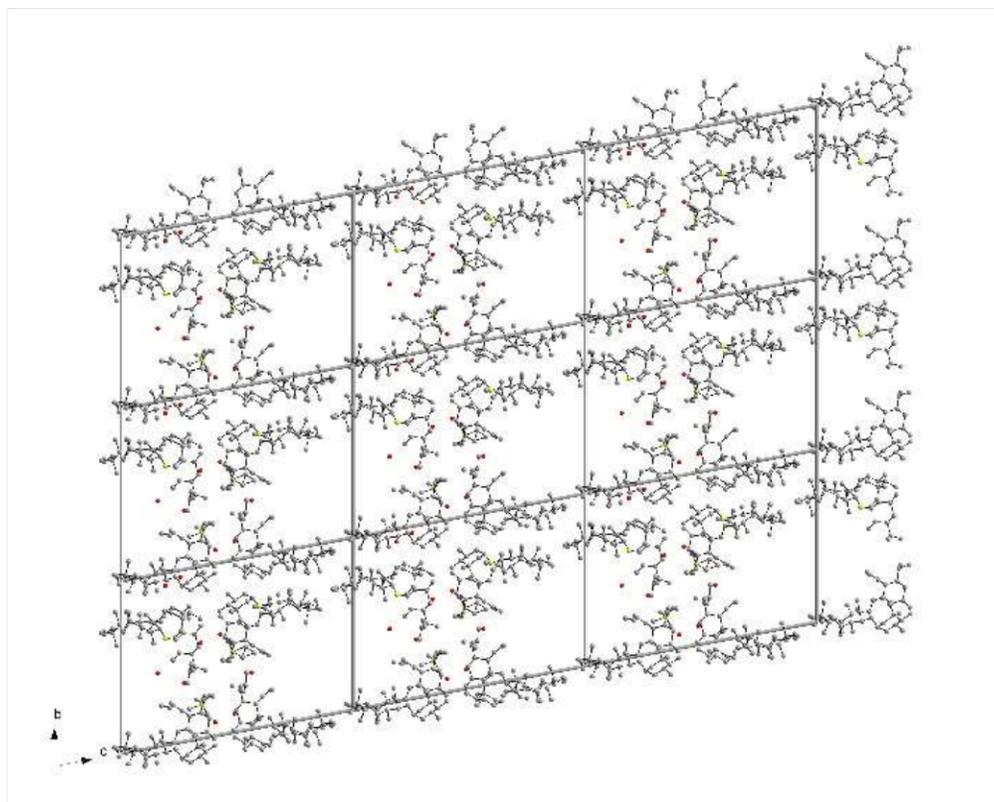


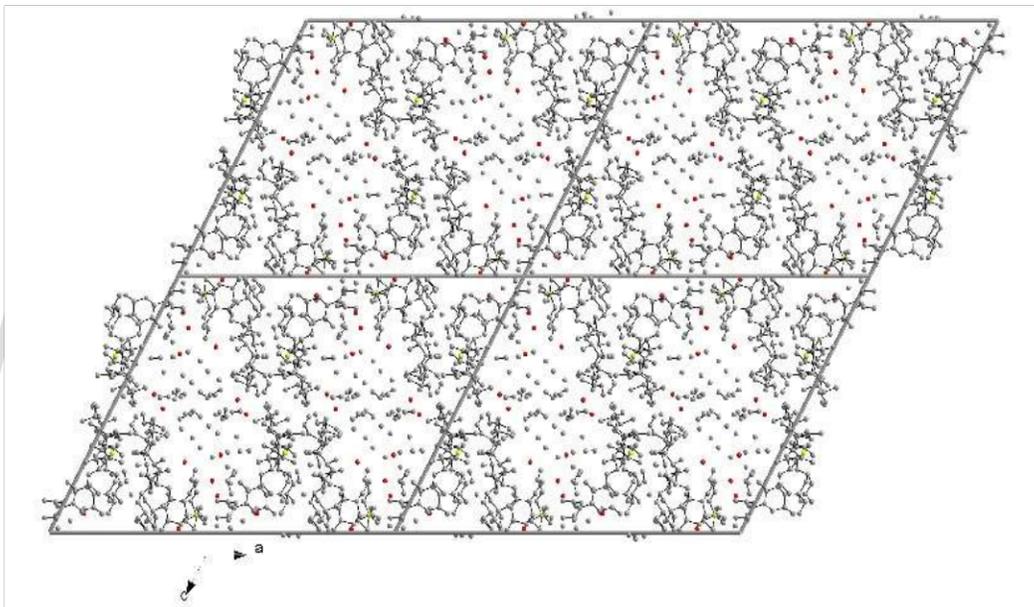
Figura 32. Estructura cristalina del Estolato de Eritromicina representada en base a la celda triclínica P1.

Sin embargo, el refinamiento de las posiciones y factores de desplazamiento atómico de los átomos que conforman la eritromicina no converge a valores satisfactorios de los índices de discrepancia del refinamiento y varios átomos refinan con factores de desplazamiento sin sentido físico (*“Non Positive Definite”* o *NPD*). Las distancias y ángulos de enlace y los ángulos de torsión preliminares se muestran en el Apéndice A.

Para tratar de mejorar el ajuste entre los datos de intensidad registrados y los calculados a partir del modelo estructural determinado se exploró la posibilidad de que el cristal estuviese maclado (presencia de dos o más orientaciones de una misma red cristalina). También se analizó la posibilidad de que el cristal analizado estuviese compuesto por más de una fase cristalina (multi-cristal). Al no observarse una mejoría importante en el ajuste anteriormente señalado, en ninguna de las posibilidades mencionadas, se pensó que la

estructura pudiera representarse mejor a través de una modulación conmensurable o inconmensurable.

El análisis detallado de los datos de intensidad sugiere precisamente una modulación conmensurable, es decir, que la estructura cristalina se describe mejor en una super-celda de la celda triclinica. En este proceso se identifica una celda monoclinica en los grupos espaciales  $C2$  o  $I2$ , cuyo volumen es el doble del volumen de la celda triclinica. Estas super-celdas de la celda triclinica se representan en las figuras 33 y 34.



*Figura 33. Estructura cristalina del estolato de eritromicina representada en base a la celda triclinica  $C2$ .*

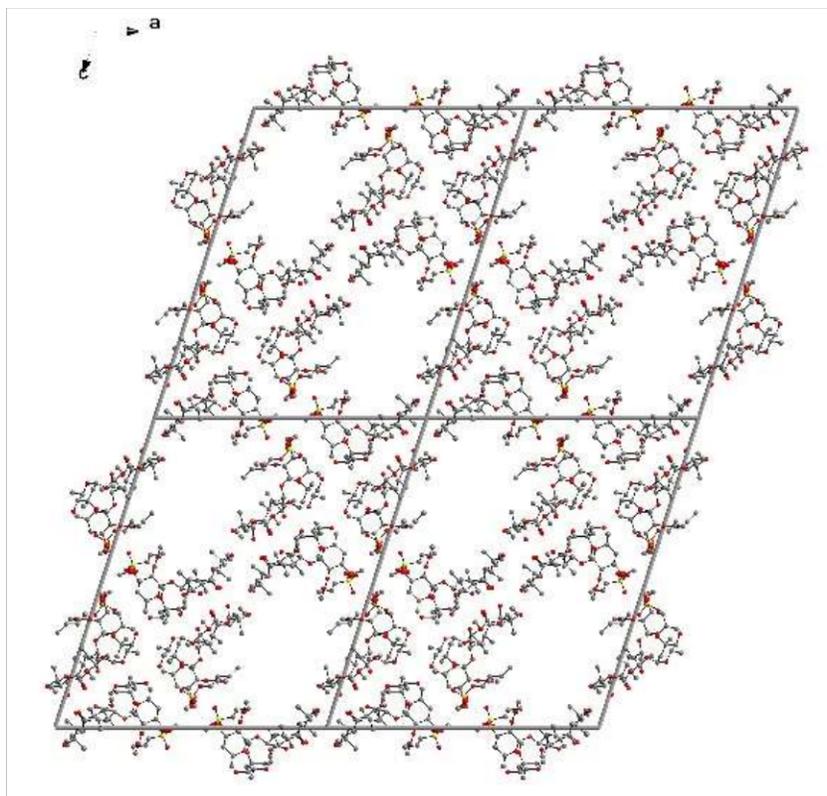


Figura 34. Estructura cristalina del estolato de eritromicina representada en base a la celda triclínica  $I2$ .

El refinamiento realizado en ambos grupos espaciales conduce a la misma disposición molecular que se muestra en la figura 29. Refinamientos posteriores indican que el estolato está desordenado, lo cual es de esperar dada la longitud de la cadena alifática y la disposición de las unidades de eritromicina que resultan en canales donde se pueden ubicar los estolatos. En virtud de la relativamente baja intensidad de las reflexiones registradas pudiera resultar complicado determinar completamente la estructura de este compuesto. Sin embargo, se considera que el modelo estructural que se tiene en estos momentos es bastante adecuado. Dado que a través de los años se han registrado datos de difracción en varios cristales utilizando diferentes equipos y radiaciones (rayos-X convencionales y sincrotrón) se tratará de analizar de nuevo y más cuidadosamente los datos para tratar de refinar mejor el modelo estructural.

## Conclusiones.

- Por evaporación lenta de una solución de Estolato de Eritromicina en Agua/Acetona 1:1 se logró obtener cristales de mediana calidad para estudios de difracción de rayos X.
- Los espectros FT-IR corroboraron la naturaleza química del Estolato de Eritromicina tanto en la materia prima como en el material recristalizado.
- El estudio por métodos térmicos de análisis mostró similitud en el comportamiento de la materia prima y del material recristalizado, permitiendo la determinación de la temperatura de fusión.
- Fue posible indexar el patrón de difracción de rayos X en muestras policristalinas en una celda triclinica con buenas figuras de mérito. Este patrón se enviará al ICDD para su incorporación en la base de datos de polvo ya que cumple con los parámetros de calidad exigidos por el ICDD.
- Los estudios por difracción de rayos X de cristal único mostraron una alta complejidad en la estructura cristalina. Quizás por ello, la estructura no está reportada a pesar de que este material se conoce desde hace mucho tiempo. Se presenta un modelo estructural triclinico que se considera el más probable.

## VI. Referencias Bibliográficas.

Allen, F.H.; Johnson, O.; Shields, G.P.; Smith, B.R.; Towler, M. CIF applications. XV. *enCIFer*: a program for viewing, editing and visualizing CIFs. *J. Appl. Cryst.*, **2004**, 37 (2) 335-338.

Brandenburg, K., DIAMOND. 2.1e. Crystal Impact GbR, Bonn, Germany, 1999.

Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L. Goodman & Gilman's. Las Bases farmacológicas de la Terapéutica. 11th ed. Mexico D. F.: McGraw-Hill Interamericana, **2007**.

Byrn, S.R.; Pfeiffer, R.R.; Stowell, J.G. Solid-State Chemistry of Drugs. SSCI Inc.: West Lafayette, IN, **2003**.

Callister, W.D.; Rethwisch, D.G. Ciencia e Ingeniería de Materiales. Segunda edición. Reverté: Barcelona, **2018**.

Delgado, J.M.; Díaz de Delgado, G. Caracterización de Materiales Cristalinos mediante Técnicas de Difracción de Rayos X. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, **2004**.

Spilva de Lehr, A. Guía de las Especialidades Farmacéuticas, 31va. Edición. Global: Caracas, Venezuela, **2009**.

Gates-Rector, S.D.; Blanton, T.N., The Powder Diffraction File: A Quality Materials Characterization Database. *Powder Diffr.*, **2019**, 34, 352-60.

Glusker, J.P.; Trueblood, K.N. Crystal Structure Analysis: A Primer. Third Edition. IUCr Texts on Crystallography. Oxford University: Oxford, **2010**.

Groom, C.R.; Bruno, I.J.; Lightfoot, M.P.; Ward, S.C., The Cambridge Structural Database. *Acta Cryst.*, **2016**, B 72 (2) 171-179.

Haines, P.J., Thermal Methods of Analysis. Principles, Applications and Problems, Blackie Academic: London, England, **1995**.

Hübschle, C.B.; Sheldrick, G.M.; Dittrich, B., ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL. *J. Appl. Cryst.*, **2011**, 44, 1281-1284.

Lambert, J.B.; Shurvell, H.F.; Lighther, D., Organic Structural Spectroscopy. Prentice Hall, New Jersey, 2005.

Louër, D.; Boulton, A., Indexing with the successive dichotomy method, DICVol04 *Z. Kristallogr. Suppl.* **2006**, 23, 225-230.

Macrae, C.F.; Sovago, I.; Cottrell, S.J.; Galek, P.T.A.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Platings, M.; Shields, G.P.; Stevens, J.S.; Towler, M.; Wood, P.A., Mercury 4.0 from visualization to analysis, design and prediction. *J. Appl. Cryst.*, **2020**, 53(2), 226-235.

Mighell, A.; Hubbard, C.; Stalick, J., NBS-AIDS\*83: A FORTRAN program for crystallographic data evaluation. National Bureau of Standards. Technical Note 1141. (USA). **1981**.

O'Neil, M.J.; Heckelman, P.; Merck, C.; Roman, K., *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 14<sup>th</sup> ed., Merck & Co.: Whitehouse Station., NJ, EUA, **2006**.

Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibi, J., *Tablas para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos*. Alhambra, España, **2003**.

Rigaku/*CrysAlisPro, Software System*, version 1.171.38.41. Rigaku Oxford Diffraction. **2015**.

Sheldrick, G.M., SHELXT-Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr, A Found Adv.*, **2015a**, A71 (1), 3-8.

Sheldrick, G.M., Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. C Struct. Chem.*, **2015b**, C71 (1), 3-8.

Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley and Sons. 7<sup>th</sup> Ed., New York, USA, 2005.

Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Principios de Análisis Instrumental*. 6ta. ed. Cengage: México, 2008. Capítulo 31, pp. 893-906.

Spek, A.L. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Cryst. D*, **2009**, D65 (2) 148-155.

www.bdigital.ula.ve