

293 733



293 733

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de Patente de Invención por veinte años, en España, por "Un procedimiento de separación de tetraciclinas de sus soluciones acuosas", a favor de "INSTITUTO DE FARMACOLOGIA ESPAÑOLA, S.L.", Fundación Marqués de Urquijo, domiciliada en Madrid, Alcalá, 95.

El proceso de separar de sus soluciones las sustancias activas, suele plantear en la química preparativa grandes problemas, que se hacen especialmente agudos en lo que toca a la obtención de antibióticos, por la labilidad de éstos al calor y a los cambios bruscos de pH, así como por la pequeña concentración con que se presentan en la disolución, ya que generalmente se obtienen por métodos microbiológicos y necesitan del empleo de soluciones de medio acuoso que son cuantitativamente enormes en comparación con el sólido activo antibiótico separable.

Esta dificultad hace que determinados procedimientos de obtención sean, desde el punto de vista de su explotación industrial, rigurosamente prohibitivos, ya que el producto aun en el caso de que haya sido obtenido económicamente, no puede separarse del medio acuoso de cultivo o caldo si no es mediante grandes y costosas instalaciones y el empleo de absorbentes o disolventes selectivos.

Esto es particularmente cierto en el caso de las tetraciclinas. Las técnicas en uso para la manipulación de sus caldos y la separación del activo son tan costosas que en al-

293733



gunos casos no tienen la menor validez industrial procesos que en el laboratorio parecen adecuados para la separación de las tetraciclinas de los caldos de cultivo.

5 Tales dificultades pueden considerarse satisfactoriamente resueltas con el procedimiento constitutivo de la invención para que se solicita la presente patente, procedimiento económico y que no requiere instalaciones costosas ni especiales, sino que puede ser llevado a cabo en las comunes de que ordinariamente están dotados tanto el laboratorio como la
10 industria química más elemental.

La investigación realizada en el laboratorio con el objeto de separar de sus soluciones acuosas las tetraciclinas ha demostrado claramente los siguientes hechos:

15 Es, sin duda alguna, posible separar las tetraciclinas por adición, al medio acuoso donde se encuentran disueltas, de una sal de alcalinotérreo y ajuste del pH de la mezcla a valores superiores a 4'5, generalmente entre 6'5 y 8.

Y como para la obtención de tetraciclinas se parte generalmente de sus caldos de fermentación previamente acidificados con ácidos -con frecuencia ácidos minerales fuertes-,
20 una vez añadida la sal alcalinotérrea, o la solución de ésta, hay que elevar el pH por adición de álcali concentrado, para evitar mayor dilución; y así la precipitación comienza al alcanzarse el pH adecuado.

25 Ello se ha comprobado en la práctica del laboratorio procediendo con soluciones de clorhidrato de cloro-oxi- y tetraciclina disueltas en agua con un pH inicial de 2'5-2'8, y utilizando como sales alcalinotérreas precipitantes, entre otras, cloruros cálcico y magnésico y nitratos alcalinoterreos.

30 Pudo verse que la simple adición de estas sales no causó precipitación ni varió el pH; pero mediante adición de soluciones de amoníaco se llevaron las mezclas a pH próximos

293733



a la neutralidad y superiores a 4.5, y entonces, al alcanzar estos valores de pH, se obtenía precipitación voluminosa de un producto amarillento que, una vez lavado y seco, demostró contener prácticamente toda la actividad del antibiótico de referencia.

5

Los inconvenientes del procedimiento son, sin embargo, grandes. En primer lugar la filtración resulta difícil y lenta, problema que, si bien en el laboratorio no significa dificultad mayor, lo es muy grande a efectos de manipulación industrial.

10

Por otra parte, la neutralización con el hidróxido amónico disuelto, eleva lógicamente el volumen a filtrar, lo que contribuye también a que la operación industrial se alargue.

15

Además, estudiada la estabilidad de soluciones de tetraciclinas disueltas en agua a pH neutro y alcalino, se ha comprobado que la clorotetraciclina especialmente, es poco estable a pH superiores a 5; y se ha visto que la neutralización rápida y brusca de soluciones ácidas de tetraciclinas, -y particularmente en el caso de la clorotetraciclina-, produce en el antibiótico una parcial inactivación, mayor o menor según la concentración de la misma y la brusquedad del salto de pH. Y como en un proceso industrial la neutralización habría de transcurrir rápidamente, es claro, que si en la separación del antibiótico quieren obtenerse buenos resultados, la dificultad de tal método precipitatorio debe obviarse mediante una manipulación adecuada.

20

25

30

A la eliminación de tales inconvenientes se han encaminado los estudios y los experimentos que han desembocado en la invención del procedimiento, que constituye el objeto de la patente que ahora se solicita; procedimiento eficaz, cómodo y económico, que no requiere ninguna instalación particu

293733



larmente costosa.

El procedimiento tiene como fundamento la puesta en íntimo contacto de la solución, incluso ácida, de una tetraciclina, (que puede ser solución de clorhidrato) con sustancias
5 sintéticas o naturales de sales alcalinoterreas o ricas en ellas, tales que, siendo prácticamente insolubles en el agua, fijan la tetraciclina en forma de complejo insoluble, incluso modificando el pH de la solución, por reacción del medio probablemente ácido de la solución antibiótica con el componente del
10 sólido rico en alcalinotérreo añadido como precipitante.

Como consecuencia práctica del procedimiento cuando se selecciona debidamente el producto fijador del antibiótico, se consiguen las notables ventajas siguientes:

1^a.-Al añadir el fijador en forma de producto sólido se evitan diluciones innecesarias de los caldos o soluciones antibióticas, con la consiguiente economía de manipulación.
15

2^a.-En el caso de partirse de soluciones ácidas del antibiótico, tal selección adecuada del sólido fijador determina que al mismo tiempo que la fijación del antibiótico sobre el sólido, vaya produciéndose el ajuste de pH necesario para que dicha fijación sea, por un lado, lo suficientemente lenta para que el antibiótico no se inactive y, por otro, sin embargo suficientemente rápida para que el proceso se pueda emplear industrialmente sin pérdidas indebidas de tiempo de operación. Como
20 la neutralización va produciéndose simultáneamente a la fijación del antibiótico sobre el producto sólido precipitante o "fijador", el ajuste de pH va siendo gradual y de acuerdo con las necesidades de precipitación.
25

Lo cual, además de ser causa de una mayor economía en cuanto al balance de actividad, se traduce en una simplificación del proceso, pues permite eliminar, si así se desea, la adición de neutralizantes, siempre molesta y engorrosa, y el
30



consiguiente aumento de volumen del líquido neutro a manipular.

3ª.-Se pueden conseguir, asimismo, productos finales ricos en el antibiótico, que a las virtudes de la actividad plenamente conservada, de éste, unan otras que hagan al conjunto más adecuado para el posterior uso a que tales productos se destinen. Así, por ejemplo, si para fijar la clorotetraciclina partiendo de sus soluciones acuosas ácidas, se emplea harina de huesos, se consigue un producto final de precipitación de antibiótico que demuestra contener la actividad del caldo de fermentación o de la solución acuosa de partida, y que puede emplearse directamente como corrector de piensos, con la doble ventaja de comportarse como un nutriente animal y simultáneamente como un corrector antibiótico de dieta.

Además, conocida la importancia de los iones alcalinotérreos y entre ellos el calcio, para regular el equilibrio de absorción de las tetraciclinas, constituye un punto de interés que, dado el gran excedente de iones calcio en dicha composición, al administrarse directamente tal producto obtenido por el procedimiento objeto de patente, se regula el paso del antibiótico en el tracto intestinal del animal, reduciendo al mínimo la absorción intestinal del antibiótico, con lo cual éste permanece casi íntegramente en el tubo digestivo, ejerciendo su acción sobre la flora microbiana intestinal del sujeto.

4ª.-El empleo del fijador seleccionada es beneficioso para el proceso industrial de obtención, por facilitar la filtración, siempre difícil, de los precipitados tetraciclínicos. En efecto, al realizarse en el proceso una verdadera fijación del antibiótico sobre el soporte alcalinotérreo, basta con graduar el tamaño granular del soporte para conseguir una filtración perfecta, lo que no se consigue cuando la precipitación de la tetraciclina tiene lugar por reacción entre soluciones, ya



que entonces, incluso en soluciones medianamente concentradas, la precipitación ocurre instantáneamente al alcanzar el pH adecuado, y para evitarlo habría que proceder, bien a una neutralización previa y adición lentísima de la sal precipitante, bien a la adición de la sal soluble o disuelta y a la neutralización lenta de la mezcla. En ambos casos, el tiempo requerido para obtener productos perfectamente filtrables sería largo y muy grande el número de posibles variables, de difícil control, que influenciarían el proceso de cristalización.

10 Y ha de tenerse en cuenta que el alargamiento de la filtración es, en los procedimientos clásicos, un grave inconveniente desde el punto de vista industrial, por cuanto que frecuentemente requieren selecciones de métodos adecuados de filtración, siempre costosos, aparte de que dicho alargamiento ofrece el peligro de inactivaciones del antibiótico por su permanencia en medios a pH en que sus soluciones pierden más rápidamente la actividad.

15 5ª.-Consecuencia de la ventaja que acaba de citarse y en relación con la enumerada como segunda, es otra más, la de que el hecho de que el ajuste adecuado de pH se efectúe por la selección del soporte fijador y de que la filtración se facilite por la elección adecuada del tamaño de partícula, hace posible que el procedimiento objeto de la patente que se solicita sea aplicado para obtener una separación continua o semi-continua.

25 Para proceder en operación semicontinua basta cargar columnas con el soporte y alimentarlas con la solución de la tetraciclina de que se trate, hasta llegar al agotamiento deseado. Los líquidos que afluyen de la columna pueden abandonarla prácticamente agotados del antibiótico.

30 Para trabajar en proceso continuo basta utilizar columnas de hélice o vagonetas de tipo clásico y proceder a la

293733



parcelación a través de la carga, bien en pro o contra corriente, siguiendo las técnicas usuales de este esquema de trabajo continuo para ambas fases sólida y líquida, y regulando, como es lógico, la velocidad de alimentación y de carga.

5 Así enumeradas sus ventajas, a continuación van a precisarse las características del procedimiento constitutivo de la invención. Son éstas:

10 1ª.-Una precipitación de fijación de antibiótico al estado insoluble mediante la puesta en contacto íntimo de la solución que contenga el antibiótico bien con una sal poco soluble de metal alcalinotérreo, bien con un producto prácticamente insoluble, natural o sintético, que la contenga.

15 2ª.-El empleo de la solución acuosa del antibiótico, que además puede contener impurezas debidas a la fermentación (caldos) y/o sales minerales u orgánicas solubles, disueltas conjuntamente con el antibiótico, siempre que éstas no interfieran en la formación del compuesto insoluble del antibiótico -ya que como tal ha de separarse- y que no se precipiten conjuntamente con él, si se desea separar el antibiótico a mayor
20 estado de pureza.

Tales impurezas o sales insolubles pueden, en su caso, ser separadas conjuntamente con el antibiótico, precipitando éste en presencia de aquéllas, mas si se desea obtener el antibiótico en mayor estado de pureza, basta eliminar los ajenos insolubles por una filtración previa a la precipitación del
25 antibiótico.

3ª.-Porque el precipitante o "fijador" es bien una sal prácticamente insoluble en el medio acuoso en que se encuentre disuelto el antibiótico, tal como fosfato cálcico o magnésico, carbonato cálcico o magnésico, oxalatos alcalinoterreos, bien productos naturales, como apatito e hidroxapatito; bien
30 productos naturales que contengan éstas u otras sales alcalino

293733



terreas poco solubles, tales como harina de huesos.

4^a.—Por que se procede a la precipitación en medios con pH controlados, superiores a 4'5, generalmente entre 6'5 y 8'0.

5 Como para la obtención de tetraciclinas se parte de sus caldos de fermentación previamente acidificados con ácidos —generalmente minerales fuertes— para cómoda separación o destrucción del micelio, es interesante la posibilidad, que este procedimiento ofrece, de que la selección adecuada del anión que forma la sal alcalinotérrica, permita que el ajuste del pH se efectúe al mismo tiempo que la fijación del antibiótico.

10 Así, por ejemplo, se ha visto experimentalmente que al tratar con cantidad suficiente o más que suficiente, de fosfato tricálcico, caldos de fermentación ricos en clorotetraciclina, previamente acidificados con ácido clorhídrico, filtra-
15 dos sobre soporte inerte y con un pH de 2'8, el pH del medio se elevaba, sin necesidad de añadir ningún otro neutralizante, a 6'5-7'0, y ello al mismo tiempo se precipitaba el antibiótico hasta dejar el caldo prácticamente agotado.

20 5^a.—Por la filtración subsiguiente a la precipitación después de que las sales alcalinoterreas estén suficiente tiempo en presencia de la tetraciclina separable, al pH de actuación, para que la reacción se complete al estado deseado.

25 6^a.—Por que el activo precipitado se separa, siguiendo las técnicas conocidas de separación sólido-líquido (p.e., centrifugación, filtración, etc.) del medio acuoso que lo contenía.

30 7^a.—Por la posibilidad de desecar mediante las técnicas usuales (desecación a vacío, a presión y temperatura ambiente, etc.) los productos obtenidos según el procedimiento descrito.

Como ejemplos de manipulación se dan con carácter a-

293733



claratorio pero no limitativo, los siguientes:

Ejemplo 1^a.-A un litro de caldo de fermentación de obtención de clorotetraciclina, con una actividad de 5.850 u/ml., acidificado a pH 2'5, se le añadieron 150 grs. de fosfato tricálcico finamente pulverizado, agitando durante la adición y manteniendo la agitación durante una hora, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de contacto, se separó el líquido del sólido por filtración con succión, el sólido agotado en líquido se lavó con 100 c.c. de agua destilada en dos lavados, se agotó finalmente por succión durante 15 minutos y el sólido obtenido se desecó a temperatura ambiente, en habitación seca y bien ventilada, hasta peso constante.

Se obtuvieron 214 grs. de producto seco con una actividad de 28.500 mcg./gr. en clorotetraciclina base.

Los líquidos filtrados demostraron estar prácticamente agotados en la actividad antibiótica (158 u./ml.) y el pH de los mismos se elevó espontáneamente durante la operación hasta 6'1.

Ejemplo 2^a.-Una columna cromatográfica de 25 mm. de diámetro se cargó con 50 grs. de harina de huesos finamente molida, operando por manipulación en seco, según técnica ordinaria; alcanzó una altura de 110 mm., dando una densidad aparente de 0'77 grs./cc.

Colocada verticalmente, se dejan fluir a su través 200 c.c. de solución de clorhidrato de clorotetraciclina en agua preparada por disolución de 1'5 grs. de clorhidrato de tetraciclina en 250 c.c. de agua, solución cuyo pH era de 2'8.

La solución antibiótica se añade sobre la columna dejándola percolar lentamente a través de la harina de huesos. Terminada la percolación, se recogieron en el colector 175 c.c. de efluente, con una actividad de 205 u./ml. y un pH de 6'2.

Retirado el sólido de la columna y lavado dos veces

293733



5 con 25 c.c. de agua destilada, eliminadas las aguas de lavado y secado después, dió una actividad de 22.300 mcg./gr. de clo rotetraciclina base, con un peso de 49'6 grs.; lo que demues- tra que prácticamente toda la actividad ha quedado retenida en el soporte de carga y que la filtración del agotado y la e levación de pH se han efectuado espontáneamente por el simple contacto.

10 Ejemplo 3º.-A una solución de clorhidrato de tetra- ciclina que contiene 2 grs. de tetraciclina en 200 c.c. de so- lución se añadieron 10 grs. de carbonato cálcico, agitando la mezcla durante 15 minutos.

15 Ajustado posteriormente el pH a 7'5 y agitada la mez- cla 15 minutos más, se filtró por vacío. Lavado y seco el pro- ducto, se valoró, dando 175.000 mcg./gr. de tetraciclina base con un peso de 9'9 grs.

20 Ejemplo 4º.-A 200 c.c. de una solución de oxitetra- cina con 2 grs. de ésta, se añadieron 10 grs. de fosfato magné- tico, ajustando el pH a 7'5. El producto obtenido después de filtrado, lavado y seco pesó 9'8 grs. y, valorado, dió una ac- tividad de 180.000 mcg./grs. de oxitetraciclina base.

N O T A.

25 Descrito suficientemente el procedimiento objeto de la patente que se solicita, se declara que la esencia del mis- mo, nuevo y de propia invención, es lo que se concreta en las reivindicaciones siguientes:

30 1º.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, caracterizado por poner en íntimo con- tacto estas soluciones con cantidades suficiente o más que sufi- ciente de un producto natural o sintético que sea o contenga sal poco soluble de alcalinotérreo en cantidad tal que, al pH de actuación, fije el antibiótico sobre el excedente no disuel- to de dicho producto natural o sintético añadido a la solución.

293733



2ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, según la primera reivindicación, caracterizado por que los productos fijadores sintéticos son sales (fosfatos, carbonatos, oxalatos) de iones alcalinoterreos, particularmente de calcio y magnesio.

3ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, según la primera reivindicación, caracterizado por que los productos fijadores naturales son apatito, hidroxiapatito y harina de huesos.

4ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por que la tetraciclina puede separarse formando directa e inmediatamente con el fijador productos de alimentación y corrección de dietas animales.

5ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por que se trabaja sobre diferentes soluciones acuosas del antibiótico, con posibilidad pero sin necesidad de específicos ajustes de pH ni concentraciones previas en las diluciones usuales.

6ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución acuosa del antibiótico es un caldo de fermentación.

7ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, según las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado por que la solución acuosa del antibiótico es una solución del antibiótico o mixta de antibióticos y productos que no impidan la fijación de éstos.

8ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por la elección del fijador sólido y del tamaño de sus partículas en función de la facilidad o dificultad del pro

293753



ceso de filtración necesaria para trabajar en procesos discontinuos, continuos o semicontinuos.

9ª.-Un procedimiento para separar tetraciclinas de sus soluciones acuosas.

Todo según se describe y reivindica en la presente Memoria descriptiva que consta de doce hojas debidamente foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 21 de noviembre de 1.963.

El Agente.

P.P.

Sanjuba