

Estudios fisicoquímicos y biológicos de un nuevo derivado de la eritromicina: el folato de eritromicina

Physicochemical and biological studies of a new erythromycin derivate - erythromycin folate

MANNA PK*, KUMARAN V, MOHANTA GP

Department of Pharmacy, Annamalai University, Annamalai Nagar, Tamil Nadu 608002, India.
pkmanna@rediffmail.com

RESUMEN

Se preparó un derivado nuevo de la eritromicina, el folato de eritromicina, y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. El derivado presenta una buena solubilidad en metanol, etanol y propileno glicol. Los valores de los coeficientes de partición, que fueron 1,12 y 1,10 en sistemas de cloroformo/agua y octanol/agua respectivamente, indican que probablemente se distribuya bien *in vivo*. La potencia *in vitro* del derivado, 716 $\mu\text{g}/\text{mg}$, es mayor que la de derivados existentes como el estolato de eritromicina, el estearato de eritromicina, el etil succinato de eritromicina, el gluceptato de eritromicina y el lactobionato de eritromicina. Las concentraciones inhibitorias mínimas *in vitro* del derivado son menores que las de la base frente a *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilis* y *Escherichia coli*. Los parámetros farmacocinéticos *in vivo* del derivado en conejos son los siguientes: la vida media de eliminación, $t_{1/2}$, es de 117,45 min. para el derivado y de 150,45 min. para la base de eritromicina utilizada como estándar de referencia. El volumen de distribución V_d del derivado y de la base de eritromicina es de 177,56 % y 352,20 % respectivamente. Los resultados de la investigación indican que el folato de eritromicina tiene un gran potencial en aplicaciones clínicas posibles.

PALABRAS CLAVE: folato de eritromicina. Actividad antimicrobiana *in vitro*. Concentración sérica *in vivo*. Parámetros farmacocinéticos.

ABSTRACT

*A new derivative of erythromycin, Erythromycin folate was prepared and its physicochemical and biological properties were evaluated. The derivative has good solubility in methanol, ethanol and propylene glycol. The partition coefficient values of 1.12 and 1.10 in chloroform/water and octanol/water systems respectively indicate that the derivative will probably distribute well in vivo. The in vitro potency of the derivative, 716 $\mu\text{g}/\text{mg}$, is higher than the existing derivatives like erythromycin estolate, erythromycin stearate, erythromycin ethyl succinate, erythromycin gluceptate, and erythromycin lactobionate. The in vitro Minimum Inhibitory Concentrations are less for the derivative than the base against *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilis* and *Escherichia coli*. The in vivo pharmacokinetic parameters of the derivative in rabbits are as follows: the elimination half life, $t_{1/2}$ is 117.45 min for the derivative while it is 150.45 min for erythromycin base the reference standard. The volume of distribution V_d is 177.56% and 352.20% for the derivative and erythromycin base respectively. The results of the present investigations indicate that erythromycin folate has a high potential for possible clinical application.*

KEY WORDS: Erythromycin folate. In vitro antimicrobial activity. In vivo serum concentration. pharmacokinetic parameters.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de la eritromicina está muy extendido en el tratamiento de diversas infecciones causadas por organismos gram positivos. Los pacientes alérgicos a la penicilina se suelen tratar con eritromicina. Se utiliza como alternativa a la tetraciclina en el tratamiento de infecciones uretrales, rectales o epididimales causadas por clamidia¹. La sociedad americana de farmacéuticos del sistema de salud (American Society of Health System Pharmacists) investiga la posibilidad de utilizar eritromicina en infecciones de clamidia durante el embarazo, las infecciones de bordetella pertusis en pacientes con pertusis y también como adjunto a la antitoxina diftérica en el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio causadas por *Corynebacterium diphtheriae*². Se utiliza para el tratamiento de la sífilis en pacientes alérgicos a la penicilina³, para tratar la enfermedad del legionario y también en el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio superior causadas por estreptococos^{4,5}.

Aunque la eritromicina se utiliza de forma generalizada desde hace casi cinco décadas, presenta algunas desventajas como (i) insolubilidad en agua, (ii) inestabilidad en el pH gástrico⁶, (iii) sabor amargo y (iv) absorción irregular en el tracto gastrointestinal. Desde que se introdujo para uso clínico, se han preparado diversas sales y derivados⁷⁻¹³, pero sólo algunos de ellos han tenido un reconocimiento oficial, como el lactobionato de eritromicina, el glucoheptonato de eritromicina (sales solubles en agua), el estearato de eritromicina, el etilsucinato de eritromicina (sales insolubles en agua), el estolato de eritromicina (sal estérica insoluble en agua). Después de su administración oral la variabilidad de las concentraciones serológicas entre sujetos^{14,15}, incluso en condiciones estandarizadas, es muy grande, mientras que después de su administración intravenosa la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos entre sujetos es pequeña¹⁶. Por esta razón, la asociación americana de científicos farmacéuticos (American Association of Pharmaceutical Scientists) considera que el fármaco presenta graves problemas de biodisponibilidad. Teniendo en consideración las limitaciones anteriores, se ha preparado un nuevo derivado de la eritromi-

1. INTRODUCTION

Erythromycin is widely used in the treatment of various infections, caused by gram-positive organisms. Patients allergic to penicillin are commonly treated with erythromycin. It is used as an alternative to tetracycline in treating uncomplicated urethral, rectal or epididymal infections due to *Chlamydia*¹. The American Society of Health System Pharmacists explores the possibility of use of erythromycin in *Chlamydial* infections during pregnancy, *Bordetella pertusis* infections in patients with pertusis and also as an adjunct to diphtherial antitoxin in the treatment of respiratory tract infection caused by *Corynebacterium diphtheriae*². It is used to treat syphilis in patients who are allergic to penicillin³, to treat legionnaire's disease and also in the treatment of upper respiratory tract infections caused by streptococci^{4,5}.

Although erythromycin is widely used in therapy for nearly five decades, there are some disadvantages such as (i) water insolubility, (ii) instability in the gastric pH⁶ (iii) bitter taste and (iv) irregular absorption from the GI tract. Various salts and derivatives⁷⁻¹³ have been prepared from the time it was introduced for clinical use by various scientist, but only few of the derivatives like erythromycin lactobionate, and erythromycin glucoheptonate (water soluble salts), erythromycin stearate and erythromycin ethylsuccinate (water insoluble salts), erythromycin estolate (water insoluble ester salt), has gained official recognition. Large intersubject variability^{14,15} in serum concentration occurs after oral administration even under standardized conditions, whereas intersubject variability in pharmacokinetic parameters after intravenous administration is small¹⁶. Due to this reason the drug is listed by the American Association of Pharmaceutical Scientists as having serious bioavailability problems. With the above limitations in consideration, a new erythromycin derivative, erythromycin folate has been prepared and its physicochemical and biological properties are evaluated with clinical application as the main objective.

Folic acid has been selected by the authors because of its safety as evidenced by its various clinical applications. Folic acid is extremely important for the health of the human

cina, el folato de eritromicina, y se han evaluado sus propiedades fisicoquímicas y biológicas teniendo como objetivo principal la aplicación clínica.

Los autores han seleccionado el ácido fólico debido a su seguridad, demostrada en diversas aplicaciones clínicas. El ácido fólico es extremadamente importante para la salud del ser humano. Puede reducir el riesgo de nacimiento de niños con defectos del tubo neural en mujeres^{17,18}. Puede mejorar significativamente la condición de los pacientes deprimidos y reducir el riesgo de enfermedad de Alzheimer entre tres y cuatro veces en los pacientes que consumen ácido fólico en comparación con los que no lo consumen¹⁹. El ácido fólico es necesario para el correcto metabolismo de el aminoácido esencial metionina, que se convierte a su vez en homocisteína. Los niveles demasiado elevados de homocisteína en el cuerpo pueden ser perjudiciales para la salud²⁰. También reduce los niveles de homocisteína en pacientes diabéticos²¹. Por tanto, la eritromicina en forma de sal de folato se puede utilizar en el tratamiento clínico de las enfermedades asociadas a infecciones bacterianas indicadas anteriormente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados en este estudio son: base de eritromicina (Abbott Laboratories, EE.UU.), ácido fólico (SD Fine Chemicals, Bombay, India), gel de sílice G (SD Fine Chemicals, Bombay, India), medio de cultivo (Hi media, Bombay, India), caldo de infusión cerebro-corazón de agar (Hi media, Bombay, India). El resto de las sustancias químicas utilizadas fueron de grado analítico.

2.1 Preparación del derivado:

El folato de eritromicina se preparó según el método de Dutta y Basu, haciendo reaccionar la base de eritromicina con ácido fólico^{22,23}. El derivado se recuperó mediante liofilización.

being. It can reduce a woman's risk of having an infant with a neural tube defect^{17,18}. It can significantly improve the condition of depressed patients and can reduce the risks of Alzheimer's disease three to four times in patients who consume folic acid than the people who do not¹⁹. Folic acid is required for proper metabolism of the essential amino acid methionine, which is in turn converted to homocysteine. A high level of homocysteine in the body may be detrimental to health²⁰. It also reduces the high homocysteine levels in diabetic patients²¹. Hence erythromycin, as a folate salt, can be used in the clinical management of above diseases associated with bacterial infections.

2. MATERIAL AND METHODS

The materials used in the present study are: Erythromycin base (Abbott Laboratories, USA), Folic acid (SD Fine Chemicals, Mumbai, India), Silica Gel G (SD Fine Chemicals, Mumbai, India), Culture media (Hi media, Mumbai, India), Brain heart infusion agar (Hi media, Mumbai, India). All other chemicals used were of analytical grade.

2.1 Preparation of derivative:

Erythromycin folate was prepared by the method of Dutta and Basu by reacting erythromycin base with folic acid^{22,23}. The derivative was recovered by lyophilisation

2.2 Physicochemical properties:

Melting point (DSC studies), solubility, optical rotation, partition coefficient, pH, thin layer chromatography, Infrared and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopic investigations were carried out for the derivative. For all the above studies erythromycin base (Abbott Laboratories, USA) was used as the reference standard. The solubilities of erythromycin folate in nine different pharmaceutical solvents were determined by the method of Marsh and Weiss²⁴. The optical rotation of 1% (w/v) solution of the derivative in 90% (v/v) ethanol was mea-

2.2 Propiedades fisicoquímicas:

Se realizaron estudios del punto de fusión (estudios de DSC), solubilidad, rotación óptica, coeficiente de partición, pH, cromatografía de capa fina, y espectroscopias de infrarrojos y resonancia nuclear magnética del derivado. En todos los estudios anteriores se utilizó base de eritromicina como estándar de referencia (Abbott Laboratories, EE.UU.). La solubilidad del folato de eritromicina en nueve disolventes farmacéuticos distintos se determinó por el método de Marsh y Weiss²⁴. La rotación óptica de la solución al 1% (p/v) del derivado en un etanol al 90% (v/v) se midió a 27,7°C en un polarímetro P1010 JASCO EE.UU., y se calculó la rotación específica. Para los estudios de cromatografía de capa fina se utilizaron placas G de gel de sílice de 0,25 mm de profundidad. Las placas se activaron a 120°C durante dos horas antes de utilizarlas en el estudio. Se utilizaron 10 µl de muestra para el punto. Las placas se pasaron por tres sistemas de disolventes: metanol, metanol: cloroformo (1:1) y metanol: acetona (1:1), y se identificaron mediante una cámara de yodina. El coeficiente de partición del derivado y la base se determinó en sistemas de disolvente de cloroformo/agua y octanol/agua mediante el método gravimétrico. El pH de una solución acuosa del derivado al 1% se determinó en un medidor de pH digital ELICO, modelo LI 612, India. El espectro infrarrojo del derivado se registró en un espectrómetro de infrarrojos NICOLET I.R., fabricado por NICOLET Inst. Corp., EE.UU., utilizando bolitas de bromuro potásico. El espectro RMN del derivado se registró en un espectrómetro JOEL GSM, EE.UU., utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente. La resolución y la velocidad fueron de 0,49 Hz y 15 Hz respectivamente. El termograma DSC se registró en un equipo Mettler Toldedo, modelo n° DSC 821, Suiza. Los termogramas se registraron en el rango de temperatura entre 40 °C y 300 °C, con un incremento de temperatura de 10 °C/min.

sured at 27.7°C in a P1010 JASCO USA, polarimeter and the specific rotation was computed. The Thin Layer Chromatographic studies were carried out using silica gel G plates of 0.25 mm depth. The plates were activated at 120°C for two hours before being used for the study. 10µl of sample was used for the spot. The plates were run in three solvent systems – methanol, methanol: chloroform (1:1) and methanol: acetone (1:1) and was identified by using iodine chamber. The partition coefficient of the derivative and the base was determined in chloroform/water and octanol/water solvent systems by gravimetric method. The pH of a 1% aqueous solution of the derivative was determined in ELICO digital pH meter, model LI 612, India. The Infrared spectrum of the derivative was recorded in a NICOLET I.R spectrometer, NICOLET Inst. Corp. USA, using potassium bromide pellets. The NMR spectrum of the derivative was recorded in JOEL GSM spectrometer, USA using dimethyl sulphoxide (DMSO) as the solvent. The resolution and the speed were 0.49Hz and 15Hz respectively. The DSC thermogram were recorded in Mettler Toldedo, model No. DSC 821, Switzerland. The thermograms were recorded in the temperature range between 40°C to 300°C with 10°C/min rise in temperature.

2.3 Biological studies:

The biological properties, studied for the derivative include *in vitro* antimicrobial potency, *in vitro* antimicrobial spectrum (Minimum Inhibitory Concentration), *in vitro* protein binding, acute toxicity (LD₅₀) in mice and *in vivo* pharmacokinetics in rabbits.

In vitro studies:

The *in vitro* potency was determined following the method of Grove and Randall²⁵ using *Sarcina lutea* ATCC 9341 as the test organism. The *in vitro* antimicrobial spectrum (Minimum Inhibitory Concentrations) of erythromycin folate was determined by agar dilution test²⁶ against six organisms (*vide Staphylococcus aureus* NCIM 2079; *Klebsiella pneumoniae* NCIM 2957; *Bacillus pumilis*

2.3 Estudios biológicos:

Las propiedades biológicas del derivado estudiadas incluyeron la potencia antimicrobiana *in vitro*, el espectro antimicrobiano *in vitro* (concentración inhibitoria mínima), fijación proteica *in vitro*, toxicidad aguda (LD₅₀) en ratones y farmacocinética *in vivo* en conejos.

Estudios *In vitro*:

La potencia *in vitro* se determinó según el método de Grove y Randall²⁵, utilizando *Sarcina lutea* ATCC 9341 como organismo de prueba. El espectro antimicrobiano *in vitro* (concentraciones inhibitorias mínimas) del folato de eritromicina se determinó mediante la prueba de dilución en agar²⁶ contra seis organismos (*vide Staphylococcus aureus* NCIM 2079; *Klebsiella pneumoniae* NCIM 2957; *Bacillus pumilis* NCIM 2327; *Bacillus subtilis* NCIM 2063; *Escherichia coli* NCIM 2065; *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2036). Se inocularon placas de caldo de infusión cerebro-corazón impregnadas con el fármaco con un bucle dosificador lleno de caldo de cultivo de 24 h de los organismos respectivos. Las placas se incubaron durante 18 h a 30 ± 2 °C.

La fijación proteica *in vitro* del derivado se determinó mediante la técnica de diálisis de equilibrio²⁷. En el método de diálisis, se colocaron muestras incubadas (solución de albúmina al 10% y fármacos) en secciones de tubos de diálisis (remojados durante una noche en tampón de fosfato pH 7,4) cerrados firmemente en un extremo. Como ayuda en el proceso de mezclado se incluyó una burbuja de aire. El saco que contenía la mezcla de proteína y fármaco se colocó en un tubo de ensayo tapado que contenía 10 ml de fluido de diálisis (tampón de fosfato pH 7,4). El tubo se agitó suavemente en un agitador magnético a temperatura ambiente (30 °C) durante una noche para conseguir el equilibrio.

La concentración de eritromicina se midió por el método de Grove y Randall²⁵. Simultáneamente, se realizó un control. El experimento se repitió tres veces. En el experimento con plasma anterior se estableció que el equilibrio se consigue en 24 h.

NCIM 2327; *Bacillus subtilis* NCIM 2063; *Escherichia coli* NCIM 2065; *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2036). Brain Heart Infusion Agar plates impregnated with the drug was inoculated with one loop full of 24h old broth culture of respective organisms. The plates were incubated for 18h at 30 ± 2°C.

The *in vitro* protein binding of the derivative was determined by the equilibrium dialysis technique²⁷. In the dialysis method, incubated samples (10% aqueous albumin solution and drugs) were placed in sections of dialysis tubing (soaked overnight in phosphate buffer pH7.4) knotted tightly at one end. An air bubble was included to aid mixing. The sac containing the drug protein mixture was placed in a stoppered test tube containing 10ml of the dialysis fluid (phosphate buffer pH7.4). The tube was agitated gently by means of magnetic stirrer at room temperature (30°C) overnight to attain equilibrium. The erythromycin concentration in the dialysate was measured by the method of Grove and Randall²⁵. A control was run simultaneously. The experiment was repeated thrice. Previous experiment with plasma established that equilibrium is achieved within 24h. Protein binding was calculated using the following formula:

$$\% \text{ bound} = 100 - \frac{\text{concentration in outside solution (dialysate)}}{\text{concentration in control (without using protein)}} \times 100$$

In vivo studies:

The acute toxicity study of the derivative was carried out in male albino mice (3 to 4 weeks old weighing between 25gm to 28gm) following Up and Down method of OECD Guidelines 425 (2001) for Testing of Chemicals²⁸. The test drug and the reference standard, dissolved in a mixture of water and propylene glycol (1:1), were administered orally to animals kept overnight in fasting condition with water *ad libitum*. A vehicle control group was used at each dose level. The *in vivo* pharmacokinetics of the derivative was determined using 6-month-old healthy male Swiss albino rabbits weighing around 1.5kg as the test animals. The rabbits were maintained with fodder feed (standard pellet, Pranav Agro Industries, Sanghli, India), vegetables (carrot and cabbage) and with free access to water.

La fijación de la proteína se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de fijación} = 100 - \frac{\text{concentración en solución externa (dializado)}}{\text{concentración en control (sin utilizar proteína)}} \times 100$$

Estudios In vivo:

El estudio de toxicidad aguda del derivado se realizó en ratones albinos machos (de 3 a 4 semanas de edad y con un peso entre 25 g. y 28 g.) según las indicaciones del método Up and Down de las directrices de la OECD 425 (2001) para la comprobación de sustancias químicas²⁸. El fármaco de prueba y el estándar de referencia, disueltos en una mezcla de agua y propileno glicol (1:1), se administraron por vía oral a animales que se habían mantenido en estado de ayuno durante la noche con agua *ad libitum*. En cada nivel de dosificación se utilizó un grupo de control del vehículo.

Para la determinación de la farmacocinética *in vivo* del derivado se utilizaron como animales de prueba conejos suizos albinos macho sanos, con un peso aproximado de 1.5 kg. Los conejos se alimentaron con pienso (bolitas estándar, Pranav Agro Industries, Sanghli, India), vegetales (zanahorias y col) y con acceso libre a agua. Cada conejo se alojó por separado en un entorno con humedad controlada y a una temperatura de entre 18 °C y 21 °C. Se administraron a los animales experimentales 8 mg/kg de equivalente de base de eritromicina como sal de folato, por vía intravenosa a través de la vena marginal de la oreja. La dosis equivalía a la administración de una sola dosis de 500 mg de base de eritromicina a un humano adulto de 70 kg de peso.

Se tomaron muestras de sangre (0,5 ml) inmediatamente después de la inyección y a distintos intervalos de tiempo durante las tres horas siguientes a la inyección. La potencia de la eritromicina en suero se determinó por el método de Grove y Randall²⁵, utilizando *Sarcina lutea* ATCC 9341 como organismo de prueba.

Como estándar de referencia durante los estudios *in vitro* e *in vivo* se utilizó base de eritromicina (920 µg/mg).

Each rabbit was housed separately in humidity control environment maintained at 18°C to 21°C. The experimental animals were administered intravenously, 8mg/kg of erythromycin base equivalent as folate salt, through the marginal ear vein. The dose was equivalent to a single 70kg human adult dose of 500 mg erythromycin base. Blood samples (0.5ml) were taken immediately after giving injection and at different time intervals for about three hours after injection. Erythromycin potency in serum was determined by the method of Grove and Randall²⁵, using *Sarcina lutea* ATCC 9341 as the test organism. Erythromycin base (920µg/mg) was used as reference standard during *in vitro* and *in vivo* studies.

3. RESULTS

Erythromycin folate is a yellow, amorphous, fluffy powder, with a very bitter taste. The melting point was recorded as 104.82°C for the derivative and as 190.18°C for erythromycin base, the reference standard (Fig.1). The specific rotations were - 86.11° and - 68° for the derivative and the base respectively. The solubility data of erythromycin base and erythromycin folate (table 1) indicate that the derivative is more soluble in methanol, ethanol and propylene glycol and less soluble in water, octanol, phosphate buffer pH7.4, acetone, chloroform and ethyl acetate. The thin layer chromatographic investigations of the derivative in three different solvent systems showed single spot for both the base and the derivative. The R_f values are given in table 2. The pH and the partition coefficient values of the derivative are given in table 3. The *in vitro* antimicrobial spectrum (Minimum Inhibitory Concentrations) of erythromycin base and erythromycin folate are given in table 4.

The IR absorption spectra (Figs 2, 3) of erythromycin base and erythromycin folate showed major absorption bands at 3473.97cm⁻¹ and 3469.68cm⁻¹ and at 1732.56cm⁻¹ and 1721.25cm⁻¹ respectively. An additional sharp band was also observed for the derivative at 1615.18cm⁻¹. In the H¹ NMR spectra (Figs 4, 5), of the derivative there was a specific difference in the region of 2ppm to 4ppm. The *in vitro* potency of erythromycin folate and

3. RESULTADOS

El folato de eritromicina es un polvo amarillo, amorfo, suave y esponjoso, con un sabor muy amargo. El punto de fusión registrado fue de 104,82 °C para el derivado y de 190,18 °C para la base de eritromicina, el estándar de referencia (fig. 1). Las rotaciones específicas fueron $-86,11^\circ$ y -68° para el derivado y la base respectivamente. Los datos de solubilidad de la base y el folato de eritromicina (tabla 1) indican que el derivado presenta mayor solubilidad en metanol, etanol y propileno glicol, y menor solubilidad en agua, octanol, tampón fosfato pH 7,4, acetona, cloroformo y acetato de etilo. Los estudios de cromatografía de capa fina del derivado en tres sistemas distintos de disolvente presentaron un solo punto tanto para la base como para el derivado. Los valores de R_f se indican en la tabla 2. Los valores de pH y coeficiente de partición del derivado se indican en la tabla 3. Los espectros antimicrobianos *in vitro* (concentraciones inhibitorias mínimas) de base de eritromicina y folato de eritromicina se indican en la tabla 4.

Los espectros de absorción de IR (figs. 2 y 3) de la base de eritromicina y el folato de eritromicina presentaron mayores bandas de absorción a $3473,97\text{ cm}^{-1}$ y $3469,68\text{ cm}^{-1}$ y a $1732,56\text{ cm}^{-1}$ y $1721,25\text{ cm}^{-1}$ respectivamente. En el derivado se observó una banda claramente definida adicional a $1615,18\text{ cm}^{-1}$. En los espectros de RMN H^1 (figs. 4 y 5) del derivado se observó una diferencia específica en la región de 2 ppm a 4 ppm. La potencia *in vitro* del folato de eritromicina y la base de eritromicina estimada fue de 716 mg/mg y 920 mg/mg respectivamente. Las determinaciones de los valores de LD_{50} del folato y la base de eritromicina administrada por vía oral en ratones fueron de 1200 mg/kg y 1090 mg/kg de peso corporal respectivamente. El grado de fijación proteica del derivado y de la base se encontró alrededor del 90% (tabla 5).

La concentración individual sérica de eritromicina tras la inyección tanto de folato como de base de eritromicina en los animales experimentales declinó de manera bifásica. Los niveles séricos de base y folato de eritromicina se resumen en las tablas 6 y 7.

erythromycin base was estimated as 716mg/mg and 920mg/mg respectively. The LD_{50} values of erythromycin folate and erythromycin base orally in mice were determined as 1200mg/kg and 1090mg/kg body weight respectively. The extent of protein binding of the derivative and the base were found to be around 90% (table 5).

The individual post injection serum erythromycin concentration of both erythromycin folate and erythromycin base in experimental animals declined in a biphasic manner. The individual serum erythromycin levels for erythromycin base and erythromycin folate are summarized in Tables 6 and 7.

TABLA 1. Datos de solubilidad (mg/ml) de la base de eritromicina y el folato de eritromicina a 30 °C

TABLE 1. Solubility data (mg/ml) for erythromycin base and erythromycin folate at 30 °C

Disolventes Solvents	Base (mg/ml)	Derivado (mg/ml)
Agua / Water	2,1	4,0
Metanol	>20	>20
Etanol	>20	>20
Propilenglicol	>20	>20
Tampón pH 7,4	1,8	5,4
Octanol	>20	10,2
Cloroformo	>20	14,1
Acetato de etilo Ethyl acetate	> 20	3,2
Acetona	>20	6,4

TABLA 2. Valores de R_f del folato y la base de eritromicina en distintos sistemas de disolventes, utilizando una placa de gel de sílice GTABLE 2. R_f values of erythromycin folate and erythromycin base in different solvent systems using silica gel G plate

Sistema de disolventes Solvents System	Base	Derivado
Metanol	0,400	0,375
Metanol: Cloroformo (1:1)	0,350	0,283
Metanol: Acetona (1:1)	0,380	0,250

TABLA 3. Coeficiente de partición y pH de la base y el folato de eritromicina en dos sistemas de disolvente distintos

TABLE 3. pH and partition coefficient of erythromycin base and erythromycin folate in two different solvent systems

pH de 1 % p/v de solución acuosa pH of 1 % w/v Aqueous Solution		Coeficiente de partición Partition Coefficient			
Base	Derivado	Cloroformo/agua Chloroform/water		Octanol/agua Octanol/water	
		Base	Derivado	Base	Derivado
8,20	8,35	1,45	1,12	1,60	1,10

TABLA 4. Espectro antimicrobiano in vitro (concentración inhibitoria mínima) de la base y el folato de eritromicina

TABLE 4. in vitro antimicrobial spectrum (Minimum Inhibitory Concentration) of erythromycin base and erythromycin folate

Nº de muestra S.No	Microorganismos Microorganisms	Concentración inhibitoria mínima Minimum Inhibitory Concentration (g/ml)	
		Base	Derivado
1	Staphylococcus aureus NCIM 2079	0,5	1,0
2	Klebsiella pneumoniae NCIM 2957	5,0	0,5
3	Bacillus pumilis NCIM 2327	0,3	0,1
4	Bacillus subtilis NCIM 2063	0,2	0,5
5	Eschrechia coli NCIM 2065	40	20
6	Pseudomonas auroginasa NCIM 2036	0,5	0,4

NCIM – National Collection of Industrial Microorganisms, colección nacional de microorganismos industriales

TABLA 5. Datos de fijación proteica in vitro del folato y la base de eritromicina
 TABLE 5. in vitro protein binding data of erythromycin folate and erythromycin base

Muestra Sample	Grado de fijación proteica (%) Extent of protein binding
Base de eritromicina Erythromycin base	90 ± 0,55
Folato de eritromicina Erythromycin folate	89 ± 0,40

*Valores medios ± D.E. (n = 3) *Values are mean ± S.D (n = 3)

TABLA 6. Datos de concentraciones séricas tras la inyección intravenosa de base de eritromicina
 TABLE 6. Serum concentration data following intravenous injection of erythromycin base

Nº de observaciones No of observations	Tiempo de muestreo Time of sampling (min.)	Concentración sérica de eritromicina de la base (µg/ml)* Serum Erythromycin Concentration* of Base
1	15	3,56 0,04
2	30	2,40 0,07
3	45	1,48 0,04
4	60	1,02 0,14
5	75	0,88 0,04
6	105	0,72 0,04
7	165	0,57 0,01
8	225	0,45 0,01

*Valores medios ± D.E. (n = 5) *Values are mean ± S.D (n = 5)

TABLA 7. Datos de concentraciones séricas tras la inyección intravenosa de folato de eritromicina
 TABLE 7. Serum concentration data following intravenous injection of erythromycin folate.

Nº de observaciones No of observations	Tiempo de muestreo (min.) Time of sampling	Concentración sérica de eritromicina del derivado (µg/ml)* Serum Erythromycin Concentration* of derivative
1	18	6,00 0,08
2	35	4,06 0,08
3	50	3,05 0,50
4	72	2,10 0,08
5	110	1,35 0,05
6	150	1,10 0,07
7	210	0,66 0,01
8	270	0,45 0,05

*Valores medios ± D.E. (n = 5). *Values are mean ± S.D (n = 5)

TABLA 8. Valores de los parámetros farmacocinéticos de la base y el folato de eritromicina
 TABLE 8. Values of Pharmacokinetic parameters of the erythromycin base and erythromycin folate

Parámetros Parameters	Base de eritromicina Erythromycin Base	Folato de eritromicina Erythromycin Folate
C _{po} , g/ml	7,0	9,7
α, min ⁻¹	0,047	0,035
β, min ⁻¹	4,606 10 ⁻³	5,90 10 ⁻³
t _{1/2} (elim), min	150,45	117,45
K ₁₂ , min ⁻¹	0,021	0,011
K ₂₁ , min ⁻¹	0,010	0,015
K _{el} , min ⁻¹	0,020	0,014
V _c %	118,50	102,44
V _d (ss)%	352,20	177,56
V _t %	233,70	75,12

C_{po} –initial serum concentration = A +B (A and B are the intercept on the Y ordinate of the fast (α) and slow (β) segments of the biphasic serum drug decay profile.

t_{1/2} - elimination half-life

K₁₂, K₂₁, K_{el} - first order rate constants for drug distribution for central (K₂₁ = $\frac{\alpha + \beta}{K_{el}}$) and peripheral compartment

(K₁₂ = a+b - K₂₁) - K_{el} and elimination rate constant (K_{el} = $\frac{A + B}{A/\alpha + B/\beta}$) respectively.

(V_c (%)- apparent volume of distribution in central compartment (V_c% = $\frac{\text{dose} \times 100}{C_{po} \times \text{body weight}}$)

V_d (ss) (%)- overall apparent volume of distribution at steady state (V_d (ss) (%) = $\frac{K_{21} + K_{12}}{K_{21}} \times V_c\%$)

V_t (%)- apparent volume of distribution of peripheral compartment (V_d (ss) % - V_c %.)

FIGURE 1. DSC thermogram of erythromycin base (A) and erythromycin folate (B)

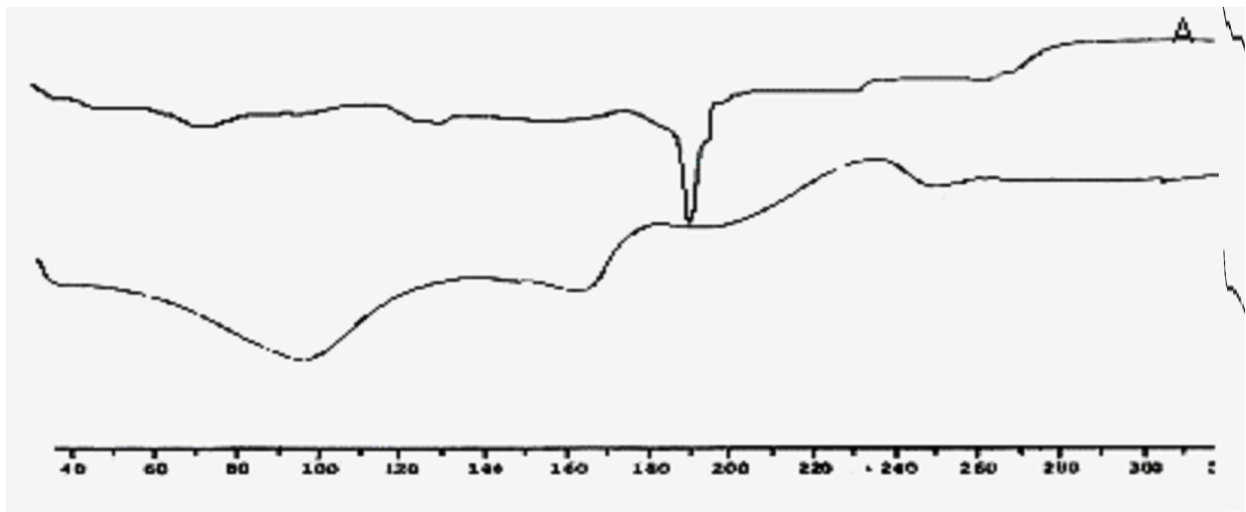


FIGURE 2. IR spectra of erythromycin base

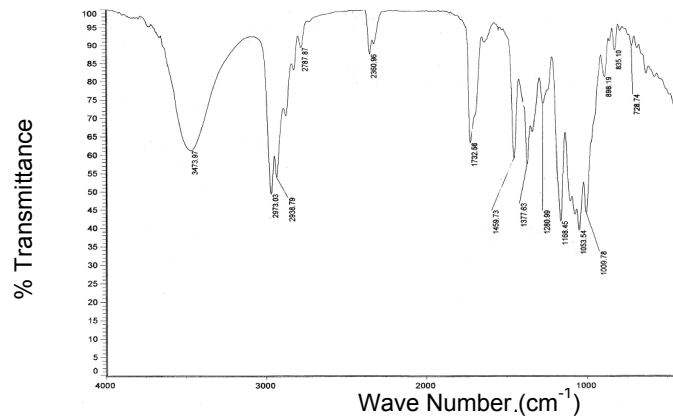


FIGURE 3. IR spectra of erythromycin folate

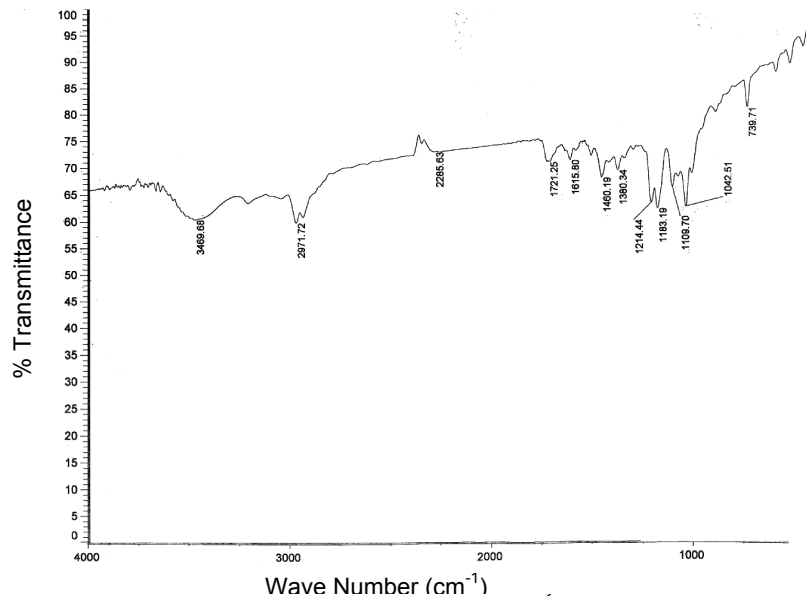
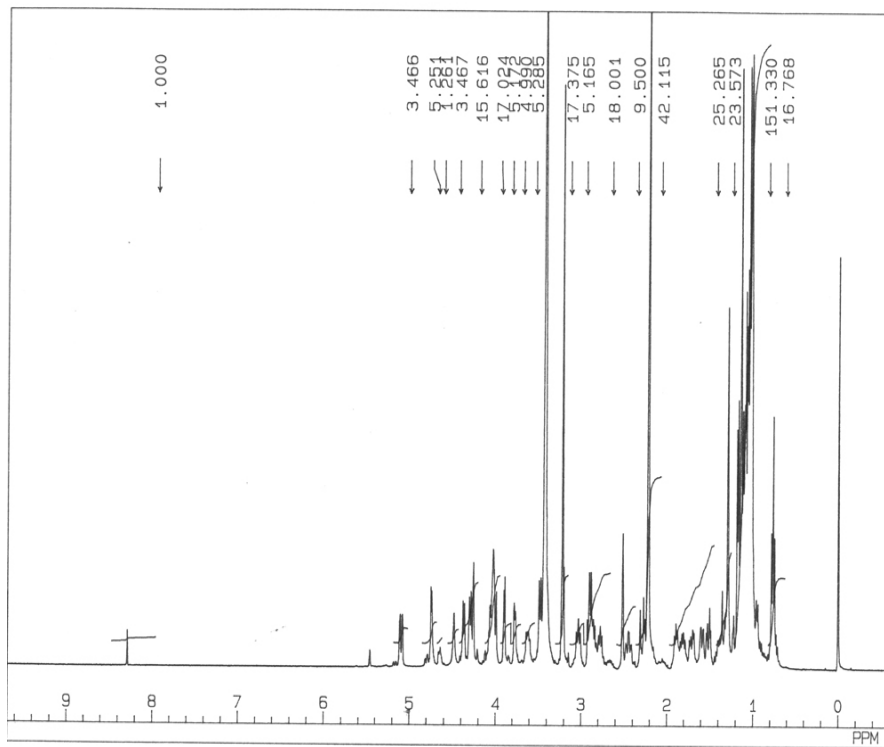
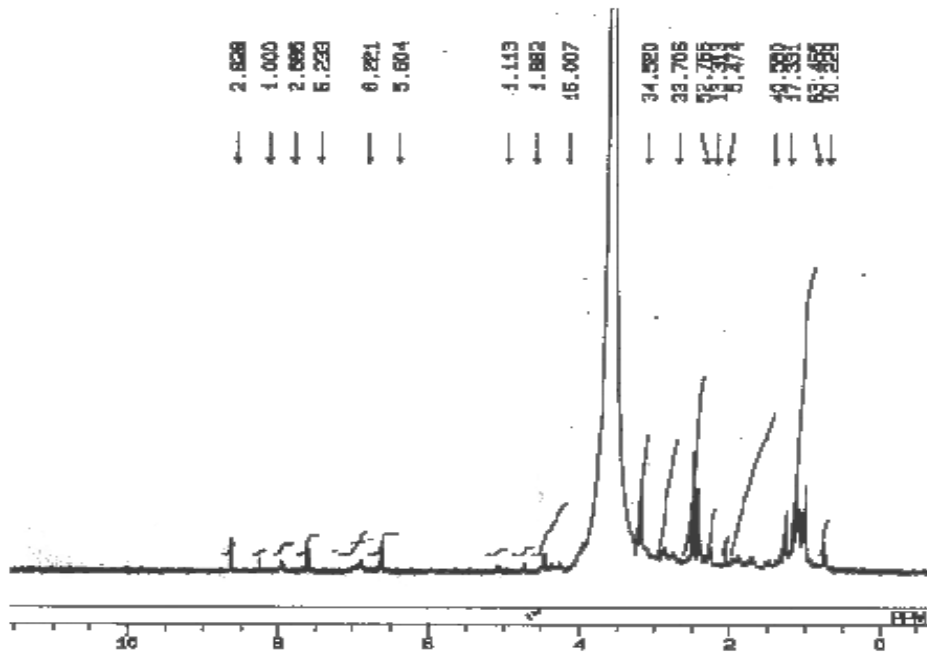


FIGURE 4. NMR spectra of erythromycin base**FIGURE 5.** NMR spectra of erythromycin folate**FIGURE 5.** NMR spectra of erythromycin folate

4. DISCUSIÓN

El derivado, el folato de eritromicina, presenta una menor solubilidad en disolventes orgánicos que la base. Esto puede deberse a la propiedad del componente ácido del derivado, el ácido fólico. El ácido fólico presenta una gran solubilidad en metanol y etanol, es insoluble en agua, cloroformo, acetato de etilo y acetona. La solubilidad del derivado en agua ha aumentado de 2,1 mg/ml a 4,0 mg/ml, y en tampón fosfato pH 7,4 de 1,8 mg/ml a 5,4 mg/ml. El punto único obtenido en el estudio de CCF, tanto en el derivado como en la base, aseguró la homogeneidad del derivado preparado. La partición del derivado en el sistema de agua/cloroformo es ligeramente superior a la del sistema octanol/agua. El menor volumen de distribución del derivado (177,56%) en relación al volumen de distribución de la base (352,2%) es indicativo de la distribución preferencial del derivado en órganos con una gran perfusión sanguínea y concuerdan con las propiedades físicas del derivado.

En el espectro de absorción de IR del derivado, las mayores bandas de absorción a $3469,68\text{ cm}^{-1}$ se deben al estiramiento del grupo hidroxilo, y a $1721,25\text{ cm}^{-1}$ al del grupo carbonilo (en el anillo de lactona de la base de eritromicina hay dos grupos carbonilo y cuatro hidroxilo). Las bandas de absorción anteriores indican la presencia de un anillo intacto de siete miembros de lactona de eritromicina en el folato de eritromicina. La banda de estiramiento C=O del derivado se desplazó a $1721,25\text{ cm}^{-1}$ respecto a los $1731,56\text{ cm}^{-1}$ de la base. La intensidad de la banda también varía, siendo mayor la del derivado que la de la base. Esto sugiere la formación del nuevo derivado. La banda claramente definida adicional observada a $1615,18\text{ cm}^{-1}$ para el derivado confirma también la formación del nuevo derivado.

En el espectro de RMN ^1H del derivado la diferencia específica en la región de 2 ppm a 4 ppm y la aparición de un pico de mayor intensidad a 4 ppm sugieren claramente la formación del derivado. Los resultados de las propiedades fisicoquímicas concuerdan con el estudio anterior de Manna *et al*²⁹⁻³². El espectro antimicrobiano *in vitro* del derivado y la base indica que el derivado es más eficaz contra

4. DISCUSSION

The derivative, erythromycin folate is less soluble in organic solvent than the base. This may be because of the property of the acid component, folic acid, of the derivative. Folic acid is highly soluble in methanol and ethanol, insoluble in water, chloroform, ethyl acetate and acetone. The solubility of the derivative has increased in water from 2.1mg/ml to 4.0mg/ml and in phosphate buffer pH 7.4 from 1.8mg/ml to 5.4mg/ml. The single spot obtained in TLC study for both the derivative and the base ensured the homogeneity of the prepared derivative. The derivative's partitioning is slightly more in chloroform/water system than in octanol/water system. The less volume of distribution of the derivative (177.56%) than the volume of distribution of the base (352.2%) is indicative of the preferential distribution of the derivative in the organs highly perfused by blood and is in conformation with the physical properties of the derivative.

In the IR absorption spectra of the derivative the major absorption bands at 3469.68 cm^{-1} is due to the hydroxyl group stretching and at 1721.25 cm^{-1} is for the carbonyl group stretching (two carbonyl groups and four hydroxyl groups are present in the lactone ring of erythromycin base). The above absorption bands indicate the presence of an intact seven membered lactone ring of erythromycin in erythromycin folate. The C=O stretching band for the derivative is shifted to 1721.25 cm^{-1} from 1731.56 cm^{-1} of the base. The intensity of the band also varies with stronger band for the derivative than that of the base. This suggests the formation of the new derivative. The additional sharp band observed at 1615.18 cm^{-1} for the derivative also confirms the formation of the new derivative.

In the ^1H NMR spectra of the derivative the specific difference in the region of 2ppm to 4ppm and the appearance of a peak with more intensity at 4ppm strongly suggests the formation of the derivative. The results of the physicochemical properties are consistent with Manna *et al*'s²⁹⁻³² previous study. The *in vitro* antimicrobial spectrum of the derivative and the base indicated that the derivative is more effective against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilis* and

Klebsiella pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilis* y *Escherichia coli* que la base de eritromicina, pero menos eficaz frente a otros organismos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

La fijación proteica del derivado de eritromicina observada es casi la misma que la de la base de eritromicina, lo que concuerda con estudios anteriores^{33,34}. El valor de LD₅₀ del derivado (1200 mg/kg) es superior al del de la base (1090 mg/kg). Como el valor de LD₅₀ del folato de eritromicina es unas 30 veces superior al de la dosis terapéutica habitual de base de eritromicina (30 – 40 mg/kg), se espera que el derivado sea muy seguro. No obstante, se deben realizar estudios de toxicidad adicionales, que incluyan estudios de toxicidad subaguda y crónica.

El tipo de perfil seguido por el folato y la base de eritromicina concuerdan con la cinética del modelo de dos compartimientos abierto, produciéndose la eliminación desde el compartimiento central. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores en animales^{33,34} y en voluntarios humanos³⁵. Según este modelo, los niveles de concentración sérica, C_p , se describen mediante la ecuación siguiente:

$$C_p = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$$

$$\text{Donde } A = \frac{X_0(K_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)} \quad \text{y } B = \frac{X_0(K_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)}$$

$$\alpha = \frac{K_{el} + K_{21} + K_{12}}{2} + \frac{\sqrt{(K_{el} + K_{21} + K_{12})^2 - 4K_{21}K_{el}}}{2}$$

$$\beta = \frac{K_{el} + K_{21} + K_{12}}{2} - \frac{\sqrt{(K_{el} + K_{21} + K_{12})^2 - 4K_{21}K_{el}}}{2}$$

K_{12} y K_{21} son constantes de primer orden para la distribución de fármaco entre los compartimientos central y periféricos, y K_{el} es la constante de eliminación del fármaco respectivamente. X_0 es la dosis, V_c es el volumen de distribución aparente del compartimiento central; t es el tiempo total transcurrido desde el momento de la inyección; α y β son constantes complejas, donde $\alpha > \beta$; y la vida media de eliminación está indicada por $\ln 2/\beta$. Aunque se inyectó el equivalente a la base del derivado, se observaron variaciones en los valores farmacocinéticos (tabla 8) entre el folato

Escherichia coli than erythromycin base but less effective against other organisms viz. *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

The protein binding of the erythromycin derivative is found to be almost same as that of erythromycin base and is in conformation with earlier studies^{33,34}. The LD₅₀ value of the derivative (1200mg/kg) is higher than the base (1090mg/kg). As the LD₅₀ value of erythromycin folate is around 30 fold higher than the usual therapeutic dose of erythromycin base (30 – 40mg/kg), the derivative is expected to be very safe. However, further toxicity studies eg. subacute and chronic toxicity studies should be carried out.

The type of profile followed by erythromycin base and folate are consistent with the kinetics of open two-compartment model, with elimination occurring from central compartment. These results are also consistent with those obtained in earlier studies in animals^{33,34} and human volunteers³⁵. According to this model serum concentration levels, C_p , are described by

$$C_p = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$$

$$\text{Where, } A = \frac{X_0(\alpha - K_{21})}{V_c(\alpha - \beta)}$$

$$\text{and } B = \frac{X_0(K_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)}$$

$$\alpha = \frac{K_{el} + K_{21} + K_{12}}{2} + \frac{\sqrt{(K_{el} + K_{21} + K_{12})^2 - 4K_{21}K_{el}}}{2}$$

$$\beta = \frac{K_{el} + K_{21} + K_{12}}{2} - \frac{\sqrt{(K_{el} + K_{21} + K_{12})^2 - 4K_{21}K_{el}}}{2}$$

K_{12} and K_{21} are first order rate constants for drug distribution between central and peripheral compartments and K_{el} is the elimination rate constant of the drug respectively. X_0 is the dose, V_c is the apparent volume of distribution of the central compartment, t is the total time lapsed since the time of injection; α and β are complex rate constants, where; $\alpha > \beta$ and the elimination half life is given by $\ln 2/\beta$. Though base equivalent of the derivative was injected, variations in the pharmacokinetic values (Table 8) were observed between erythromycin folate and erythromycin base.

y la base de eritromicina. La variación indica que es probable que el derivado no tenga la misma eficacia clínica que la base. La mayor concentración sérica alcanzada por el derivado (9,7 $\mu\text{g/ml}$) respecto a la base (7,0 $\mu\text{g/ml}$) durante la fase post distribución concuerda con el valor inferior del volumen de distribución del derivado (177,56%) respecto al de la base (352,2%) y apoya una vida media de eliminación más corta del derivado (117,45 min.) respecto a la de la base (150,45 min.). El valor menor de $V_t\%$ (75,12) respecto al de $V_c\%$ (102,44) para el derivado sugiere que la distribución del derivado es menor en el compartimento periférico y se elimina rápidamente en el central. Los volúmenes de distribución calculados pueden servir de base para calcular las eficiencias de absorción absolutas de la administración oral del derivado de eritromicina.

5. CONCLUSIÓN

Los hallazgos de la presente investigación son alentadores. Las propiedades fisicoquímicas indican que el nuevo derivado es superior al compuesto padre en términos de solubilidad acuosa. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas confirman la adecuación del derivado para su explotación como alternativa superior a la base. El presente trabajo deja un amplio margen para que posteriores trabajos establezcan el derivado como un nuevo fármaco con propiedades mejoradas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente estudio manifiestan su agradecimiento a la University Grants Commission (UGC) de la India por la financiación de este proyecto de investigación.

This variation indicates that the derivative is not likely to have the same clinical efficacy as that of the base. The higher serum concentration attained by the derivative (9.7 $\mu\text{g/ml}$) than the base (7.0 $\mu\text{g/ml}$) during post distribution phase is in conformation with the lower value of volume of distribution of the derivative (177.56%) than that of the base (352.2%) and supports the shorter elimination half-life of the derivative (117.45min) than that of the base (150.45min). The lower value of $V_t\%$ (75.12) than the $V_c\%$ (102.44) value for the derivative suggest that the derivative is less distributed into the peripheral compartment and gets rapidly eliminated from the central compartment. The calculated distribution volumes may provide a basis for calculating absolute absorption efficiencies from oral dose of the erythromycin derivative.

4. CONCLUSION

Findings of the present investigation are encouraging. Physicochemical properties indicate that the new derivative is superior to the parent compound in terms of aqueous solubility. The physicochemical and biological properties confirm the suitability of the derivative for exploiting as superior alternative to base. The present work gives impetus for further work to establish the derivative as a new drug with improved properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the University Grants Commission (UGC), India, for funding this Research project.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. British National Formulary 46 British Medical Association, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Pharmaceutical Press, 2003; 274 – 275
2. American Society of Health System Pharmacist, American Hospital Formulary Service, MD, America, 2001; 3316 – 3318
3. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. in: Pharmacology. Harvey RA, Champe PC. ed., Lipincott Williams and Wilkins, New York, 2000; 317 – 321.

4. Haslet C, Edwin R, Chilvers R, John A, Hunter A, Boon NA. in: Principles and Practice of Medicine. Davidson, ed., Churchill Livingstone, London, 2000; 344.
5. Laurence DR, Bennet AN, Brown NJ. in; Clinical Pharmacology. D. R. Laurence ed., Churchill Livingstone, 1997; 208 – 209.
6. Garrod LP, Lambert HP, Grady FO. in; Antibiotics and Chemotherapy.
7. Bray and Stephens, Preparation of erythromycin estolate (ester salt). U.S. Patent 3,000,874 (1961 to Lilly Laboratories, U.S.A).
8. Walasek OF, Preparation of erythromycin stearate, (salt). U.S. Patent 2,881,163 (1959 to Abbott, Laboratories, U.S.A).
9. Shepher, Preparation of erythromycin glucoheptonate (salt). U.S. Patent 2,852,429 (1958 to Lilly Laboratories, U.S.A).
10. Hoffhine, Preparation of erythromycin lactobionate (salt). U.S. Patent 2,761,859 (1956 to Abbott, Laboratories, U.S.A).
11. Stephens VC, Preparation of erythromycin propionate. U.S. Patent 2,993,833 (1961 to Lilly, Laboratories, U.S.A).
12. Morvolla MLA, Preparation of erythromycin acistrate (ester prodrug). Belgian Patent, 901,411 (1985 to Orion Yhtyma Oy).
13. Honkanen EJ, Preparation of erythromycin acistrate (ester prodrug). U.S. Patent 4,599,326 (1986 to Orion Ohiam).
14. Chun AHC, Seitz JA. Drug Bioavailability Information and its Utility. J. Am. Pharm. Ass. 1974; 14: 407 - 414.
15. Chun AHC, Seitz JA, Pharmacokinetics and Biological Availability of Erythromycin. Infection. 1977; 5 (suppl): 14 - 22.
16. Mathur CE, Austin KC, Philpot CR, McDonald PJ. Absorption and oral bioavailability of erythromycin. Br. J. Clin. Pharmac. 1981; 12: 131 – 140.
17. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of first occurrence of neural tube defects by preconceptional vitamin supplementation. N Engl. J. Med. 1992; 327: 1831 – 1835.
18. Bery RJ, Li Z, Errickson J. Prevention of neural – tube defects with folic acid in China. N Engl. J. Med. 1999; 341: 1485 – 1490.
19. Clarke R, Robert J. Folate, Vitamin B₁₂ and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. Archives of Neurology. 1998; 55: 1449 – 1455.
20. Ali M, Killian R. Homocysteine: an emerging age related cardiovascular risk factor. Geriatrics. 1999; 55: 41 – 51.
21. Hultberg B, Agardh CD, Agardh E, Lovestam Adrian M. Poor metabolic control early age onset, marginal folate deficiency are associated with increasing levels of plasma homocysteine in insulin dependent diabetes mellitus. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1997; 57: 595 – 600.
22. Dutta SK, Basu SK. Preparation of Erythromycin Aldobionate. Indian patent No. 142584 to Jadavpur University, Calcutta, India 1977.
23. Dutta SK, Basu SK. Preparation of Erythromycin Aldobionate. US Patent No. 4137378 to Jadavpur University, Calcutta, India 1979.
24. Marsh JR, Weiss PJ. Solubility of Antibiotics in 26 Solvents. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 1977; 50 (2): 457 – 462.
25. Grove DC, Randall UA. in: Assay methods of Antibiotics - A laboratory manual, Medical encyclopedia. Welch H, Marti-Jbanez F, ed., Marcel Dekker Inc., New York 1955; 7.
26. Jorgensen JA, Turnbridge JD, J. A. Washington: in Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yotka RH, ed., American Society of Microbiology Press, Washington D.C, 1999; 1526 – 1530.
27. Edsall JT, Wymann J. in Biophysical Chemistry. Vol. I, Academic Press Inc., New York, 1958; 594 – 595.
28. OECD (2001) Guidelines for testing of chemicals for acute oral toxicity - up and down procedure no 425 (Adapted 17th December, 2001).
29. Manna PK, Basu S.K, Goswami BB. Studies on Erythromycin Melibionate – a New Water Soluble Salt of Erythromycin. Drug. Dev. Ind. Pharm. 1995; 21(18): 2097 - 2107.
30. Manna PK, Basu SK. Preparation and Evaluation of Erythromycin Fumarate - a New Derivative of Erythromycin. Drug. Dev. Ind. Pharm. 1998; 24 (9): 879 – 882.
31. Manna PK, Basu SK. Studies of Erythromycin Maltobionate, a new Derivative of Erythromycin. Drug. Dev. Ind. Pharm. 1999; 25 (3): 391 - 395.
32. Manna PK, Kumaran V, Mohanta GP, Manavalan R. Preparation and evaluation of a new erythromycin derivative – erythromycin taurate. Acta Pharm. 2004; 54; 231 – 242.
33. Basu SK, Manna PK, Goswami BB. Intravenous Pharmacokinetics and *in vitro* protein binding studies of two new salts of erythromycin. Drug. Dev. Ind. Pharm. 1990; 16 (10): 1619 - 1632.
34. Basu SK, Manna PK, Goswami BB. Studies on the intravenous Pharmacokinetics in rabbit and *in vitro* protein binding of two new salts of erythromycin: erythromycin maltobionate and erythromycin fumarate. Biopharmaceutics and Drug Disposition 1992; 13: 437 - 443.
35. Welling PG, Craig WA. Pharmacokinetics of Intravenous Erythromycin. Am. J. Of. Pharm. Sci. 1978; 67: 1057 – 1058.