

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA QUIMICA
ANALITICA DE LOS ANTIBIOTICOS BACITRACINA,
NEOMICINA SULFATO, POLIMIXINA B SULFATO Y TIOTRICINA**

Resumen del trabajo de tesis presentado por ALEJANDRO WANCIER W., DIEGO OROZCO E. y BERNARDO RODRÍGUEZ D. para optar al título de Químico - Farmacéutico.

Presidente de tesis: Dr. EDUARDO CALDERÓN G.

INTRODUCCION

Entre la gran variedad de antibióticos utilizados en la terapéutica moderna, existe un grupo que se caracteriza porque sus componentes poseen estructura y composición química de naturaleza proteica no siempre bien determinada. Entre los más importantes se encuentran: Bacitracina, Neomicina, Polimixina, Tirotricina y Viomicina.

El creciente interés de este tipo de sustancias, nos hizo considerar de especial trascendencia el aspecto de su problemática analítica, el cual es un poco difuso y pudiéramos decir que precario. Al revisar la bibliografía a nuestro alcance, pudimos observar que las reacciones de identidad citadas para estos antibióticos, se apoyan en las de precipitación y coloración de prótidos o sus derivados de hidrólisis, las que, en la mayoría de los casos, se aplican solo parcialmente.

Algo semejante ocurre con las reacciones de coloración: para todos estos antibióticos se mencionan los ensayos generales del biuret y de la ninhidrina, y solo en casos aislados, una que otra reacción de aminoácidos. Además, se conocen algunos de los aminoácidos que integran estas cadenas polipeptídicas y se dispone de algunas reacciones coloreadas para identificarlos.

Todas estas consideraciones nos han hecho pensar en una necesaria generalización y comparación de las principales reacciones de precipitación existentes, para luego seleccionar las más sen-

sibles para cada antibiótico y establecer al mismo tiempo las diferencias cualitativas entre ellos.

Similar es la situación en el aspecto del análisis cuantitativo. Las valoraciones oficiales son todas microbiológicas, citándose además espectrofotometrías para bacitracina y tirotricina. En métodos en base química, encontramos una gravimetría al estado de fosfotungstato para bacitracina y polimixina y una colorimetría con oxina para la viomicina.

Nuestro propósito es, al emprender este estudio, el de aportar algunas reacciones de identidad no citadas por la literatura, para estos antibióticos, y particularizar aquellas que por su sensibilidad y especificidad sean aplicables.

SUSTANCIAS UTILIZADAS

1: *Bacitracina*. Pureza U.S.P. XV facilitada por Pfizer International, Inc.

2: *Neomicina Sulfato*. Pureza U.S.P. Potencia: 666 mgg./mg. Facilitada por los Laboratorios Merck, Sharp & Dohme, de Colombia.

3: *Polimixina B Sulfato*. Pureza U.S.P. XV. facilitada por Pfizer International, Inc.

4: *Tirotricina*. Pureza U.S.P. Procedencia: S.B. Penick. Facilitada por el Instituto Científico Colombo-Brasilero (Incobra) de Barranquilla.

Era nuestro deseo incluir en el trabajo la *Viomicina*, pero nos fue completamente imposible obtenerla, pues no se encuentra disponible en el país.

REACCIONES COLOREADAS DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS

1. *Reacción de la Ninhidrina*. La ninhidrina reacciona con d-aminoácidos libres, y con proteínas, proteosas, peptonas y péptidos, para dar un color azul. La reacción es general y a la vez es muy sensible para detectar proteínas o sus productos de hidrólisis. Aparentemente, todos los aminoácidos dan reacción positiva con la ninhidrina. Los colores resultantes de las reacciones de los diferentes aminoácidos son diferentes en intensidad y por eso la reacción no puede ser usada para la determinación cuantitativa colorimétrica de los aminoácidos en mezclas. Sin embargo puede usarse en la valoración de aminoácidos solos, en solución pura, comparando el color con un patrón.

2. *La Reacción del Biuret.* Cuando se calienta la úrea a 180° C se descompone para formar biuret. Si se trata una solución fuertemente alcalina de Biuret con CuSO₄ diluido, se obtiene un color violeta.

Esta reacción la dan las sustancias que contengan dos grupos —CONH₂, unidos directamente o por medio de un átomo de C ó N. Los compuestos que tienen grupos —CH₂NH₂, —C(NH)-NH₂ y —CSNH₂, en cambio del grupo —CONH₂, dan la reacción. Las estructuras peptídicas encontradas en las proteínas y sus derivados

que contengan uniones $\text{—CO—NH—}\overset{\text{R}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}\text{—CO—NH—}$ también dan la re-

acción; de los aminoácidos, la histidina da positivo. Los dipéptidos no dan la reacción, pues se requieren dos o más enlaces peptídicos. Cuando las soluciones de proteínas son muy alcalinas, debido a KOH o NaOH, y se agrega una solución muy diluida de sulfato de cobre, se obtienen colores de púrpura a rosáceo, según la complejidad de la proteína. Las proteínas dan un color púrpura mientras que las proteosas y peptonas dan color francamente rosado, y los péptidos, un rosado muy débil. La reacción del biuret se debe aparentemente a la coordinación del ión cúprico, con el par de electrones no compartidos del nitrógeno peptídico, y el oxígeno del agua, para formar un complejo coordinado coloreado.

Las sales de amonio en gran cantidad interfieren la reacción. La reacción del biuret se usa mucho en la búsqueda de proteínas en materiales biológicos (1).

3. *Reacción de Millon.* El reactivo es una solución de nitrito y nitrato mercúricos, y HNO₃. Cuando se agrega a una proteína en solución, se forma un precipitado blanco, que se vuelve rojo por calentamiento. Las proteosas secundarias y las peptonas dan una solución roja. Las proteínas insolubles al suspenderlas en agua y calentarlas con el reactivo se solubilizan. Esta reacción no es específica para las proteínas, pues la dan los fenoles en general; es específica para la Tirosina. Las soluciones alcalinas deben ser neutralizadas con ácidos (HCl), pues de otro modo se precipita el mercurio del reactivo. Los cloruros interfieren, pues se libera cloro, el cual rompe el compuesto coloreado. La reacción se debe a la formación de un compuesto de mercurio coloreado, con el grupo hidroxifenilo (2).

4. *Reacción de Hopkins-Cole.* Es característica para el anillo indol, y otros compuestos que, como el triptófano, para el cual es específica, dan la reacción. La naturaleza de los productos coloreados

dos formados, es desconocida. El formaldehido usado en igual forma, da color violeta (Reacción de Acrré-Rosenheim).

Cuando se agregan p-dimetilamino benzaldehido (Reactivo de Ehrlich) y HCl fuerte a una solución de triptófano o proteínas que lo contengan, y se calienta la mezcla, aparece un color azul oscuro.

5. *Reacción de Nitroprusiato.* Las proteínas que contienen grupos —SH libres (cisteína) dan un color rojizo con el nitroprusiato de sodio, cuya fórmula es: $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en solución amoniacal. Muchas proteínas que dan prueba positiva, la dan negativa después de desnaturalizarlas por coagulación, o por otros medios indicándose así la liberación de grupos —SH. Los grupos —S-S— pueden ser reducidos a —SH por medio de agentes reductores, tales como NaCN, después de lo cual, la reacción con el nitroprusiato da positiva.

6. *Reacción de Follin.* El reactivo de Follin es 1-2-naftoquinona-4-sulfonato sódico. Este reactivo da un color rojo profundo con los aminoácidos, en presencia de álcalis. Fue usado por Follin en el desarrollo de métodos colorimétricos generales para determinación cuantitativa de amino-ácidos.

7. *Reacción de Sullivan.* Sullivan y otros han desarrollado un método cuantitativo colorimétrico, específico para la cisteína, (y la cistina) en hidrolizados de proteínas. Cuando la cisteína se trata con 1-2-naftoquinona sulfonato sódico, en solución alcalina y en presencia de una sustancia fuertemente reductora, como tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) produce un color rojo. El método ha sido muy usado (3).

8. *Reacción de Sakaguchi.* Esta reacción es una prueba para la arginina, libre o combinada en proteínas. La prueba consiste en tratar la solución muestra con α -naftol, e hipoclorito de sodio desarrollándose lentamente un color rojo intenso. Varias sustancias que contienen el grupo guanidina dan la reacción, por lo cual es prueba específica para la arginina. La arginina libre da respuesta positiva en concentraciones de 0.0004 mgs. por centímetro cúbico.

La reacción se ha estandarizado y adaptado a la determinación cuantitativa de la arginina.

9. *Prueba del azufre no oxidado.* Es una prueba para determinar la presencia de amino-ácidos que contienen azufre.

La muestra se hierve con un álcali fuerte, para eliminar el azufre en forma de Na_2S , el cual es detectado por adición de acetato de plomo, con lo cual se produce Sulfuro de plomo, cuyo color puede variar de castaño a negro (4).

ANTIBIOTICOS POLIPEPTIDICOS Y ALCALOIDES

Se ha demostrado la evidencia de la existencia de la naturaleza polipeptídica de algunos antibióticos; pero en algunos casos, por lo menos, esta naturaleza es aparentemente muy diferente de la de los polipéptidos que se cree que generalmente están referidos a la hidrólisis de las proteínas: la Gramicidina y la Tirocidina, por ejemplo, resisten a la acción de las enzimas proteolíticas. En la Tirocidina, casi toda la fenilalanina, y en la Gramicidina, casi toda la leucina y la mitad de la valina, son de forma normal, es decir de forma D. Además, la Gramicidina no tiene grupos amino ni carboxilo libres.

Una posible explicación de estas observaciones, puede ser hallada en la estructura de otros agentes químicos terapéuticos naturales (5).

En contraste con los animales, las plantas no tienen órganos de excreción. Muchas de las sustancias nitrogenadas acumuladas, permanecen en los canales donde está la savia hasta la destrucción total de las plantas por las bacterias. La savia de las plantas frescas contiene cantidades apreciables de aminoácidos libres y de asparagina y glutamina, las cuales son amidas. Además de esos compuestos, muchas plantas contienen sustancias básicas nitrogenadas llamadas alcaloides, los cuales son de especial importancia, dentro del campo de la terapéutica química. Actualmente se conocen centenares de alcaloides (6). La íntima relación entre alcaloides y aminoácidos, es fácilmente reconocible en los alcaloides del ergot.

El ergot es un hongo, del cual se pueden aislar una gran cantidad de compuestos, fisiológicamente activos con respecto a animales superiores, aunque no son bacteriostáticos. Esos compuestos, se clasifican generalmente como alcaloides, pero también se pueden clasificar como polipéptidos, puesto que de su hidrólisis resultan aminoácidos, y otras sustancias estrechamente relacionadas. Se advierte que dicha hidrólisis no es de tipo proteolítico.

Todos y cada uno de los alcaloides del ergot contienen ácido lisérgico, el cual se forma por la condensación de la forma quinoide 5-hidroxitriptofano, con ácido dihidronicotínico. El ácido lisérgico está unido por un enlace amido, —CO-NH— a una cadena peptídica cíclica, formada por residuos de aminoácidos. En la ergotamina, los aminoácidos componentes son, la prolina, fenilalanina e hidroxilalanina (Stoll) (7).

Algunas de las sustancias antibióticas, se parecen a los alcaloides, en que son básicas, y están constituidas por aminoácidos.

Por otra parte algunos alcaloides, como la emetina y la quinina poseen propiedades antibióticas, la primera contra *Entamoeba histolítica*, y la segunda contra los parásitos agentes causales de la malaria (8).

BACITRACINA

Fue descubierta en 1945 por Johnson, Anker y Meleney. Ya en 1943 se aisló esta substancia antibiótica de los filtrados de cultivos de la cepa Tracey I. A este germen perteneciente al grupo de *Bac. subtilis* se le ha identificado como *Bac. licheniformis* (8, 9, 10).

La actividad de la Bacitracina se dirige principalmente contra cocos grampositivos y gramnegativos, bacilos grampositivos y sus variedades resistentes a la Penicilina, la *Spirocheta pallida* y la *Entamoeba histolítica*. No detiene el crecimiento de bacilos gramnegativos, salvo el del *Haemophilus influenzae* (8, 9).

Presenta alguna acción sinérgica con otros antibióticos, especialmente con la Penicilina. La purificación de la Bacitracina, da preparados con una potencia de cerca de 60 unidades por miligramo, que con el tiempo baja a 45 unidades por miligramo. Se han preparado formas más estables, como la Bacitracina-Zinc y la Bacitracina metilendisalicilato (9, 10).

Química. De la mezcla de Bacitracinas se han aislado diversos componentes (A, A', B, D, E, F₁, F₂, F₃ y G) (8, 9). Por medio de las técnicas de "Distribución por contracorriente", Craig y otros, en el Instituto Rockefeller reportaron el fraccionamiento de la Bacitracina. El mayor componente, la Bacitracina A representa el 83% de la actividad, la cual está complementada por dos polipéptidos relacionados, las Bacitracinas B y C (9, 10).

La hidrólisis de las preparaciones comerciales de Bacitracina, dió un número de aminoácidos que fueron identificados como: L-Cisteína; ácido D-Glutámico; L-Histidina; L-Isoleucina; L-Leucina; L-Lisina; D-Ornitina; D-Fenilalanina; ácido DL-Aspártico (10, 11, 12).

Se detectó también amoníaco (10).

Por el método ya mencionado, en la Bacitracina comercial se separó otra vez la Bacitracina A, y la de Newton, la Bacitracina B, y otros polipéptidos activos, las Bacitracinas D, E, F. La Bacitracina F es un producto de la transformación de la Bacitracina A, cuando ésta se abandona en solución neutra por varios días.

Usando el método de sustitución parcial se demostró que el antibiótico tiene un peso molecular de 1470, correspondiente a la fórmula C₆₆H₁₀₃O₁₆N₁₇S (13, 14).

Solubilidad y estabilidad. Es una sustancia neutra, de color pardo claro, fácilmente soluble en el agua, y en solución salina fisiológica, y menos en los alcoholes (8, 9).

$$[\alpha]_D^{23} = + 5^\circ (\pm 2,5^\circ) \text{ (12, 13).}$$

Soluble en etanol, metanol, isopropanol, n-butanol, ciclohexano. Insoluble en éter, cloroformo, acetona, pH de la solución acuosa con 10.000 u/ml.: 5,5 a 7,5 (13, 14).

En seco, con un grado de pureza de un 80% (40 - 50 u/mg.) se conserva durante 18 meses; a temperatura de 56° C, a mayor temperatura se descompone e inactiva rápidamente. En solución neutra o ligeramente ácida (pH 5 - 7), y a 4° C, la Bacitracina no se conserva más de 4 semanas. En medio alcalino pierde pronto actividad, y lo mismo calentándola a 100° C por más de quince minutos. La sangre, el suero, el pus y la penicilinasas no influyen en la actividad de la Bacitracina (8, 9).

Estandarización. La actividad antibiótica de la Bacitracina se expresa en unidades, a base del grado de inhibición determinado por métodos de ensayo establecidos. Una unidad corresponde a 26 gamas de Bacitracina, o a 23,8 gamas de "Bacitracin master standard" (tipo, patrón, modelo), o sea, a 0,0182 mgs. de producto patrón internacional, que contiene 55 unidades por un miligramo. El producto puro, con una actividad de 66 u/mg. es relativamente estable (8, 9, 14, 15).

La unidad es la cantidad que en una dilución 1:1024, inhibe la multiplicación de una siembra prueba de *Streptococo hemolítico* (15, 16).

NEOMICINA

En 1949 descubrieron por primera vez la Neomicina, Waksman y Lechavalier, quienes han aislado este antibiótico de una especie de estreptomiceto, el *Strep. fradiae*. De los filtrados de cultivos de este hongo se han aislado cuatro antibióticos distintos. Neomicina A (neamina), Neomicinas B y C (diferencias de isomería) y Fradicina (de acción fungistática). Únicamente tiene interés terapéutico la Neomicina B.

La *esfera de actividad* comprende, principalmente, gérmenes grampositivos (grupo coli, bacilo de Friedlander, shigelas, salmonelas, brucelas y otros, algunos bacilos piocianicos, y sobre todo, el *Proteus vulgaris*) y ciertos agentes infecciosos grampositivos (estafilococos, bacilos diftéricos, pero no el grupo de estreptococos).

Además, este antibiótico tiene *acción tuberculostática* (2 a 10 u./c.c.); su *mecanismo es bacteriostático*, pero se hace *bactericida* al elevar ligeramente la concentración (18, 19).

Química. La Neomicina es una sustancia blanca, soluble en agua y de carácter básico de estructura compleja cíclica-acética (20).

$$[\alpha]_D^{25} = +183^\circ \text{ en H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.2N};$$

La Neomicina C:

$$[\alpha]_D^{25} = +121^\circ \text{ en H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.2N (21).}$$

Su fórmula empírica es de $\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{O}_{16}\text{N}_8$, con un peso molecular aproximado de 771 (22, 17).

Estudios hechos por Swart y otros, por "Distribución en contracorriente", revelaron por lo menos tres componente activos. Luego siguió la separación de las Neomicinas A, B, C, en grupos independientes. Se han preparado N-acetil derivados cristalinos de Neomicina B y C.

Solubilidad y estabilidad. Se disuelve bien en el agua y en solución es termoestable dentro de una amplia escala de pH. En solución alcalina se conserva a la temperatura ambiente por espacio de un año; para evitar la coloración oscura que adopta, se aconseja conservarla en la nevera.

La *actividad óptima la presenta en medio alcalino*. La inactivan pronto el ácido oleico y el nucleínico, y en pequeño grado la cisteína y la hidroxilamina; el suero, el pus, etc., no la alteran, ni tampoco las enzimas bacterianas (18).

La solución acuosa es estable a pH comprendido entre 2 y 6,5 (22).

Estandarización. La actividad se expresa en unidades Waskman (UW, o V).

1 UW es igual a 3,3 gamas de Neomicina base que corresponde a 5 gamas de Sulfato de Neomicina (18).

Otros consideran al patrón internacional como 1000 Ug/mg. (20). La Farmacopea Británica dice que contiene 680 unidades por miligramo (23).

POLIMIXINA

En julio de 1947, dos grupos de investigadores, dirigidos por Benedict y Langlykke, uno formado por Stansly, Sheperd y White; y otro por Ainsworth, Brown y Brownlee, con independencia unos de otros, reportaron la separación de un nuevo antibiótico, proce-

dente de *Bacillus polymixa*; dicho antibiótico se llamó Polimixina (25, 18).

En Augusta, un tercer grupo describió la Aerosporina, sustancia antibiótica producida por *Bacillus aeropus* Greeb. De un posterior análisis de los organismos que las producen, sugirió que las dos sustancias eran probablemente idénticas, pero luego se notaron algunas diferencias entre los antibióticos mismos. La Polimixina resultó ser un complejo formado por cinco polipéptidos semejantes, todos activos, que son las Polimixinas A, B, C, D, E. Son polipéptidos básicos, formados por amino-ácidos, de peso molecular alrededor de 1000; forman sales con los ácidos, que son muy solubles en agua (18).

El campo de acción de la Polimixina comprende electivamente bacterias gramnegativas, o sea gérmenes del grupo coli, *Eberthella typhi*, *Salmonella paratyphi* y otros. Son sensibles a ella salmonelas, shigelas y pasteurelas, así como el *Haemophilus influenzae* y pertussis, y, sobre todo el *Pseudomonas aeruginosa* (B. Pociánico); en cambio, le ofrecen resistencia los gérmenes grampositivos, *Proteus vulgaris*, otros tipos del grupo *Pseudomonas*, y hongos.

El mecanismo de acción es bacteriostático, y bactericida cuando se aumenta la concentración dos a cinco veces (según el tipo de germen, el pH y el material empleado) (25).

Reconocimiento. a) Disolver 2 mgs. en 5 cc. de agua. Añadir 5 cc. de solución diluída de sosa; mezclar y añadir 5 gotas de solución de SO_4Cu al 1% mezclando cuidadosamente después de la adición de cada gota: da un color violeta rojizo.

b) Disolver 2 mgs. en 5 cc. de agua, y añadir 0,5 cc. de solución acuosa al 0,1% de tricetohidrindeno y 2 gotas de piridina. Hervir durante 1 minuto y enfriar: color azul.

La Polimixina A corresponde a la Aerosporina, y la Polimixina D, al antibiótico de Stanley. La Circulina, un antibiótico polipeptídico, procedente de *Bacillus circulans*, y la Polipeptina, obtenida a partir de cultivos de *Bacillus Krzemienskis*, el cual es una variante del mismo organismo, tienen propiedades similares a las de las Polimixinas.

Química. Las Polimixinas son polipéptidos fuertemente básicos, que contienen residuos del ácido α - δ -diamino butírico, con grupos δ -amino libres. La composición en aminoácidos de varios miembros del complejo Polimixina, ya ha sido determinada. La química de la Polimixina B ha sido la más estudiada de todas las de los otros miembros del complejo.

Hausmann y Craig han establecido que la Polixina B comercial, es una mezcla de dos fracciones, las Polimixinas B₁ y B₂, con un 65% de la primera y un 35% de la segunda. Los mismos aminoácidos fueron separados de la hidrólisis de cada uno de los antibióticos. La Polimixina B₁ contiene también ácido isopelargónico: (+) 6-metiloctan-1-oico, que se encuentra en todas las Polimixinas, con excepción quizás de la Polipeptina, que parece contiene un ácido hidroxihexanoico. La Polimixina B₂ contiene un ácido isoocetanoico, cuya estructura no ha sido determinada (18).

En todas las Polimixinas, existe el ácido L- α - δ -diamino butírico, L-treonina, y ácido d-6-metil-octanoico (6MOA) (27). La Polimixina B₁, por medio de hidrólisis parcial, ha sido sometida a estudios semejantes a los efectuados con Bacitracina. Cuando el derivado DNF (dinitrofenilo) fue sometido a esa operación, se obtuvieron residuos de trece polipéptidos. Para determinar qué grupos amino estaban libres, en el compuesto intacto, se hidrolizó totalmente otra muestra del DNF-derivado; la identificación de los aminoácidos DNF-sustituídos, mostró que todos los grupos amino libres, eran grupos δ -amino, de residuos del ácido α - δ -diamino butírico (DAB) (18).

Solubilidad y estabilidad. La Polimixina es soluble en el agua hasta el 40% y en alcohol metílico; en solución de pH 2 - 7 es termoestable, y se inactiva rápidamente en medio fuertemente ácido o alcalino.

Estandarización. El grado de pureza de los preparados de Polimixina existentes es de un 75%, y la actividad se expresa con relación a una sustancia teóricamente pura que contuviese 10.000 unidades por miligramo (24, 25).

La Farmacopea Británica dice que la Polimixina B sulfato debe contener 7874 unidades por miligramo o sea 0,000127 miligramos por unidad (23).

TIROTRICINA (26)

René Dubois en el Rockefeller Institute, fue el pionero en el descubrimiento del complejo antibiótico, Tiroidina-Gramicidina. Considerando la posibilidad de que ciertos microbios pueden producir una enzima capaz de atacar organismos patogénicos si se estimulan debidamente. Dubois inoculó muestras ambientales, con bacterias patógenas. Durante este trabajo (1934) se aisló el *Bacillus brevis*, microorganismo grampositivo, esporulante del suelo, el cual demostró que produce un complejo inhibidor.

Del material activo se separaron fracciones polipeptídicas: una sustancia neutra, la Gramicidina y una sustancia básica, la Tirocidina. Al tratar la Tirotricina con solvente acetona-éter, se extrajo la Gramicidina. Se evaporó el extracto, y por tratamiento con acetona, se cristalizó la Gramicidina. Luego, del residuo, se aisló la Tirocidina, en forma de clorhidrato. Además de que ambos compuestos son cristalinos los estudios por "Distribución en contra-corriente", demostraron que cada uno de ellos es una mezcla de polipéptidos estructuralmente relacionados. La Tirotricina comercial contiene, aproximadamente 80 % de Tirocidina, y 10 % de Gramicidina (27).

Su esfera de actividad antibiótica comprende, sobre todo, micrococos, grampositivos y gramnegativos (estreptococos, neumococos, estafilococos, en menor grado enterococos), y bacilos diftéricos yseudodiftéricos. También se comprueba in vitro cierto efecto contra clostridios, meningococos, gonococos y algunos hongos. Es ineficaz contra gérmenes grampositivos. El modo de acción es, principalmente, bacteriostático y bactericida a concentraciones algo fuertes (28).

Reconocimiento. Agotar durante dos minutos, 5 mg. con 5 cc. de solución de p-dimetilamino-benzaldehído, y añadir dos gotas de solución de nitrito de sodio, y 5 cc. de agua destilada: da color azul (35).

Química. La tirotricina es un polipéptido compuesto de Tirocidina (78 - 87%) y Gramicidina (13 - 22%), con un peso molecular de 3000 - 5000 (34).

De la Tirotricina se han separado los siguientes deca péptidos cíclicos:

Tirocidinas A y B.

Gramicidina D. Ciclopéptido de peso molecular del orden de 2000.

Gramicidina J. Heptapéptido.

Gramicidina S. Decapéptido cíclico. Peso molecular del orden de 1100 - 1300 (29).

La Tirocidina es el principal componente de la Tirotricina. Es un polipéptido básico constituido por 2 mols. de L-triptófano, 2 mols. de L-tirosina, 2 mols. de L-leucina, 2 mols. de L-prolina, 2 mols. de L-valina, 2 mols. de L-ornitina, 2 mols. de ácido L-aspártico, 2 mols de ácido L-glutámico, 2 átomos de cloro y 3 mols de L-fenilalanina y de amoníaco (30).

El complejo de la Tirocidina.

Fue dividido en tres compuestos principales, que son las Tirocidinas A, B y C, por medio de técnica de "Distribución en contracorriente". En la hidrólisis de la Tirocidina A, se pusieron en libertad dos moléculas de NH_4OH y un conocido número de aminoácidos; no se hizo evidente la presencia de algún grupo carboxilo libre (31).

Con la formación de derivados de dinitrofenilo (DNF), se identificaron los grupos aminos libres, que resultaron ser Ornitina y Tirosina. Los grupos delta y gama carboxilos, de los ácidos Glutámico y Aspártico están en forma de carboxamidas, las cuales liberan amoníaco cuando se tratan con ácido fuerte. La ausencia de grupos funcionales terminales, indicó, de acuerdo con estudios anteriores, que el antibiótico es un polipéptido cíclico (31).

El complejo Gramicidina.

La Gramicidina S, fue aislada en 1944 por Gausse y Brazhnikova, de un organismo similar al *Bacillus brevis*, y resultó perteneciente al grupo de la Tirotricina. Fue usada en Rusia al final de la Segunda Guerra Mundial.

Conden y colaboradores, en un estudio reciente, demostraron, que los cinco aminoácidos presentes en el componente más importante de la Gramicidina soviética están dispuestos así: L-valina, L-ornitina, L-leucina, L-fenilalanina, L-prolina. Las propiedades básicas se deberían al grupo delta-amino de la Ornitina. Es de anotar que esa secuencia sea similar a la mitad de la secuencia de los aminoácidos encontrados en la Tirocidina A.

La D-fenilalanina está presente en ambos casos. La Gramicidina S es probablemente un decapeptido cíclico, en el cual la secuencia ya expuesta está repetida. En esto, se parece más a la Tirocidina que a los demás compuestos del complejo (27).

Solubilidad y estabilidad. Polvo de color gris a pardo. Inodoro, insípido. Punto de fusión de 215 - 220° C con descomposición. Es fácilmente soluble en alcohol, propilenoglicol y acetona, e insoluble en agua, cloroformo y éter. Es posible preparar solución acuosa con cloruro de cetilpiridinio (base de amonio cuaternario) como solubilizante (solución isotónica de pH 7,5 con 250 gamas de tirotricina por cc. Tirosolvina "Byk Gulden") (28).

Las soluciones o suspensiones no pueden esterilizarse por el calor. Sin embargo, soluciones al 0.025% con 0.05% de cetrimida resisten bastante bien la calefacción en autoclave y conservan la estabilidad durante seis meses (29).

La Tirotricina es estable, y aún la solución acuosa puede calentarse a 100° C durante dos horas sin que pierda actividad; no se altera al variar el pH entre 3 y 8; su eficacia óptima corresponde a un pH 5,5-7 (Peterson, Lammers y otros). La inactivan in vitro la sangre, el suero y otros humores orgánicos, así como la adición de peptona (28).

No es atacada por las enzimas digestivas o tisulares. La solución alcohólica es estable y resistente a 100° C por 1 hora. No es hidrolizable (31).

ANALISIS CUALITATIVO

REACCIONES DE PRECIPITACION

a) Reacciones. Para este trabajo se seleccionaron las siguientes pruebas:

Primer grupo de reacciones:

1. Con S.R. Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer) (32).
2. Con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme) (33).
3. Con S.R. de Acido Silicotúngstico (Bertrand) (34).
4. Con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff) (33) *.
5. Reactivo de Erdman (33).
6. Con S.R. de Acido Pírico al 1% (35).
7. Reactivo de Rosenthaler (33).
8. Con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Vial) (36).
9. Con S.R. de (NO₃) 2Hg 4N (32).
10. Con S.R. Sulfovanádico (Mandelin) (34).
11. Con S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchar-dat) (44).
12. Con S.R. de Cl₂Hg 0,5N (32).
13. Reactivo de Wasicky (37).
14. Con S.R. de Acetato de Plomo 0,5N (38).
15. Con S.R. de NO₃Ag 0,1N (39).
16. Con S.R. de Acido Fosfotúngstico (Schleiber) (34).

b) Preparación de los reactivos.

* Según fórmula de Deniges.

Solución Reactivo de Yoduro Mercúrico Potásico (R. de Mayer).

Disolver 1,358 Gm. de HgCl_2 en 60 cc. de agua.

Disolver 5 Gm. de KI en 10 cc. de agua.

Mezclar las dos soluciones y añadir agua destilada hasta completar 100 cc.

Reactivo de Yoduro de Cadmio y Potasio (R. de Marme).

Yoduro de Cadmio 5 Gm.

KI 10 Gm.

Agua destilada 100 cc.

Reactivo de Bertrand o de Acido Silicotúngstico.

5 Gm. de $4\text{H}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$.

Disolver en 100 cc. de H_2SO_4 6N.

Nosotros lo modificamos en la siguiente forma:

Acido Silicotúngstico 5 Gm.

Agua destilada 100 cc.

HCl al 0.1 N c.s.p. acidificar.

Solución Reactivo NO_3Ag 0,1 N.

Disolver 17,006 Gm. de NO_3Ag previamente desecado a 110°C en agua destilada para completar 1000 cc.

Reactivo de Yoduro de Bismuto y Potasio (R. de Dragendorff).

8 Gm. de Bi (NO_3) 3. $5\text{H}_2\text{O}$ en 20 cc. de HNO_3 (D 1,18) y 27,2 Gm. de KI en 50 cc. en agua destilada.

Mezclar las dos soluciones.

Nosotros lo modificamos en la siguiente forma:

Colocar en un vaso 5 Gm. de Subnitrato de Bismuto o Carbonato de Bismuto pulverizado y 40 cc. de agua destilada; añadir 10 cc. de HCl concentrado. Si la disolución de la sal de Bismuto no es completa, completarla por adición de HCL gota a gota y agitando. Añadir en seguida una solución de 40 Gm. de KI en 100 cc. de agua destilada. La mezcla de color anaranjado constituye el reactivo.

Reactivo de Erdman.

10 gotas de una mezcla de 10 gotas HNO_3 y 100 cc. de agua destilada, se agrega a 20 cc. de H_2SO_4 concentrado.

Solución Reactivo de Acido Pícrico al 1%.

Disolver el equivalente de 1 Gm. de Trinitrofenol anhidro en 100 cc. de agua destilada caliente. Enfriar y filtrar si es necesario.

Reactivo de Rosenthaler.

Disolver 1 Gm. de Arsenato de Potasio en 100 Gm. de H_2SO_4 concentrado.

Reactivo de Antimoniato de Potasio.

Careli y Vial han propuesto el empleo de un nuevo reactivo:

Oxido Antimonioso 5 Gm.

HCl de $D = 1,12$ 20cc.

KI 40 Gm.

Agua destilada c.s.p. 100 cc.

Solución Reactivo de $(NO_3)_2Hg_4N$.

Disolver 40 Gm. de HgO (amarillo o rojo) en una mezcla de 32 cc. de HNO_3 concentrado y 15 cc. de agua destilada. Resguardar de la luz.

Reactivo de Mandelin o Sulfovanádico.

Disolver una parte de Vanadato de Amonio en 200 partes de H_2SO_4 concentrado.

Reactivo de Bouchardat o de Yoduro de Potasio Yodurado.

I_2 2,4 Gm.

KI 5 Gm.

Agua destilada 100 cc.

Solución Reactivo de $HgCl_2$ 0,5N.

Disolver 6,5 de $HgCl_2$ en agua destilada hasta completar 100 cc.

NOTA: Filtrar la solución una vez completada a volumen.

Reactivo de Wasicky.

Para dimetil aminobenzaldehído 2 Gm.

Acido Sulfúrico concentrado 6 Gm.

Agua destilada 0,4 cc.

Solución Reactivo de Acetato de Plomo 0,5N.

Disolver 9,5 Gm. de cristales transparentes de Acetato de Plomo en agua destilada recientemente hervida para completar a 100 cc. Guardar en frascos bien tapados.

NOTA: Emplear Acetato de Plomo Neutro.

Reactivo de Schleiber o de Acido Fosfotúngstico.

Disolver 100 Gm. de Tungstato de sodio y 70 Gm. de Na_2HPO_4 en 500 cc. de agua destilada; acidificar con HNO_3 .

Nosotros lo modificamos en la siguiente forma:

Tungstato de Sodio 20 Gm.

Agua destilada 100 cc.

H_3PO_4 de $D = 1,13$ 10 Gm.

Llevar a la ebullición durante veinte minutos y acidificar con ácido clorhídrico.

c) Preparación de la muestra y modo de operar.

Hacer las soluciones de los antibióticos en agua destilada, exceptuando la Tirotricina que por ser insoluble se emplea alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos.

Utilizar las siguientes concentraciones:

0,5 mg./cc.; 2 mg./cc.; 6 mg./cc.; 8 mg./cc.; 10 mg./cc.

En una placa de porcelana con cavidades, colocar 1 cc. de la solución problema y dos gotas del reactivo.

Hacer los respectivos blancos utilizando agua destilada y alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos en el caso de la Tirotricina.

d) Exposición y resultados.

Significado de los signos:

(—): ausencia de precipitado.

(+): presencia de precipitado.

A continuación exponemos en una serie de tablas el comportamiento de estos antibióticos frente a los diferentes reactivos a una determinada concentración, aconsejando las reacciones específicas que permiten diferenciarlos entre sí.

TABLA I

BACITRACINA

Sensibilidad de las Reacciones de Precipitación.

| | Cantidad de muestra pesada (mg.) | | | | | Color |
|--|----------------------------------|----|-----|------|-------|----------|
| | 0,5 | 2 | 6 | 8 | 10 | |
| Mayer | — | — | + | ++ | +++ | Blanco |
| Marme | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ | Blanco |
| Bertrand | — | + | ++ | +++ | ++++ | Blanco |
| Dragendorff | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | Naranja |
| Erdman | — | — | + | + | + | Amarillo |
| Acido Picrico 1% | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | Amarillo |
| Rosenthaler | — | — | — | — | — | |
| Antimoniato K' | — | + | ++ | +++ | ++++ | Blanco |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | — | + | ++ | +++ | ++++ | Blanco |
| Mandelin | — | + | ++ | +++ | ++++ | Pardo |
| Bouchardat | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | Café |
| Cloruro Mercurico 0,5N | — | — | + | ++ | +++ | Blanco |
| Wasicky | — | — | + | ++ | +++ | Lila |
| Acetato de Pb 0,5N | — | — | — | — | — | |
| NO ₃ Ag 0,1N | — | — | — | — | — | |
| Acido Fosfotúngstico | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | Blanco |

TABLA II
POLIMIXINA B SULFATO
Sensibilidad de las Reacciones de Precipitación.

| | Cantidad de muestra pesada (mg.) | | | | | Color |
|--|----------------------------------|----|-----|------|-------|-----------------------|
| | 0,5 | 2 | 6 | 8 | 10 | |
| Mayer | + | + | + | + | ++ | Blanco amarillento |
| Marme | -- | + | ++ | +++ | ++++ | Blanco |
| Bertrand | -- | + | ++ | +++ | ++++ | Blanco |
| Dragendorff | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | Zapote |
| Erdman | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Acido Picrico 1% | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | Amarillo |
| Rosenthaler | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Antimoniato K | -- | -- | + | + | + | Amarillo pálido |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | -- | + | + | + | ++ | Amarillo lento |
| Mandelin | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Bouchardat | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | Café |
| Cloruro Mercurico 0,5N | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Wasicky | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Acetato de Pb 0,5N | -- | + | ++ | +++ | ++++ | Blanco |
| NO ₃ Ag 0,1 N | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Acido Fosfotúngstico | + | + | + | + | + | Blanco |

TABLA III
 NEOMICINA SULFATO
 Sensibilidad de las Reacciones de Precipitación.

| | Cantidad de muestra pesada (mg.) | | | | | Color |
|--|----------------------------------|----|-----|---------|-----------|--------|
| | 0,5 | 2 | 6 | 8 | 10 | |
| Mayer | — | — | — | — | — | |
| Marme | — | — | — | — | — | |
| Bertrand | + | ++ | +++ | + + + + | + + + + + | Blanco |
| Dragendorff | — | — | — | — | — | |
| Erdman | — | — | — | — | — | |
| Acido Picrico 1% | — | — | — | — | — | |
| Rosenthaler | — | — | — | — | — | |
| Antimoniato K | — | — | — | — | — | |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | — | + | ++ | + + + | + + + + | Blanco |
| Mandelin | — | — | — | — | — | |
| Bouchardat | — | — | — | — | — | |
| Cloruro Mercurico 0,5N | — | — | + | ++ | +++ | Blanco |
| Wasicky | — | — | — | — | — | |
| Acetato de Pb 0,5N | — | — | + | ++ | ++ | Blanco |
| NO ₃ Ag 0,1N | — | — | — | — | — | |
| Acido Fosfotungstico | + | ++ | +++ | + + + + | + + + + + | Blanco |

TABLA IV

TIROTRICINA U. S. P.

Sensibilidad de las Reacciones de Precipitación.

| | Cantidad de muestra pesada (mg.) | | | | | Color |
|--|----------------------------------|----|-----|------|-------|-----------------------|
| | 0,5 | 2 | 6 | 8 | 10 | |
| Mayer | — | — | + | + | ++ | Blanco |
| Marme | — | — | + | + | + | Blanco |
| Bertrand | — | + | +++ | ++++ | +++++ | Blanco |
| Dragendorff | — | + | ++ | ++ | ++ | Rojo |
| Erdman | — | + | ++ | ++ | ++ | Pardo |
| Acido Picrico 1% | — | — | — | — | — | |
| Rosenthaler | — | — | — | — | — | |
| Antimoniato K | — | — | — | — | — | |
| (NO ₂) ₂ Hg4N | + | + | + | ++ | ++ | Amarillo |
| Mandelin | — | + | ++ | +++ | +++ | Zapote |
| Bouchardat | — | — | — | — | — | |
| Cloruro Mercurico 0,5N | — | — | + | ++ | ++ | Blanco |
| Wasicky | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ | De amarillo a r. s. * |
| Acetato de Pb 0,5N | — | — | — | — | — | |
| NO ₂ Ag 0,1N | — | — | — | — | — | |
| Acido Fosfotungstico | — | — | + | ++ | ++ | Blanco |

* Rojo sangre.

TABLA V

PRUEBAS CUALITATIVAS DIFERENCIALES EN BASE
A REACCIONES DE PRECIPITACION

Muestra: 0,5 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Sif. | Neomicina- Sulfato | Tirotricina USP |
|--|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Mayer | — | + | — | — |
| Marme | + | — | — | — |
| Bertrand | — | — | + | — |
| Dragendorff | + | + | — | — |
| Erdman | — | — | — | — |
| Acido Picrico 1% | + | + | — | — |
| Rosenthaler | — | — | — | — |
| Antimoniato K | — | — | — | — |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | — | — | — | + |
| Mandelin | — | — | — | — |
| Bouchardat | + | + | — | — |
| Cloruro Mercurico 0,5N | — | — | — | — |
| Wasicky | — | — | — | + |
| Acetato de Pb 0,5N | — | — | — | — |
| NO ₃ Ag 0,1N | — | — | — | — |
| Acido Fosfotungstico | + | + | + | — |

TABLA VI

CUALITATIVA DIFERENCIAL EN BASE
A REACCIONES DE PRECIPITACION

Muestra: 2 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Sif. | Neomicina- Sulfato | Tirotricina USP |
|--|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Mayer | — | + | — | — |
| Marme | + | + | — | — |
| Dragendorff | + | + | — | + |
| Erdman | — | — | — | + |
| Acido Picrico 1% | + | + | — | — |
| Rosenthaler | — | — | — | — |
| Antimoniato K | + | — | — | — |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | + | + | + | + |
| Mandelin | + | — | — | + |
| Bouchardat | + | + | — | — |
| Cloruro Mercurico 0,5N | — | — | — | — |
| Wasicky | — | — | — | — |
| Acetato de Pb 0,5N | — | + | — | — |
| NO ₃ Ag 0,1N | — | — | — | — |
| Acido Fosfotungstico | + | + | + | — |

TABLA VII

CUALITATIVA DIFERENCIAL EN BASE
A REACCIONES DE PRECIPITACION

Muestra: 6 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Sif. | Neomicina- Sulfato | Tirotricina USP |
|--|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Mayer | + | + | — | + |
| Marme | + | + | — | + |
| Bertrand | + | + | + | + |
| Dragendorff | + | + | — | + |
| Erdman | + | — | — | + |
| Acido Pírico 1% | + | + | — | — |
| Rosenthaler | — | — | — | — |
| Antimoniato K | + | + | — | — |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | + | + | + | + |
| Mandelin | + | — | — | + |
| Bouchardat | + | + | — | — |
| Cloruro Mercuríco 0,5N | + | — | + | + |
| Wasicky | + | — | — | + |
| Acetato de Pb 0,5N | — | + | + | — |
| NO ₃ Ag 0,1N | — | — | — | — |
| Acido Fosfotúngstico | + | + | + | + |

TABLA VIII

CUALITATIVA DIFERENCIAL EN BASE
A REACCIONES DE PRECIPITACION

Muestra: 8 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Sif. | Neomicina- Sulfato | Tirotricina USP |
|--|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Mayer | + | + | — | + |
| Marme | + | + | — | + |
| Bertrand | + | + | + | + |
| Dragendorff | + | + | — | + |
| Erdman | + | — | — | + |
| Acido Pírico 1% | + | + | — | — |
| Rosenthaler | — | — | — | — |
| Antimoniato K | + | + | — | — |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | + | + | — | — |
| Mandelin | + | — | — | + |
| Bouchardat | + | + | — | — |
| Cloruro Mercuríco 0,5N | + | — | + | + |
| Wasicky | + | — | — | + |
| Acetato de Pb 0,5N | — | + | + | — |
| NO ₃ Ag 0,1N | — | — | — | — |
| Acido Fosfotúngstico | + | + | + | + |

TABLA IX
 CUALITATIVA DIFERENCIAL EN BASE
 A REACCIONES DE PRECIPITACION

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Sif. | Neomicina- Sulfato | Tirotricina USP |
|--|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Mayer | + | + | — | + |
| Marme | + | + | — | + |
| Bertrand | + | + | + | + |
| Dragendorff | + | + | — | + |
| Erdman | + | — | — | + |
| Acido Pítrico 1% | + | + | — | — |
| Rosenthaler | — | — | — | — |
| Antimoniato K | + | + | — | — |
| (NO ₃) ₂ Hg4N | + | + | + | + |
| Mandelin | + | — | — | + |
| Bouchardat | + | + | — | — |
| Cloruro Mercurico 0,5N | + | — | — | + |
| Wasicky | + | — | — | + |
| Acetato de Pb 0,5N | — | + | + | — |
| NO ₃ Ag 0,1N | — | — | — | — |
| Acido Fosfotúngstico | + | + | + | + |

a) Segundo grupo de Reacciones:

17. Reactivo de Molisch (40).
18. Reacción de O-Toluidina (41).
19. Reacción de Imbert (42).
20. Reacción de Esbach (43).
21. Reactivo de Seliwanoff (44).
22. Reacción de Thevenon Rolland (45).
23. Reacción de Purdy (46, 47).
24. Reacción de Robert (48, 49).
25. Reacción de Shevky-Stafford (50).
26. Método de Tauret (51).
27. Reacción de Exton (46, 51).
28. Reacción de Obermayer (52).
29. Reacción de Harrison (53, 54).
30. Reacción de la Bencidina de Adle (55, 41).
31. Reacción de Hupert y Nakayama (56).

b) Preparación de los reactivos.

Reactivo de Molisch.

Disolver 15 Gm. de alfa Naftol en 100 cc. de alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos.

Técnica :

A un centímetro de la solución problema añadir dos gotas del reactivo.

Reacción de la O-Toluidina.

O-Toluidina 4 Gm. (D = 1,008).

Acido Acético (96%) 100 cc.

Técnica :

Mezclar 1 cc. de la solución problema, 1 cc. del reactivo y 1 cc. de agua oxigenada.

Reacción de Imbert.

Solución de Nitroprusiato de sodio al 10% 50 cc.

Acido Acético Glacial concentrado (96%) 50 cc.

Técnica :

Añadir a 1 cc. de la solución problema dos gotas del reactivo.

Reacción de Esbach.

Disolver 1 Gm. de Acido Pírico y 2 Gm. de Acido Cítrico en la cantidad de agua destilada suficiente para que el total sea de 100 cc.

Técnica :

Añadir a 1 cc. de la solución problema dos gotas del reactivo

Reactivo de Selivanoff.

Disolver 0.05 Gm. de resorcina en 100 cc. de HCl diluído (1 parte del concentrado y 2 partes de agua destilada).

Técnica :

Añadir a 1 cc. de la solución problema dos gotas del reactivo

Reacción de Thevenon Rolland.

Piramidón 5 Gm.

Acido Acético al 50% c.s.p. 100 cc.

Técnica :

Añadir a 1 cc. de la solución problema dos cc. del reactivo Mezclar y agregar 1 cc. de agua oxigenada.

Reacción de Purdy.

Solución saturada de NaCl.

Solución de Acido Acético al 50%.

Fue modificada de acuerdo con los apuntes del doctor Galvis :

a) Solución Reactivo de Ferrocianuro de Potasio al 10%.

b) Solución Reactivo de Acido Acético al 50%.

Técnica :

A 1 cc. de la solución problema 0,3 cc. de a y 0,2 cc. de b.

Reacción de Robert.

Solución saturada de SO_4Mg 5 partes.

Acido Nítrico 1 parte.

Fue modificada de acuerdo con los apuntes del doctor Galvis :

Solución saturada de SO_4Mg . 10 cc.

Acido Nítrico concentrado 10 cc.

Técnica :

Colocar 2 cc. del reactivo y estratificar cuidadosamente con 1 cc. de la solución problema.

Reacción de Shevky-Stafford.

Acido Fostotúngstico 15 Gm.

HCl concentrado 50 cc.

Etanol de 95° c.s.p. 100 cc.

Técnica :

Añadir a 1 cc. de la solución problema dos gotas del reactivo.

Método de Tauret.

KI 18 Gm.

Disolver en 20 cc. de agua destilada.

Bicloruro de Mercurio 6.75 Gm.

Disolver en 200 cc. de agua destilada.

Mezclar las dos soluciones y agregar 100 cc. de Acido Acético.

Técnica :

Añadir a 1 cc. de la solución problema dos gotas del reactivo.

Reacción de Exton.

Disolver 200 Gm. de SO_4Na_2 en unos 750 cc. de agua destilada con ayuda del calor, añadir 50 Gm. de ácido sulfosalicílico y diluir con agua destilada hasta completar 1.000 cc.

Nosotros los modificamos de acuerdo con los apuntes del doctor Galvis.

Disolver 50 Gm. de Sulfato de sodio anhidro en unos 80 cc. de agua destilada. Calentar si es necesario. Añadir en frío 50 Gm. de ácido sulfosalicílico. Completar a 1.000 cc. con agua destilada.

Técnica :

Añadir a 1 cc. de la solución problema 1 cc. del reactivo. Calentar a baño María sin llegar a la ebullición.

Reacción de Obermayer.

Cloruro férrico 2 Gm.
HCl concentrado 1.000 cc.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema 1 cc. del reactivo y 0,5 de cloroformo.

Reacción de Harrison.

Modificada por Hawkinson, Natson y Turner:

a. Reactivo de Fouchet.

Es una solución de FeCl_3 al 0.9% en solución de ácido tricloroacético al 25%.

b. Cloruro de bario. (No dice la cantidad).

Nosotros lo modificamos de acuerdo con los apuntes del doctor Galvis:

1. Solución de Ba_2Cl al 10%.

2. Reactivo de Fouchet:

| | |
|------------------------------------|---------|
| Acido tricloroacético | 25 Gm. |
| Solución de FeCl_3 al 10% | 10 cc. |
| Agua destilada c.s.p. | 100 cc. |

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema, 1 cc. de la solución 1 y 1 cc. del reactivo de Fouchet.

Reacción de la Bencidina.

Solución saturada de Bencidina en ácido Acético Glacial.
Agua oxigenada.

En las notas del doctor Galvis aparece como Reacción de la Bencidina de Adler y tiene la siguiente modificación:

Bencidina 1 Gm.
Acido Acético 100 cc.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema, 1,5 cc. del reactivo y 0,5 cc. de agua oxigenada.

Reacción de Hupert Nakayama.

Cl_3Fe 0,4 Gm.
Alcohol etílico de 95° 99 cc.
Acido Clorhídrico concentrado 1 cc.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema, 0,6 cc. de solución de Cloruro de Bario al 10% y 0,4 cc. del reactivo. Calentar a baño María por tres minutos.

a) Preparación de la muestra y modo de operar:

Efectuar las soluciones de los antibióticos en agua destilada, exceptuando la Tirotricina que por ser insoluble debe disolverse en alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos.

Utilizar la siguiente concentración: 10 mg./cc.

Hacer los respectivos blancos utilizando agua destilada y alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos en el caso de la Tirotricina

Las reacciones se efectúan en tubitos de vidrio de 7,5 cm. de largo por 1 cm. de diámetro.

d) Exposición y resultados.

Significado de los signos:

(—): ausencia de precipitado.

(+): presencia de precipitado.

A continuación exponemos en una serie de tablas el comportamiento de estos antibióticos frente a los diferentes reactivos a una determinada concentración aconsejando las reacciones específicas que permiten diferenciarlos entre sí.

TABLA X
BACITRACINA
Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|--|---|--------------------------|
| Molisch | + | Blanco |
| O-Toluidina | — | |
| Imbert | + | |
| Esbach * | + | Amarillo |
| Seliwanoff | — | |
| Thevenon-Rolland | — | |
| Purdy | + | Blanco |
| Robert | — | |
| Shevky-Stafford | + | Blanco |
| Tauret | + | Blanco amarillo lento |
| Exton | + | Blanco |
| Obermayer | — | |
| Harrison N ^o 1 - 2 ** | + | Blanco |
| Adler | — | |
| Hupert y Nakayama | + | |

Observaciones:

* Al agitar no se disuelve el precipitado.

** El antibiótico más BaCl₂ (—). Al agregarle el reactivo de Fouchet da un precipitado blanco.

TABLA XIII
TIROTRICINA U.S.P.

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|-------------------------------|---|----------|
| Molisch | — | |
| O-Toluidina | — | |
| Imbert | — | |
| Esbach * | + | Amarillo |
| Seliwanoff | — | |
| Thevenon-Rolland | — | |
| Purdy | — | |
| Robert ** | — | |
| Shevky-Stafford | — | |
| Tauret | + | Blanco |
| Exton | + | Blanco |
| Obermayer | — | |
| Harrison Nº 1-2 *** | + | Blanco |
| Adler | — | |
| Hupert y Nakayama | — | |

Observaciones:

- * Al agitar se disuelve el precipitado.
- ** El antibiótico más el reactivo de Robert: en la zona de contacto aparece un color ámbar. Al agitar se colorea toda la solución de amarillo.
- *** El antibiótico más BaCl₂: da precipitado blanco. Al agregar reactivo de Fouchet se intensifica el precipitado. El antibiótico más reactivo de Fouchet: (—). Lo cual nos indica que la precipitación es debida al BaCl₂.

TABLA XIV
CUALITATIVA DIFERENCIAL EN BASE
A REACCIONES PRECIPITACION

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Sf. | Neomicina- Sulfato | Tirotricina USP |
|------------------------------|-------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| Molisch | + | + | — | — |
| O-Toluidina | — | — | — | — |
| Imbert | + | — | — | — |
| Esbach | + | + | + | + |
| Seliwanoff | — | — | — | — |
| Thevenon - Rolland | — | — | — | — |
| Purdy | + | — | + | — |
| Robert | — | — | — | Color |
| Shevky-Stafford | + | + | — | — |
| Tauret | + | + | — | + |
| Exton | + | — | — | + |
| Obermayer | — | — | — | — |
| Harrison Nº 1-2 | + | + | — | + |
| Adler | — | — | + | — |
| Hupert y Nakayama | + | + | + | — |

Tercer Grupo de Reacciones:

a) Reacciones.

32. Método de Kingsbury (57).
33. Reacción de Sulkowitch (58).
34. Método de Tsuchiya (57).
35. Reacción de Rous (59).
36. Reacción de Jorissen (60).
37. Reacción de la Orcina de Bial (61).
38. Reacción de Frommer (62).
39. Reacción de Lange (63).
40. Reacción de Rothera (62).
41. Reacción de Takata-Ara (64, 65).

b) Preparación de los reactivos.

Método de Kingsbury.

Solución de Acido Sulfosalicílico al 3%.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema 3 cc. del reactivo.

Reacción de Sulkowitch.

Disolver en agua destilada 2,5 Gm. de Acido Oxálico, 2,5 Gm. de Oxalato de amonio y 5 cc. de Acido Acético glacial de 96% y añadir agua destilada hasta completar 150 cc.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema 1 cc. del reactivo.

Método de Tsuchiya.

Mezclar 1,5 Gm. de Acido Fosfotúngstico con 95 cc. de alcohol etílico de 96° y 5 cc. de HCl diluido.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema 0,5 cc. del reactivo.

Reacción de Rous.

a. Solución de Ferrocianuro de potasio al 2%.

b. Solución de Acido Clorhídrico al 1%.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema 2,5 cc. de a y 2,5 cc. de b.

Reacción de Jorissen.

Solución al 1% de Floroglucina en solución de NaOH al 10%.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema 0,5 cc. del reactivo.

Reacción de la Orcina de Bial.

Disolver 1,5 Gm. de Orcina en 500 cc. de solución de HCl al 30% y se añade 1 cc. de solución de FeCl_3 al 10%.

NOTA: Reemplazar la Orcina por Resorcinol.

Técnica:

Colocar 2,5 cc. del reactivo y calentar y después de retirarlo de la llama añadir 1 cc. de la solución problema gota a gota.

Reacción de Frommer.

Solución A: Solución de sosa cáustica al 40%.

Solución B: Solución alcohólica de Acido Salicílico (aldehído salicílico) al 10%.

NOTA: Empleamos alcohol etílico de 95°.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución del problema 0,2 cc. de la solución A. Añadir una gota de la Solución B. Calentar la parte superior del líquido durante cinco minutos sin que llegue a hervir.

Reacción de Lange.

Solución A: Acido Acético Glacial.

Solución B: Solución concentrada de Nitroprusiato sódico al 20%.

Solución C: Agua Amoniacal fuerte (al 50%).

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema, una gota de la solución A, 1 gota de la solución B, agregar 0,5 cc. de la solución C, con cuidado y sin agitar.

Reacción de Rothera.

Sulfato amónico.

Solución A: Solución concentrada de Nitroprusiato sódico al 20%.

Solución B: Agua amoniacal al 50%.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema, 0,2 Gm. de Sulfato Amónico y una gota de la Solución B. Añadir 0,5 cc. de la solución A con cuidado y sin agitar.

Reacción de Takata-Ara.

Solución de CO_3Na_2 al 10%.

Solución de HgCl_2 al 0,5%.

Fue modificada de acuerdo con las notas del doctor Galvis:
 Solución A: Solución de CO_3Na_2 al 10%.
 Solución B: Solución de HgCl_2 al 0,5% al cual se le ha añadido 0,02 Gm. de Fuschina básica.

Técnica:

Añadir a 1 cc. de la solución problema 0,25 cc. de la Solución A y 0,30 cc. de la Solución B.

c) Preparación de la muestra y modo de operar.

Efectuar las soluciones de los antibióticos en agua destilada, exceptuando la Tirotricina que por ser insoluble se empleó alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos.

Utilizar la siguiente concentración: 10 mg./cc.

Se hicieron los respectivos blancos utilizando agua destilada y alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos en el caso de la Tirotricina.

Las reacciones se efectuaron en tubitos de vidrio de 7,5 cm. de largo por 1 cm. de diámetro.

d) Exposición y resultados.

Significado de los signos:

(—): ausencia de precipitado.

(+): presencia de precipitado.

A continuación exponemos en una serie de tablas el comportamiento de estos antibióticos frente a los diferentes reactivos a una determinada concentración, aconsejando las reacciones específicas que permiten diferenciarlos entre sí.

TABLA XV
 B A C I T R A C I N A
 Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|---------------------|---|-----------------------------|
| Kingsbury | + | Grisáceo |
| Sulkowitch | — | |
| Tsuchiya | + | Blanco |
| Rous | + | Precipitado flo- culento |
| Jorissen | — | |
| Bial | — | |
| Frommer * | + | Blanco amari- lento |
| Lange ** | + | Crema |
| Rothera *** | + | Blanco |
| Takata-Ara | + | Azulado |

Observaciones:

* Un c.c. del antibiótico más 0,2 c.c. de la solución A: precipitado blanco amarillento. Al agregar la solución B se disolvió el precipitado.

** Un c.c. del antibiótico más una gota de solución A, más una gota de solución B: precipitado crema. Al agregar 0,5 c.c. de solución C, hubo floculación y al agitar se disuelve.

*** A 1 c.c. del antibiótico se agrega 0,2 gramos de A (sulfato amónico): precipitado blanco.

Al agregar una gota de solución B, no hubo cambio; al agregar 0,5 c.c. de solución C: hay floculación, y al agitar se disuelve.

TABLA XVI

POLIMIXINA B SULFATO

Muestra: 20 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|-----------------------|---|---------------|
| Kingsbury | — | |
| Sulkowitch | — | |
| Tsuchiya | + | Blanco |
| Rous | — | |
| Jorissen | + | Blanco |
| Bial | — | |
| Frommer * | + | Amarillo |
| Lange | — | |
| Rothera ** | + | |
| Takata-Ara | * | Blanco rojizo |

Observaciones:

* Un c.c. del antibiótico más 0,2 c.c. de solución A: precipitado blanco. Al agregar la solución B el precipitado toma color amarillo.

** En la zona de contacto aparece un ligero enturbiamiento.

TABLA XVII

NEOMICINA SULFATO

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|-----------------------|---|--------|
| Kingsbury | — | |
| Sulkowitch | — | |
| Tsuchiya | + | Blanco |
| Rous | — | |
| Jorissen | — | |
| Bial | — | |
| Frommer | — | |
| Lange | — | |
| Rothera | — | |
| Takata-Ara | + | |

TABLA XVIII
TIROTRICINA U.S.P.

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|--------------------------|---|----------|
| Kingsbury | + | Blanco |
| Sulkowitch | + | Blanco |
| Tsuchiya | + | Blanco |
| Rous | + | Amarillo |
| Jorissen * | + | Blanco |
| Bial | + | Blanco |
| Frommer | - | |
| Lange ** | + | Blanco |
| Rothera | + | Blanco |
| Takata-Ara *** | + | Blanco |

Observaciones:

- * El precipitado blanco que se forma, se disuelve al agitar. Luego se desarrolla un color amarillento.
- ** Aparece una floculación blanca al agregar la solución de amoníaco que al agitar se disuelve.
- *** 1 c.c. del antibiótico más 0,25 c.c. de solución A: se produce precipitado blanco que se disuelve al agitar. Al agregar 0,3 c.c. de solución B, vuelve a precipitar blanco, al agitarse no se disuelve.

TABLA XIX
CUALITATIVA DIFERENCIAL EN BASE
A REACCIONES DE PRECIPITACION

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Slf. | Neomicina-Sulfato | Tirotricina USP |
|----------------------|-------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| Kingsbury | + | - | - | + |
| Sulkowitch | - | - | - | + |
| Tsuchiya | + | + | + | + |
| Rous | + | - | - | + |
| Jorissen | - | + | - | Color |
| Bial | - | - | - | + |
| Frommer | + | + | - | - |
| Lange | + | - | - | + |
| Rothera | + | - | - | + |
| Takata-Ara | + | + | + | + |

REACCIONES DE COLORACION

a) Reacciones. Para este trabajo se seleccionaron las siguientes pruebas:

1. Reactivo N° 1.
2. Reactivo N° 2.

3. Reactivo N° 3.
4. Reactivo N° 4.
5. Con Ninhidrina piridínica (66).
6. Reacción de Mörner (67).
7. Reacción de Haines (68).
8. Reactivo de Ehrlich (69).
9. Reactivo N° 5.
10. Diazo Reacción de Ehrlich.
11. Reacción de Jorissen (60).
12. Reacción de Biuret (71).
13. Xantoproteica (72).
14. Reactivo N° 6.
15. Reactivo de Robert (48).

b) Preparación de los reactivos.

Reactivo N° 1.

Solución de Cloramina al 1%.

Técnica:

- a. A 1 c.c. de la solución problema añadir 1 c.c. del reactivo.
- b. Añadir 4 gotas de NaOH 0,1 N.

Reactivo N° 2.

Solución A:

Alfa-Naftol 0,25 Gm.

NaOH 10 M 0,5 c.c.

Agua destilada 50 c.c.

Solución B:

NaClO 1 Gm.

NaOH 10 M 0,5 c.c.

Agua destilada 100 c.c.

Técnica:

- a. A 1 c.c. de la solución problema añadir respectivamente 1 c.c. de la solución B y 1 c.c. de la solución A.
- b. A 1 c.c. de la solución problema añadir 1 c.c. de la solución A y 1 c.c. de la solución B.

Reactivo N° 3.

Para-Amino-Bencenosulfonamida 0,5 Gm.

Etanol de 95° libre de aldehídos c.s.p. 100 c.c.

Técnica:

- A 1 c.c. de la solución problema añadir 1 c.c. del reactivo.

Reactivo N° 4.

Acido Perclórico al 1%.

S.R. de FeCl_3 al 5%.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 1 c.c. de ácido Perclórico y 1 c.c. de S.R. de FeCl_3 al 5%.

Ninhidrina-Piridínica.

Ninhidrina al 0,1%.

Piridina.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 0,5 c.c. de Ninhidrina al 0,1% y dos gotas de Piridina. Hervir durante un minuto y dejar enfriar.

Reacción de Mörner.

Vertir un c.c. de formol (de 40 volúmenes) en 45 c.c. de agua destilada y añadir 55 c.c. de H_2SO_4 concentrado.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 1 c.c. del reactivo. Calentar suavemente hasta ebullición.

Reacción de Haines.

Disolver 2 Gm. de SO_4Cu en 16 c.c. de agua destilada. Añadir 16 c.c. de glicerina pura y mezclar bien. Añadir 156 c.c. de solución de KOH al 5%.

Técnica:

Hervir 4 c.c. del reactivo (no debe formarse precipitado). Añadir 1 c.c. de la solución problema mientras se mantiene en caliente el reactivo, pero sin hervir.

Reactivo de Ehrlich.

Disolver 10 Gm. de para-Dimetil Amino Benzaldehído y 75 c.c. de HCl concentrado en 75 c.c. de agua destilada.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 1 c.c. del reactivo.

Reactivo N° 5.

Sulfato de cobre 0,01 M.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 5 gotas de SO_4Cu 0,01 M.

Díazo Reacción de Ehrlich.

Reactivo N° 1.
Acido Sulfanílico 1 Gm.
HCl concentrado 10 c.c.
Agua destilada 200 c.c.
Reactivo N° 2.
NO₂Na 0,5 Gm.
Agua destilada 100 c.c.

Técnica:

A 1 c.c. del reactivo N° 1 añadir 0,1 c.c. del reactivo N° 2 y 1 c.c. de la solución problema. Mezclar y cubrir con 1 c.c. de Amoníaco al 50%.

Reacción de Jorissen.

a. Solución de Floroglucina al 1%.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 0,5 c.c. de a.

Reacción de Biuret.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 0,3 c.c. de NaOH y mezclar bien; añadir luego 3 gotas de solución 0,01M de SO₄Cu y mezclar.

Xantoproteica.

A 1 c.c. de la solución problema añadir 0,5 c.c. de HNO₃ concentrado. Mezclar cuidadosamente. Calentar. Dejar enfriar. Añadir cuidadosamente NaOH o NH₄OH en solución.

NOTA: Al final agregamos 0,5 c.c. de NaOH 0,1N.

Reactivo N° 6.

Para Dimetil Amino Azo Benceno 0,5 Gm.
Etanol de 96° libre de aldehídos 100 c.c.

Técnica:

A 1 c.c. de la solución problema añadir 1 c.c. del reactivo.

Reacción de Robert.

Solución saturada de SO₄Mg. 5 partes.
Acido Nítrico 1 parte.
La modificamos de acuerdo con las notas del doctor Galvis:
Solución saturada de SO₄Mg. 10 c.c.
Acido Nítrico concentrado 10 c.c.

Técnica:

Colocar 2 c.c. del reactivo y estratificar cuidadosamente con 1 c.c. de la solución problema.

c) Preparación de la muestra y modo de operar.

Efectuar las soluciones de los antibióticos en agua destilada, exceptuando la Tirotricina que por ser insoluble se empleó alcohol etílico de 95° libre de aldehídos.

Utilizar la siguiente concentración: 10 mg./c.c. Hacer los respectivos blancos utilizando agua destilada y alcohol etílico de 95°, libre de aldehídos en el caso de la Tirotricina.

TABLA I C
B A C I T R A C I N A

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|-------------------------------------|---|-------------|
| Reactivo N° 1 | | |
| a) | — | |
| b) | + | Amarillo |
| Reactivo N° 2 | | |
| a) | + | Pardo-claro |
| b) | + | Pardo-claro |
| Reactivo N° 3 | — | |
| Reactivo N° 4 | — | |
| Ninhidrina-Piridinica * | + | Violeta |
| Mörner | + | Amarillo |
| Haines | + | Morado |
| Reactivo de Ehrlich ** | + | Rosado |
| Reactivo N° 5 | + | Azul |
| Diazo Reacción de Ehrlich | + | Rojo-suave |
| Reactivo N° 6 | — | |
| Jorissen | — | |
| Robert | — | |
| Biuret | + | Lila |
| Xantoproteica | — | |

Observaciones:

* El color aparece al efectuarse el calentamiento.

** La coloración rosada aparece a los dos minutos y se intensifica con el tiempo.

TABLA II C
POLIMIXINA B SULFATO

| REACTIVOS | Color |
|--|-------|
| Reactivo N° 1 | |
| a) * | |
| b) * | |
| Reactivo N° 2 | |
| a) ** | |
| b) ** | |
| Reactivo N° 3 | — |
| Reactivo N° 4 | — |
| Ninhidrina-Piridinica *** | + |
| Mörner | — |
| Haines | ⊥ |
| Reactivo de Ehrlich | — |
| Reactivo N° 5 | + |
| Diazo Reacción de Ehrlich **** | + |
| Jorissen ***** | — |
| Biuret ***** | — |
| Xantoproteica | — |
| Reactivo N° 6 | — |
| Robert | — |

Observaciones:

Reactivo N° 1.

- * a) Aparece un precipitado blanco.
- * b) Al agregar las 4 gotas de NaOH 0,1N se intensifica dicho precipitado.

Reactivo N° 2.

- ** a) 1 c.c. del antibiótico + 1 c.c. de NaClO: precipitado blanco. Al agregar el α-Naftol, el precipitado toma color pardo-amarillento.
- ** b) 1 c.c. del antibiótico + 1 c.c. de α-Naftol: (—). Al agregar NaClO: precipitado pardo-amarillento.
- *** El color aparece al efectuarse el calentamiento.
- **** Aparece un precipitado en la zona de contacto.
- ***** Precipitado flocculento blanco.
- ***** 1 c.c. del antibiótico + 0,3 c.c. de NaOH 10M aparece un precipitado blanco. Al agregar 3 gotas de SO₄Cu: el precipitado toma color violeta rojizo.



TABLA III C
NEOMICINA SULFATO

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|-------------------------------------|---|---------|
| Reactivo N ^o 1 | | |
| a) | — | |
| b) | — | |
| Reactivo N ^o 2 | | |
| a) * | + | Verde |
| b) | — | |
| Reactivo N ^o 3 | — | |
| Reactivo N ^o 4 | — | |
| Ninhidrina-Piridinica * | + | Violeta |
| Mörner | — | |
| Haines | — | |
| Reactivo de Ehrlich | — | |
| Reactivo N ^o 5 | + | Azul |
| Diazo Reacción de Ehrlich | — | |
| Jorissen | — | |
| Biuret | — | |
| Xantoproteica | — | |
| Reactivo N ^o 6 | — | |
| Robert | — | |

* El color aparece al calentar.

TABLA IVC
TIROTRICINA U.S.P.

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | | Color |
|---|---|-------------|
| Reactivo N ^o 1 | | |
| a) * | | |
| b) | — | |
| Reactivo N ^o 2 | | |
| a) ** | + | Amarillo |
| b) ** | — | |
| Reactivo N ^o 3 | | |
| Reactivo N ^o 4 *** | | |
| Ninhidrina-Piridinica | — | |
| Mörner | + | Amarillo |
| Haines **** | | |
| Reactivo de Ehrlich ***** | + | Rosado |
| Reactivo N ^o 5 | + | Rosado |
| Diazo Reacción de Ehrlich | + | Zanahoria |
| Biuret | + | Rosado |
| Jorissen | + | Amarillento |
| Xantoproteica ***** | | |
| Reactivo N ^o 6 | — | |
| Robert | + | Amarillo |

Observaciones:

Reactivo N^o 1.

* a) Precipitado blanco.

** a) 1 c.c. del antibiótico + 1 c.c. de NaClO: precipitado blanco que al agitar se disuelve y aparece una coloración amarilla. Al agregar el α -Naftol no hay cambio.

Reactivo N° 2.

** b) 1 c.c. del antibiótico + 1 c.c. de α -Naftol aparece un precipitado blanco que al agitar no se disuelve y la solución se colorea de ámbar.

*** 1 c.c. del antibiótico + 1 c.c. de ácido perclórico al 1%: precipitado blanco.

**** En la zona de contacto hay una floculación violeta.

***** Aparece de inmediato un color rosado. Al agitar pasa a color ámbar. Por encima es de color vino tinto. El color se intensifica con el tiempo.

***** Es explosiva, no realizable.

TABLA V C
CUALITATIVA DIFERENCIAL EN BASE
A REACCIONES DE COLORACION

Muestra: 10 mg.

| REACTIVOS | Bacitracina | Polimixina B. Sif. | Neomicina- Sulfato | Tirotricina USP |
|-----------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Reactivo N° 1 | | | | |
| a) | — | ▼ | — | ▼ |
| b) | + | ▼ | — | — |
| Reactivo N° 2 | | | | |
| a) | + | ▼ | — | — |
| b) | + | ▼ | — | ▼ |
| Reactivo N° 3 | — | — | ▼ | — |
| Reactivo N° 4 | — | — | — | ▼ |
| Ninhidrina-Piridinica . . . | + | + | + | — |
| Mörner | + | — | — | + |
| Haines | + | + | — | ▼ |
| Reactivo de Ehrlich | + | — | — | + |
| Reactivo N° 5 | + | + | + | + |
| Diazo Reacción de Ehrlich | + | ▼ | — | ▼ |
| Jorissen | — | ▼ | — | + |
| Biuret | + | ▼ | — | + |
| Xantoproteica | — | — | — | — |
| Reactivo N° 6 | — | — | — | — |
| Robert | — | — | — | + |

Las reacciones se efectuaron en tubitos de vidrio de 7,5 cm. de largo por 1 cm. de diámetro.

d) Exposición y resultados.

Significado de los signos:

(—) : ausencia de coloración.

(+) : presencia de coloración.

(▼) : presencia de precipitado.

A continuación exponemos en una serie de tablas el comportamiento de estos antibióticos frente a los diferentes reactivos a una determinada concentración aconsejando las reacciones específicas que permiten diferenciarlos entre sí.

Enseguida enunciamos las Reacciones de Precipitación más sensibles, para cada antibiótico, frente a los diferentes reactivos.

PRIMER GRUPO DE REACTIVOS

Para Bacitracina: (Ver Tabla I).

Acido Fosfotúngstico.

S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchardat).

S.R. de Acido Pítrico al 1%.

S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme).

Para Polimixina B Sulfato: (Ver Tabla II).

Acido Fosfotúngstico.

S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchardat).

S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

S.R. de Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer).

S.R. de Acido Pítrico al 1%.

Para Neomicina Sulfato: (Ver Tabla III).

S.R. de Acido Silicotúngstico (Bertrand).

S.R. de Acido Fosfotúngstico (Schleiber).

Para Tirotricina U.S.P.: (Ver Tabla IV).

Reactivo de Wasicky.

S.R. Nitrato Mercúrico 4N.

SEGUNDO GRUPO DE REACTIVOS

Para Bacitracina: (Ver Tabla X).

Reactivo de Molisch.

Reactivo de Imbert.

Reactivo de Esbach.
Reactivo de Purdy.
Reactivo de Schevky-Stafford.
Método de Tauret.
Reactivo de Exton.
Reactivo de Harrison.
Reactivo de Hupert y Nakayama.

Para Polimixina B Sulfato: (Ver Tabla XI).

Reactivo de Molisch.
Reactivo de Esbach.
Reactivo de Tauret.
Reactivo de Harrison.
Reactivo de Hupert y Nakayama.

Para Neomicina Sulfato: (Ver Tabla XII).

Reactivo de Esbach.
Reactivo de Purdy.
Reactivo de Hupert y Nakayama.
Reacción con la Bencidina, de Adler.

Para la Tirotricina: (Ver Tabla XIII).

Reactivo de Esbach.
Método de Tauret.
Reactivo de Harrison.
Reactivo de Exton.

TERCER GRUPO DE REACTIVOS

Para Bacitracina: (Ver Tabla XV).

Reactivo de Rous.
Reactivo de Frommer.
Reactivo de Lange.
Reactivo de Rothera.
Reactivo de Takata-Ara.
Método de Kinsbury.
Método de Tsuchiya.

Para Polimixina B Sulfato: (Ver Tabla XVI).

Reactivo de Jorissen.
Reactivo de Frommer.
Reactivo de Rothera.

Reactivo de Takata-Ara.
Método Tsuchiya.

Para Neomicina Sulfato: (Ver Tabla XVII).

Reactivo de Takata-Ara.
Método de Tsuchiya.

Para Tirotricina: (Ver Tabla XVIII).

Reactivo de Rous.
Reacción con la Orcina, de Bial.
Reactivo de Lange.
Reactivo de Rothera.
Reactivo de Takata-Ara.
Reactivo de Sulkowitch.
Método de Kingsbury.
Método de Tsuchiya.

En lo concerniente a las Reacciones de Coloración, exponemos a continuación los resultados positivos, para cada antibiótico frente a los diferentes reactivos.

Para Bacitracina: (Ver Tabla I C).

Reactivo N° 1 (b).
Reactivo N° 2 (a, b).
Ninhidrina Piridínica.
Reactivo de Mörner.
Reactivo de Haines.
Reactivo de Ehrlich.
Reactivo N° 5.
Diazo Reactivo de Ehrlich.
Reactivo de Biuret.

Para Polimixina B Sulfato: (Ver Tabla II C).

Ninhidrina Piridínica.
Reactivo de Haines.
Reactivo N° 5.

Para Neomicina Sulfato: (Ver Tabla III C).

Ninhidrina Piridínica.
Reactivo N° 2.
Reactivo N° 5.

Para Tirotricina: (Ver Tabla IV C).

Reactivo de Mörner.
Reactivo de Ehrlich.
Reactivo de Jorissen.
Reactivo de Biuret.
Reactivo de Robert.
Reactivo N° 5.

De acuerdo con la Tabla V haremos las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentración: 0,5 mg./c.c.

1. La Bacitracina se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme).

2. La Polimixina B Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con S.R. Yoduro Mercurico Potásico (Mayer).

3. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con S.R. de Acido Silicotúngstico (Bertrand).

4. La Tirotricina se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita frente al Reactivo de Wasicky y con S.R. de $(\text{NO}_3)_2\text{Hg}$ 4N. No precipita con S.R. de Acido Fosfotúngstico (Schleiber).

5. La Bacitracina y la Polimixina B Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff) y con S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchardat).

6. Con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff):

Bacitracina: Precipitado naranja.

Polimixina B Sulfato: Precipitado zapote.

De acuerdo con la Tabla VI haremos las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentración: 2 mg./c.c.

1. La Bacitracina se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).

2. La Polimixina B Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con S.R. de Yoduro Mercurico Potásico (Mayer) y con S.R. de Acetato de Plomo 0,5 N.

3. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

4. La Tirotricina se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con el Reactivo de Wasicky, con el Reactivo de Erdman y no precipita con S.R. de Acido Fosfotúngstico (Schleiber).

5. La Bacitracina y la Polimixina B Sulfato se diferencian de los otros antibióticos en que precipitan con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme), con S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchardat) y con S.R. de Acido Pítrico al 1%.

6. Con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff) :
Bacitracina: Precipitado naranja.

Polimixina B Sulfato: Precipitado zapote.

De acuerdo con la Tabla VII haremos las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentración: 6 mg./c.c.

1. La Polimixina B Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita con S.R. de $HgCl_2$ 0,5N.

2. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme), con S.R. de Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer) y con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

3. La Bacitracina y la Tirotricina se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con el Reactivo de Erdman, con S.R. Sulfovanádico (Mandelin) y con el Reactivo de Wasicky.

4. La Bacitracina y la Polimixina S Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con S.R. de Acido Pítrico al 1% con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial) y con S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchardat).

5. La Polimixina B Sulfato y la Neomicina Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con S.R. de Acetato de Plomo 0,5N.

6. Con S.R. Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer) :

Bacitracina: Precipitado blanco.

Polimixina B Sulfato: Precipitado blanco amarillento.

Tirotricina: Precipitado blanco.

7. Con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff) :

Bacitracina: Precipitado naranja.

Polimixina B Sulfato: Precipitado zapote.

Tirotricina: Precipitado rojo.

8. Con Reactivo de Erdman :

Bacitracina: Precipitado amarillo.

Tirotricina: Precipitado pardo.

9. Con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial) :

Bacitracina: Precipitado blanco.

Polimixina B Sulfato: Precipitado amarillo pálido.

10. Con S.R. Sulfovanádico (Mandelin) :

Bacitracina: Precipitado pardo.

Tirotricina: Precipitado zapote.

11. Con Reactivo de Wasicky :

Bacitracina: Precipitado lila.

Tirotricina: Precipitado rojo sangre.

De acuerdo con la Tabla VIII haremos las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentración: 8 mg./c.c.

1. La Polimixina B Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita con S.R. Cl_2Hg 0,5N.

2. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita con S.R. de Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer), con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme), con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

3. La Bacitracina y la Tirotricina se diferencian de los otros antibióticos en que precipitan con el Reactivo de Erdman, con S.R. Sulfovanádico (Mandelin) y con el Reactivo de Wasicky; no precipitan con S.R. de Acetato de Plomo 0,5N.

4. La Bacitracina y la Polimixina B Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con S.R. de Acido Pírico al 1%, con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial) y con S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchardat).

5. Con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff) :

Bacitracina: Precipitado naranja.

Polimixina B Sulfato: Precipitado zapote.

Tirotricina: Precipitado rojo.

6. Con el Reactivo de Erdman:

Bacitracina: Precipitado amarillo.

Tirotricina: Precipitado pardo.

7. Con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial) :

Bacitracina: Precipitado blanco.

Polimixina B Sulfato: Precipitado amarillo pálido.

8. Con S.R. Sulfovanádico (Mandelin) :

Bacitracina: Precipitado pardo.

Tirotricina: Precipitado zapote.

9. Con Reactivo de Wasicky:

Bacitracina: Precipitado lila.

Tirotricina: Precipitado rojo sangre.

De acuerdo con la Tabla IX haremos las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentración: 10 mg./c.c.

1. La Polimixina B Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita con S.R. de HgCl_2 0,5N.

2. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita con S.R. de Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer), con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme), con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

3. La Bacitracina y la Tirotricina se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con el Reactivo de Erdman, con S.R. Sulfovanádico (Mandelin), con el Reactivo de Wasicky y no precipitan con S.R. de Acetato de Plomo 0,5N.

4. La Bacitracina y la Polimixina B Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con S.R. de Acido Píctrico al 1%, con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial) y con S.R. de Yoduro de Potasio Yodurado (Bouchardat).

5. Con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff):

Bacitracina: Precipitado naranja.

Polimixina B Sulfato: Precipitado zapote.

Tirotricina: Precipitado rojo.

6. Con Reactivo de Erdman:

Bacitracina: Precipitado amarillo.

Tirotricina: Precipitado pardo.

7. Con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial):

Bacitracina: Precipitado blanco.

Polimixina B Sulfato: Precipitado amarillo pálido.

8. Con S.R. Sulfovanádico (Mandelin):

Bacitracina: Precipitado pardo.

Tirotricina: Precipitado zapote.

9. Con Reactivo de Wasicky:

Bacitracina: Precipitado lila.

Tirotricina: Precipitado rojo sangre.

De acuerdo con la Tabla XIV haremos las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentraciones: 10 mg./c.c.

1. La Bacitracina se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita en la Reacción de Imbert.

2. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita en la Reacción de la Bencidina de Adler.

3. La Tirotricina se diferencia de los otros tres antibióticos en que presenta color en la Reacción de Robert y no precipita en la Reacción de Hupert y Nakayama.

4. La Bacitracina y la Polimixina B Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan con el Reactivo de Molisch y en la Reacción de Schevky-Stafford.

5. La Bacitracina y la Neomicina Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan en la Reacción de Purdy.

6. La Bacitracina y la Tirotricina se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan en la Reacción de Exton.

De acuerdo con la Tabla XIX haremos las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentración: 10 mg./c.c.

1. La Polimixina B Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita en la Reacción de Jorissen.

2. La Tirotricina se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita en la Reacción de Sulkowitch, en la Reacción de la Orcina de Bial, y da color en la Reacción de Jorissen.

3. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no precipita en la Reacción de Rothera.

4. La Bacitracina y la Tirotricina se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan en el Método de Kingsbury, con la Reacción de Rous y con la Reacción de Lange.

5. La Bacitracina y la Polimixina B Sulfato se diferencian de los otros dos antibióticos en que precipitan en la Reacción de Frommer.

6. Método de Kingsbury:

Bacitracina: Precipitado grisáceo.

Tirotricina: Precipitado blanco.

7. Reacción de Rous:

Bacitracina: Precipitado floculento.

Tirotricina: Precipitado amarillo.

8. Reacción de Lange:

Bacitracina: Precipitado crema.

Tirotricina: Precipitado blanco.

9. Reacción de Takata-Ara:

Bacitracina: Precipitado azulado.

Polimixina B Sulfato: Precipitado blanco rojizo.

Tirotricina: Precipitado blanco.

De acuerdo con la Tabla V C hemos hecho las siguientes anotaciones para cada antibiótico.

Concentración: 10 mg./c.c.

1. La Bacitracina se diferencia de los otros tres antibióticos en que presenta coloración con el Reactivo N° 1 (b), con el Reactivo N° 2 (b) y con la Diazo Reacción de Ehrlich.

2. La Polimixina B Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con el Reactivo N° 1 (b), con el Reactivo N° 2 (a) con la Reacción de Jorissen y con la Reacción de Biuret.

3. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con el Reactivo N° 3.

4. La Tirotricina se diferencia de los otros tres antibióticos en que precipita con el Reactivo N° 4, con la Reacción de Haines, se colorea con la Reacción de Robert y con la Reacción de Jorissen; no se colorea con Ninhidrina Piridínica.

5. La Neomicina Sulfato se diferencia de los otros tres antibióticos en que no le sucede nada (ni precipita ni se colorea) frente al Reactivo N° 2 (b), con la Reacción de Haines y con la Reacción de Biuret.

6. La Bacitracina y la Tirotricina se diferencia de los otros dos antibióticos en que ambos se colorean con la Reacción de Mörner.

7. La Bacitracina y la Tirotricina se diferencian de los otros dos antibióticos en que ambos se colorean con el reactivo de Erlich y con la Reacción de Biuret.

8. La Bacitracina da color pardo claro con el Reactivo N° 2 (a) mientras que la Neomicina Sulfato toma color verde y la Tirotricina color amarillo.

9. La Bacitracina y la Tirotricina frente al Reactivo de Ehrlich toman color rosado pero se diferencian entre sí en que en el primero el color aparece a los dos minutos mientras que en el segundo la coloración aparece de inmediato y al final se torna vino-tinto.

10. Con el Reactivo N° 5:

Bacitracina: Color azul.

Polimixina B Sulfato: Color violeta.

Neomicina Sulfato: Color azul (aparece al calentarse).

Tirotricina: Color rosado.

11. Con Diazo Reacción de Erlich:

Polimixina B Sulfato: Precipitado en la zona de contacto.

Tirotricina: El precipitado es de color zanahoria.

12. Con Reacción de Biuret:

Bacitracina: Color lila.

Tirotricina: Color rosado.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Se estudia la acción de 41 reactivos de precipitación y 15 reactivos de coloración en las moléculas de antibióticos polipeptídicos.

2. Se determina la sensibilidad de las reacciones.

3. Se aportan nuevas reacciones para la identidad de estas moléculas.

Las reacciones a continuación enumeradas son específicas para cada antibiótico:

BACITRACINA

Concentración: 0,5 mg./c.c.

a) Precipita con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme).

b) Precipitado naranja con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

Concentración: 2 mg./c.c.

a) Precipita con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).

b) Precipitado naranja con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

c) Precipitado blanco con S.R. de $(\text{NO}_3)_2 \text{Hg}$ 4N.

d) Precipitado pardo con S.R. Sulfovanádico (Mandelin).

Concentración: 6 mg./c.c.

a) Precipitado naranja con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

b) Precipitado amarillo con el Reactivo de Erdman.

c) Precipitado blanco con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).

d) Precipitado pardo con S.R. Sulfovanádico (Mandelin).

e) Precipitado lila con el Reactivo de Wasicky.

Concentración: 8 mg./c.c.

a) Precipitado naranja con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

- b) Precipitado amarillo con el Reactivo de Erdman.
- c) Precipitado blanco con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).
- d) Precipitado pardo con S.R. Sulfovanádico (Mandelin).
- e) Precipitado lila con el Reactivo de Wasicky.

Concentración: 10 mg./c.c.

- a) Precipitado naranja con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).
- b) Precipitado amarillo con el Reactivo de Erdman.
- c) Precipitado blanco con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).
- d) Precipitado pardo con S.R. Sulfovanádico (Mandelin).
- e) Precipitado lila con el Reactivo de Wasicky.
- f) Precipita con el Reactivo de Imbert.
- g) Precipitado grisáceo en el Método de Kingsbury.
- h) Precipitado crema en la Reacción de Lange.
- i) Precipitado floculento en la Reacción de Rous.
- j) Precipitado azulado en la Reacción de Takata-Ara.
- k) Da color con el Reactivo N° 1 (b).
- l) Da color con el Reactivo N° 2 (b).
- m) Da color pardo claro con el Reactivo N° 2 (a).
- n) Da color con la Diazo Reacción de Ehrlich.
- o) Da color rosado a los dos minutos con el Reactivo de Ehrlich.
- p) Da color azul con el Reactivo N° 5.
- q) Da color lila en la Reacción de Biuret.

NEOMICINA SULFATO

Concentración: 0,5 mg./c.c.

- a) Precipita con S.R. de Acido Silicotúngstico (Bertrand).

Concentración: 1 mg./c.c.

- a) No precipita con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

Concentración: 6 mg./c.c.

- a) No precipita con S.R. de Yoduro Mercuríco Potásico (Mayer).
- b) No precipita con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

c) No precipita con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme).

Concentración: 8 mg./c.c.

a) No precipita con S.R. de Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer).

b) No precipita con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme).

c) No precipita con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

Concentración: 10 mg./c.c.

a) No precipita con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

b) No precipita con S.R. de Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer).

c) No precipita con S.R. de Yoduro de Cadmio y Potasio (Marme).

d) Precipita en la Reacción de la Bencidina de Adler.

e) No precipita en la Reacción de Rothera.

f) No precipita ni colorea frente al Reactivo N° 2 (b).

h) No precipita ni colorea en la Reacción de Haines.

i) No precipita ni colorea en la Reacción de Biuret.

j) Da color verde con el Reactivo N° 2 (a).

k) Al calentar da color azul con el Reactivo N° 5.

POLIMIXINA B SULFATO

Concentración: 0,5 mg./c.c.

a) Precipita con S.R. Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer).

b) Precipitado zapote con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

Concentración: 2 mg./c.c.

a) Precipita con S.R. de Yoduro Mercúrico Potásico (Mayer).

b) Precipita con S.R. de Acetato de Plomo, 0,5N.

c) Precipitado zapote con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

Concentración: 6 mg./c.c.

a) No precipita con S.R. de HgCl_2 0,5N.

b) Precipitado zapote con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

c) Precipitado amarillo pálido con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).

Concentración: 8 mg./c.c.

a) No precipita con S.R. de HgCl_2 0,5N.

b) Precipitado zapote con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

c) Precipitado amarillo pálido con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).

Concentración: 10 mg./c.c.

a) No precipita con S.R. de HgCl_2 0,5N.

b) Precipitado zapote con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

c) Precipitado amarillo pálido con S.R. de Antimoniato de Potasio (Careli y Bial).

d) Precipita con el Reactivo de Jorissen.

e) Precipitado blanco rojizo con el Reactivo de Takata-Ara.

f) Precipita con el Reactivo N° 1 (b).

g) Precipita con el Reactivo N° 2 (a).

h) Precipita con el Reactivo de Biuret.

i) Da color violeta con el Reactivo N° 5.

j) Precipitado en la zona de contacto con la Diazo Reacción de Ehrlich.

TIROTRICINA

Concentración: 0,5 mg./c.c.

a) Precipita con el Reactivo de Wasicky.

b) Precipita con S.R. de $(\text{NO}_3)_2 \text{Hg}$ 4N.

c) No precipita con S.R. de Acido Fosfotúngstico (Schleiber).

Concentración: 2 mg./c.c.

a) Precipita con el Reactivo de Erdman.

b) No precipita con S.R. de Acido Fosfotúngstico (Schleiber).

c) Precipitado rojo con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

d) Precipitado zapote con S.R. Sulfovanádico (Mandelin).

e) Precipita con el Reactivo de Wasicky.

Concentración: 6 mg./c.c.

a) Precipitado rojo con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).

- b) Precipitado pardo con el Reactivo de Erdman.
- c) Precipitado zapote con S.R. Sulfovanádico (Mandelin).
- d) Precipitado rojo sangre con el Reactivo de Wasicky.

Concentración: 8 mg./c.c.

- a) Precipitado rojo con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).
- b) Precipitado pardo con el Reactivo de Erdman.
- c) Precipitado rojo sangre con el Reactivo de Wasicky.

Concentración: 10 mg./c.c.

- a) Precipitado rojo con S.R. de Yoduro de Bismuto y Potasio (Dragendorff).
- b) Precipitado pardo con el Reactivo de Erdman.
- c) Precipitado zapote con S.R. Sulfovanádico (Mandelin).
- d) Precipitado rojo sangre con el Reactivo de Wasicky.
- e) Da color con el Reactivo de Robert.
- f) No precipita con el Reactivo de Hupert y Nakayama.
- g) Precipita con el Reactivo de Sulkowitch.
- h) Da color con el Reactivo de Jorissen.
- i) Precipita blanco con el Reactivo de Kingsbury.
- j) Precipitado amarillo con el Reactivo de Rous.
- k) Precipitado blanco con el Reactivo de Lange.
- l) Precipitado blanco con el Reactivo de Takata-Ara.
- m) Precipita con el Reactivo N^o 4.
- n) Precipita con el Reactivo de Haines.
- o) No da color frente a la Ninhidrina piridínica.
- p) Da color rosado con el Reactivo N^o 5.
- q) Precipitado color zanahoria en la Diazo-Reacción de Ehrlich.
- r) Da color rosado con el Reactivo de Biuret.

ENSAYO DE UNA MARCHA ANALITICA CUALITATIVA

ENSAYOS SENCILLOS PARA DIFERENCIAR ENTRE SI LOS ANTIBIOTICOS

Tomando como base los resultados obtenidos con las reacciones cualitativas de precipitación y de coloración, proponemos a continuación algunos ensayos simples, como ejemplos de marchas para

distinguir los antibióticos cuando están en soluciones separadas; dichos ensayos, dan buen resultado si se usan concentraciones de 10 mgs. por c.c. aproximadamente.

Primer Caso:

BACITRACINA Y NEOMICINA SULFATO

Reactivo de Wasicky:

p-Dimetil amino benzaldehído 2 Gms.

Acido Sulfúrico (Conc.) 6 Gms.

Agua destilada 0,4 Gms.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las soluciones, en dos cavidades diferentes, y agregar a cada una de ellas 2 gotas del reactivo.

RESULTADO:

Bacitracina: Aparece precipitado.

Neomicina: No precipita.

Segundo Caso:

BACITRACINA Y POLIMIXINA B SULFATO

Reactivo de Erdman:

10 gotas de una solución acuosa de HNO₃ al 1% V/V, se agregan a 10 c.c. de Acido Sulfúrico, concentrado.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las soluciones, en dos cavidades diferentes; agregar a cada una dos gotas del reactivo.

RESULTADO:

Bacitracina: Se forma precipitado.

Polimixina B Sulfato: No hay precipitación.

Tercer Caso:

BACITRACINA Y TIROTRICINA

Reactivo de Bouchardat:

Yodo 2,5 Gms.

Yoduro de Potasio 5,0 Gms.

Agua destilada 100,0 c.c.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las soluciones, en dos cavidades diferentes; agregar a cada una dos gotas del reactivo.

RESULTADO:

Bacitracina: Se forma precipitado.

Tirotricina: No hay precipitación.

Cuarto Caso:

NEOMICINA SULFATO Y POLIMIXINA B SULFATO

Reactivo: Acido Pírico al 1%.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las soluciones, en dos cavidades diferentes; agregar a cada una dos gotas del reactivo.

RESULTADO:

Polimixina B Sulfato: Se forma precipitado.

Neomicina Sulfato: No hay precipitación.

Quinto Caso:

NEOMICINA SULFATO Y TIROTRICINA

Reactivo de Rous:

a) Solución de Ferrocianuro de Potasio al 2%.

b) Solución de Acido Clorhídrico al 1%.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las soluciones, en dos cavidades diferentes; agregar a cada una partes iguales de a) y b).

RESULTADO:

Tirotricina: Se produce color amarillo.

Neomicina Sulfato: No hay coloración.

Sexto Caso:

POLIMIXINA B SULFATO Y TIROTRICINA

Reactivo de Mandelin:

Solución al 0,5% de Vanadato de amonio en ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las soluciones, en cavidades diferentes; agregar a cada una dos gotas del reactivo.

RESULTADO:

Polimixina B Sulfato: No hay precipitación.

Tirotricina: Se forma un precipitado.

Séptimo Caso:

*Tenemos los cuatro antibióticos en soluciones separadas.
Para distinguirlos, usamos tres reacciones.*

A) Reactivo de Dragendorff:

Sub-nitrato o sub-carbonato de Bismuto pulverizado 5 Gms.

Acido Clorhídrico conc. 10 c.c.

Yoduro de Potasio al 40% 100 c.c.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las soluciones, en cuatro cavidades diferentes; agregar a cada una dos gotas del reactivo.

RESULTADO:

Bacitracina: Se forma precipitado.
Polimixina B Sulfato: Se forma precipitado.
Tirotricina: Se forma precipitado.
Neomicina Sulfato: No hay precipitación.

CONCLUSION:

Queda diferenciada la Neomicina Sulfato.

B) Reactivo de Antimoniato de Potasio:
Oxido Antimonioso 5 Gms.
Acido Clorhídrico concentrado 20 Gms.
Yoduro de Potasio 40 Gms.
Agua destilada c.s.p. 100 c.c.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las tres soluciones no diferenciadas entre sí, en tres cavidades diferentes; agregar a cada una dos gotas del reactivo.

RESULTADO:

Bacitracina: Se forma precipitado.
Polimixina B Sulfato: Se forma precipitado.
Tirotricina: No hay precipitación.

CONCLUSION:

Queda diferenciada la Tirotricina.

C) Reactivo de Wasicky:
P-Dimetilaminobenzaldehído 2 Gms.
Acido Sulfúrico concentrado 6 Gms.
Agua destilada 0,4 c.c.

Técnica: Colocar en una placa de porcelana 1 c.c. de las dos soluciones aún no diferenciadas entre sí, en dos cavidades diferentes; agregar a cada una dos gotas del reactivo.

RESULTADO:

Bacitracina: Se forma precipitado.
Polimixina B Sulfato: No hay precipitación.

CONCLUSION:

Quedan diferenciados entre sí, estos dos antibióticos.

ANALISIS CUANTITATIVO

ANALISIS FOTOCOLORIMETRICO

Para el Análisis Cuantitativo Fotocolorimétrico de las sustancias que nos ocupan, hemos tomado las reacciones cualitativas de coloración más sensibles y específicas para cada una de ellas. Sin embargo, algunas de las reacciones no permiten la obtención de un espectro en el campo visible, por lo cual fueron eliminadas. De las reacciones en las cuales no ocurre lo anotado, hemos escogido las que aparecen a continuación, por exhibir máximos de absorban-
cia que permiten usar la respectiva longitud de onda bastante diferenciable. De esta manera, las reacciones utilizadas resulta-
ron ser:

Para Bacitracina:

1. Con el Reactivo de Biuret.
2. Con el Reactivo de Haines diluido.

Para Neomicina Sulfato:

1. Con el Reactivo N^o 2.
2. Con S.R. CuSO_4 (0,01M).

Para la Polimixina B Sulfato:

1. Con el Reactivo de Haines diluido.

Para Tirotricina:

1. Con el Reactivo de Biuret.
2. Con el Reactivo de Ehrlich.
3. Con el Reactivo de Jorissen.

Es necesario aclarar, que algunas de estas reacciones no producen una coloración estable, y por lo tanto se deben verificar lecturas en diferentes lapsos de tiempo, y escoger la que según criterio sea la mejor como aparece anotado en los diferentes casos. Todas estas reacciones fueron además efectuadas tres veces, para mayor seguridad de un buen resultado.

RESULTADOS OBTENIDOS

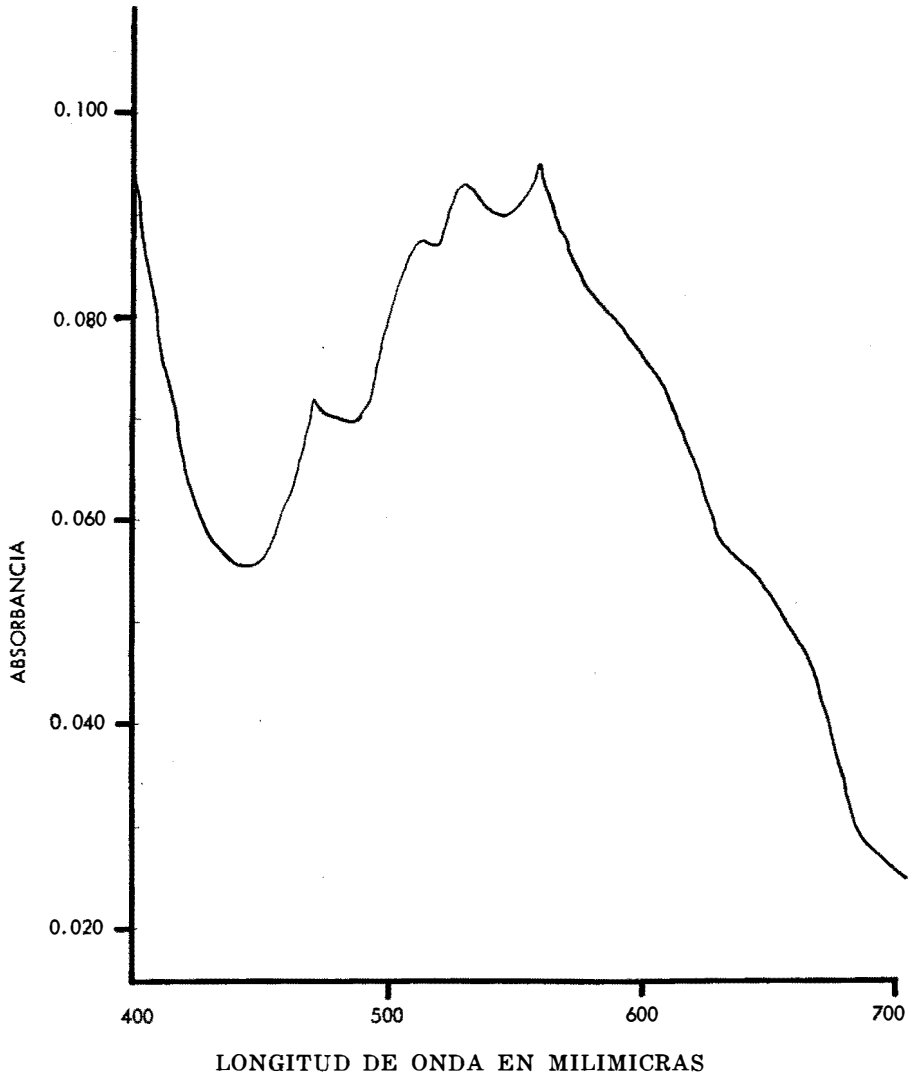


FIGURA N° 1. REACCIÓN DE LA BACITRACINA FRENTE AL REACTIVO DE BIURET. ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Reacción: a 1 ml. de la solución del antibiótico agregar 0.3 ml. de NaOH 10 M, 0.2 ml. de CuSO_4 0.01 M y 1 ml. de agua.

Concentración de la solución del antibiótico: 700 microgramos/ml.

Blanco: a 1 ml. de agua agregar las mismas cantidades de los reactivos citados.

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.

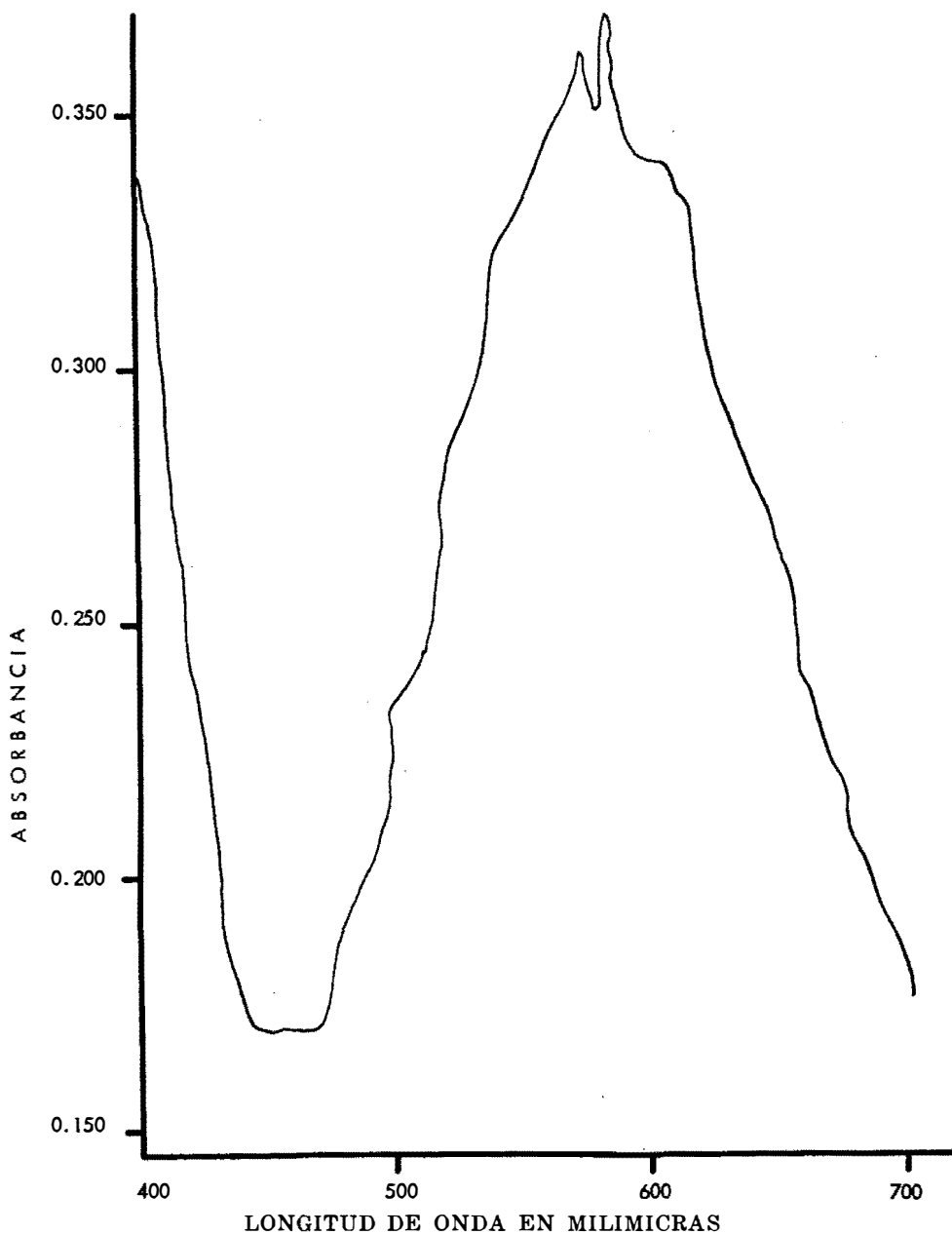


FIGURA Nº 2. REACCION DE LA BACITRACINA FRENTE AL REACTIVO DE HAINES DIL. ESPECTRO DE ABSORCION

Reacción: a 1 ml. de la solución del antibiótico agregar 3 ml. del reactivo de Haines diluido al 10% y 3 ml. de agua destilada.

Concentración de la solución del antibiótico: 7.000 microgramos/ml.

Blanco: 4 ml. de agua destilada y 3 ml. de reactivo.

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.

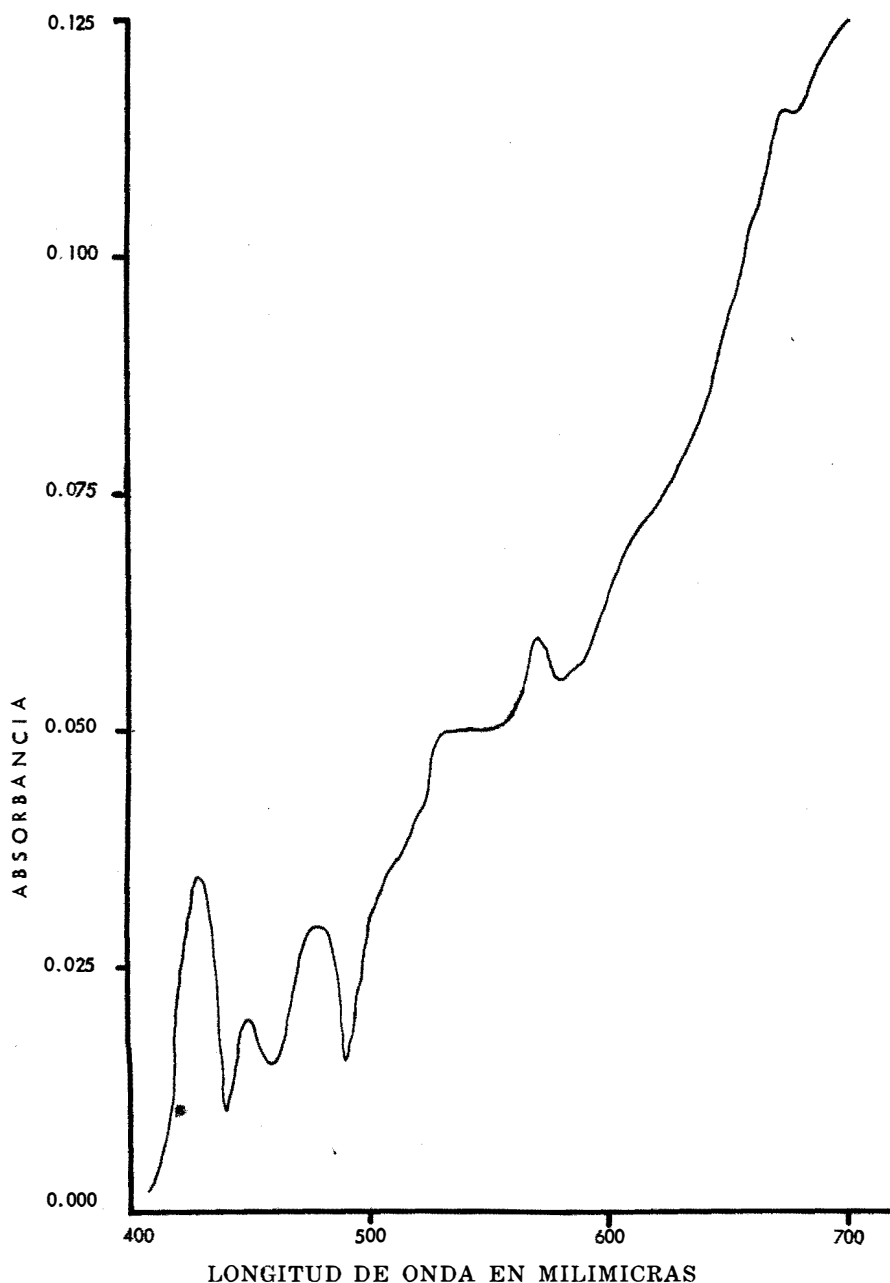


FIGURA N° 3. REACCION DE LA NEOMICINA SULFATO FRENTE AL REACTIVO N° 2. ESPECTRO DE ABSORCION

Reacción: a 1 ml. de la solución del antibiótico, agregar 1 ml. de la solución A, 1 ml. de la solución B y 6 ml. de agua destilada.

Concentración de la solución del antibiótico: 3.000 microgramos/ml.

Blanco: a 7 ml. de agua destilada agregar 1 ml. de solución A y 1 ml. de solución B.

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.

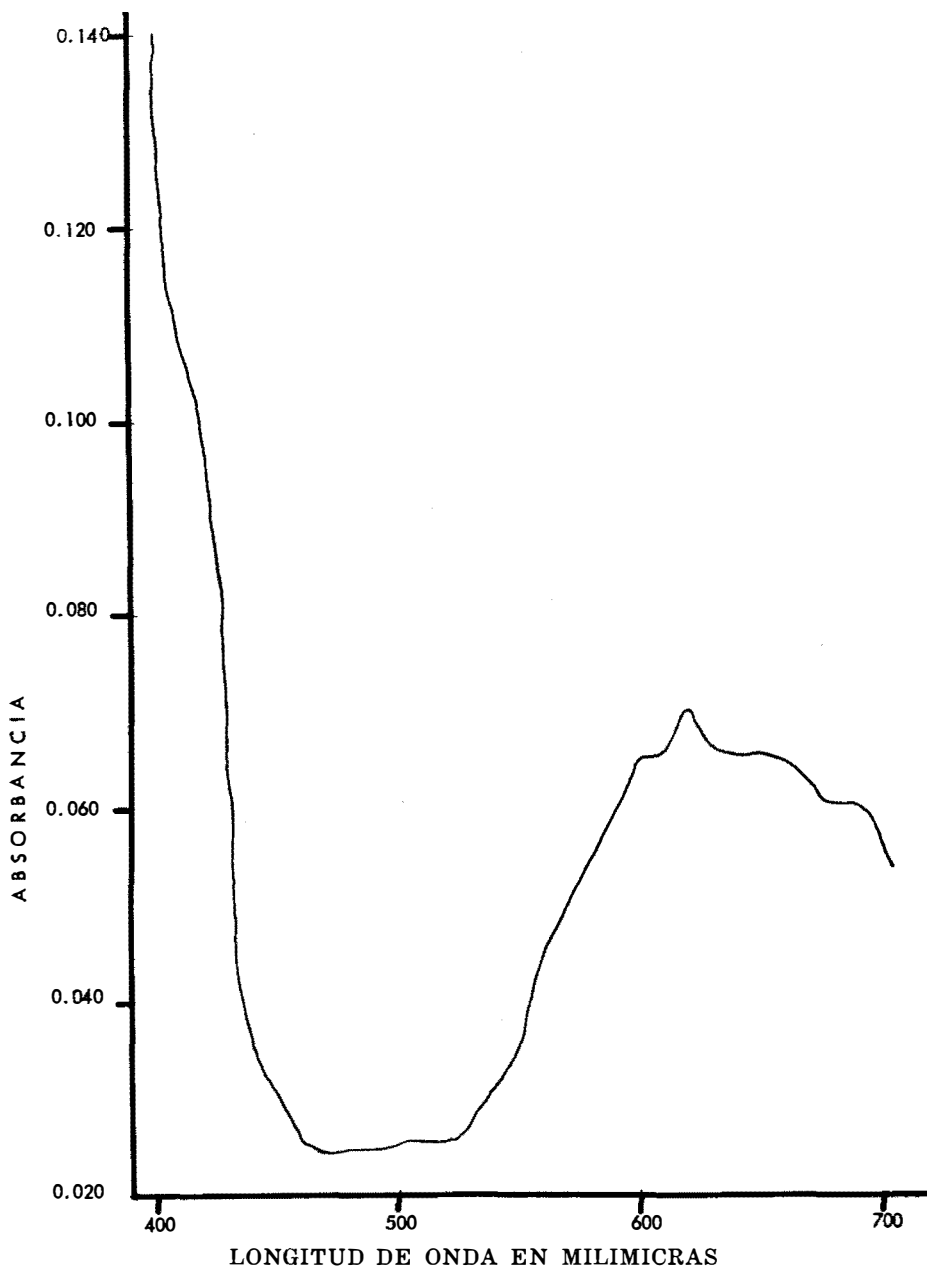


FIGURA N° 4. REACCION DE LA NEOMICINA SULFATO FRENTE A S.R. DE CuSO_4 0.01 M. ESPECTRO DE ABSORCION

Reacción: a 2 ml. de la solución del antibiótico agregar 1,2 ml. de S.R. de CuSO_4 y 4 ml. de agua destilada.

Concentración de la solución del antibiótico: 7.000 microgramos/ml.

Blanco: a 6 ml. de agua destilada se agregan 1,2 ml. de S.R. de CuSO_4 .

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.

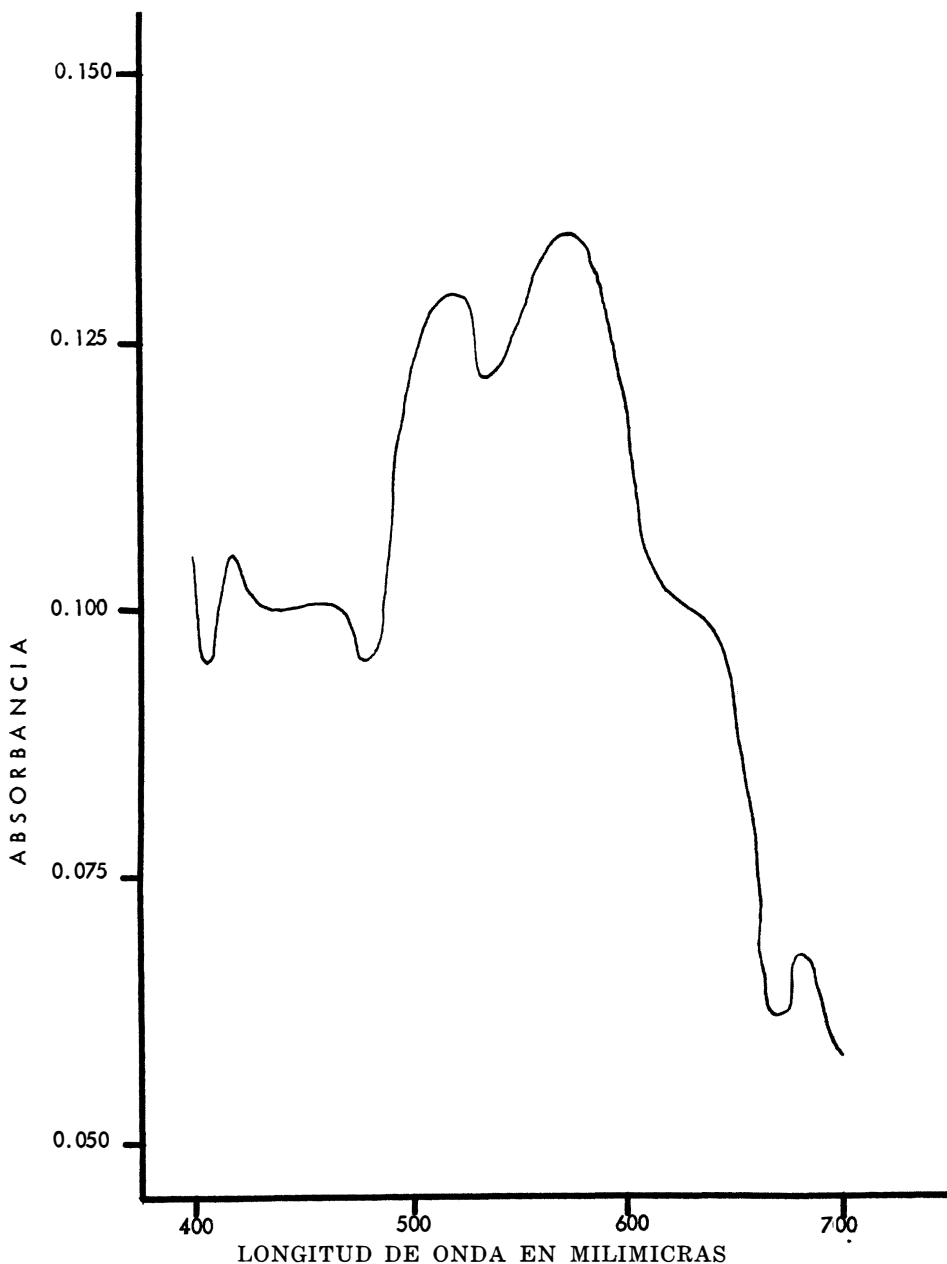


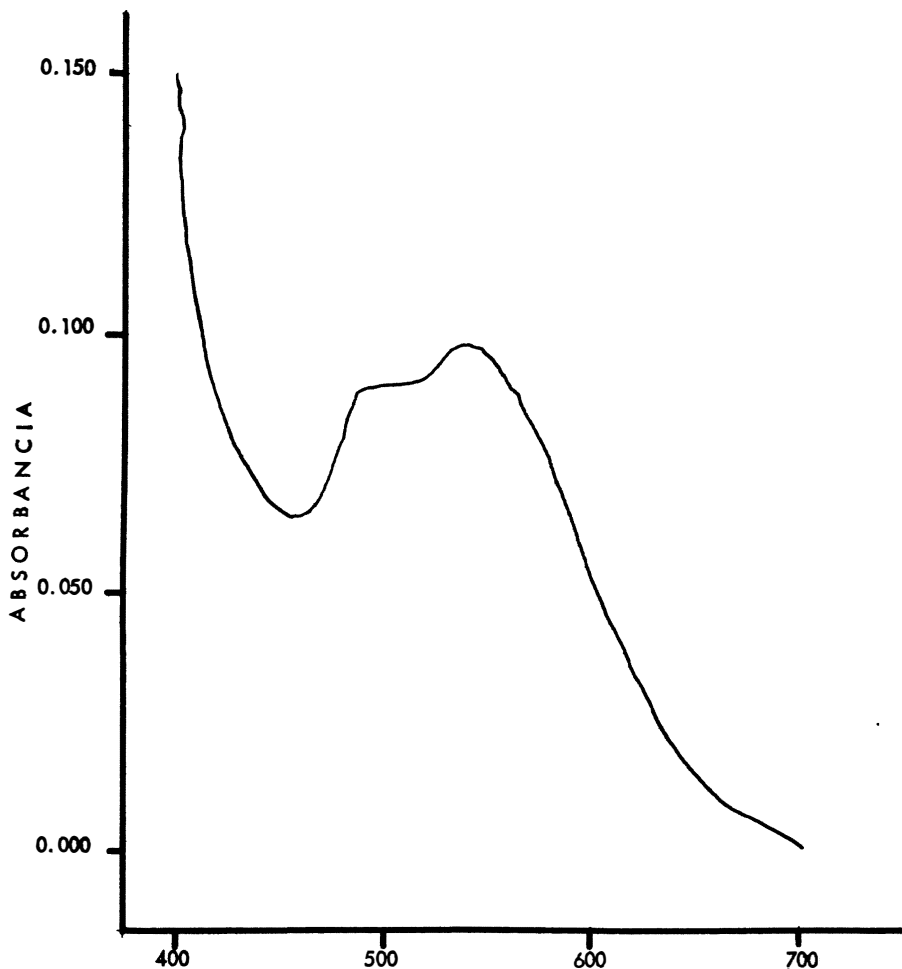
FIGURA Nº 5. REACCION DE LA POLIMIXINA B SULFATO FRENTE AL REACTIVO DE HAINES DILUIDO. ESPECTRO DE ABSORCION

Reacción: a 1 ml. de la solución del antibiótico agregar 1 ml. del reactivo y 2 ml. de agua destilada.

Concentración de la solución del antibiótico: 4.000 microgramos/ml.

Blanco: a 3 ml. de agua destilada agregar 1 ml. del reactivo.

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.



LONGITUD DE ONDA EN MILIMICRAS

FIGURA Nº 6. REACCION DE LA TIROTRICINA FRENTE AL REACTIVO DE BIURET. ESPECTRO DE ABSORCION

Reacción: a 1 ml. de la solución del antibiótico añadir 0,3 ml. de NaOH 10M, 0,2 ml. de CuSO₄ 0.01 M y 2 ml. de etanol de 96 (libre de aldehídos).

Concentración de la solución del antibiótico; 4.000 microgramos/ml.

Blanco: a 3 ml. de etanol de 96 (libre de aldehídos) agregar las mismas cantidades de los reactivos anotados.

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.

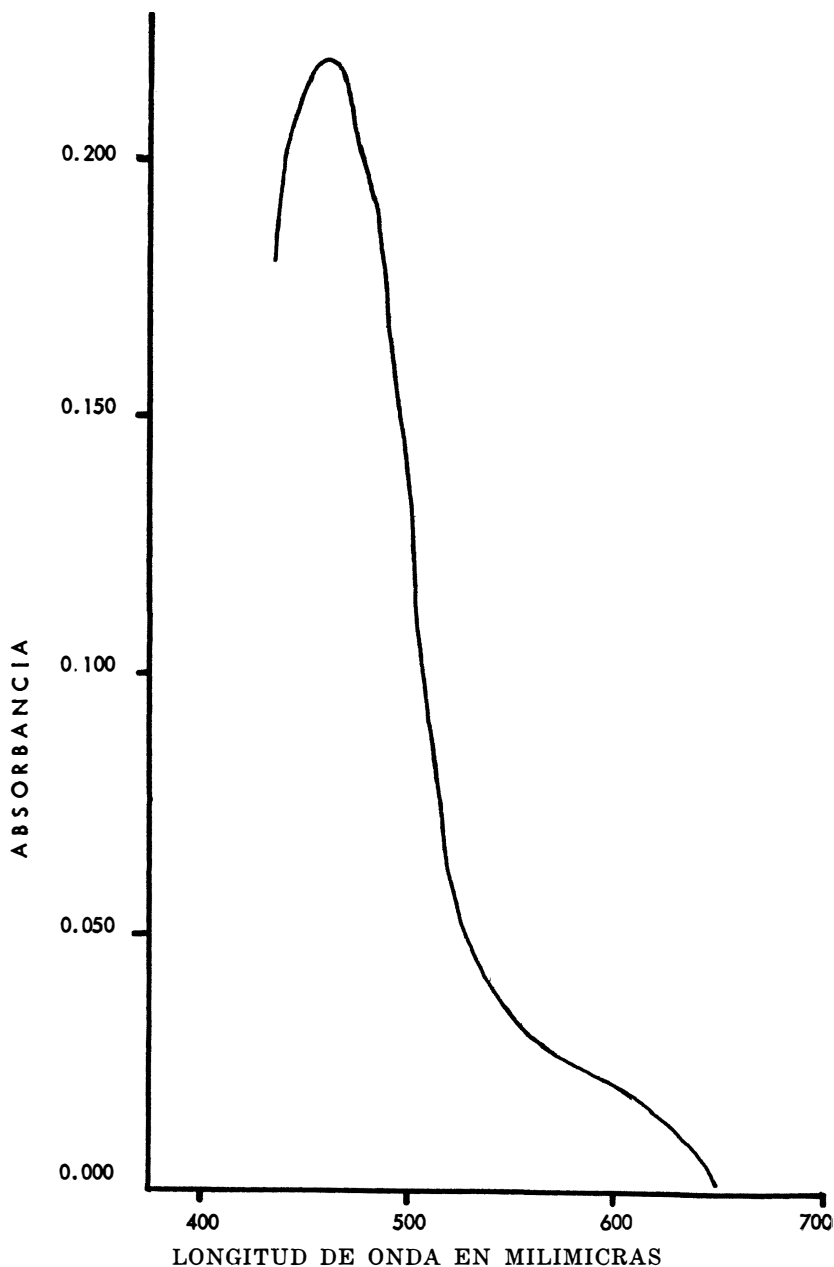


FIGURA Nº 7. REACCION DE LA TIROTRICINA FRENTE AL REACTIVO DE EHRlich. ESPECTRO DE ABSORCION

Reacción: a 1 ml. de la solución del antibiótico agregar 1 ml. del reactivo y 4 ml. de alcohol etílico de 96 (libre de aldehídos).

Concentración de la solución del antibiótico: 3.000 microgramos/ml.

Blanco: a 5 ml. de alcohol etílico de 96 (libre de aldehídos) agregar 1 ml. del reactivo.

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.

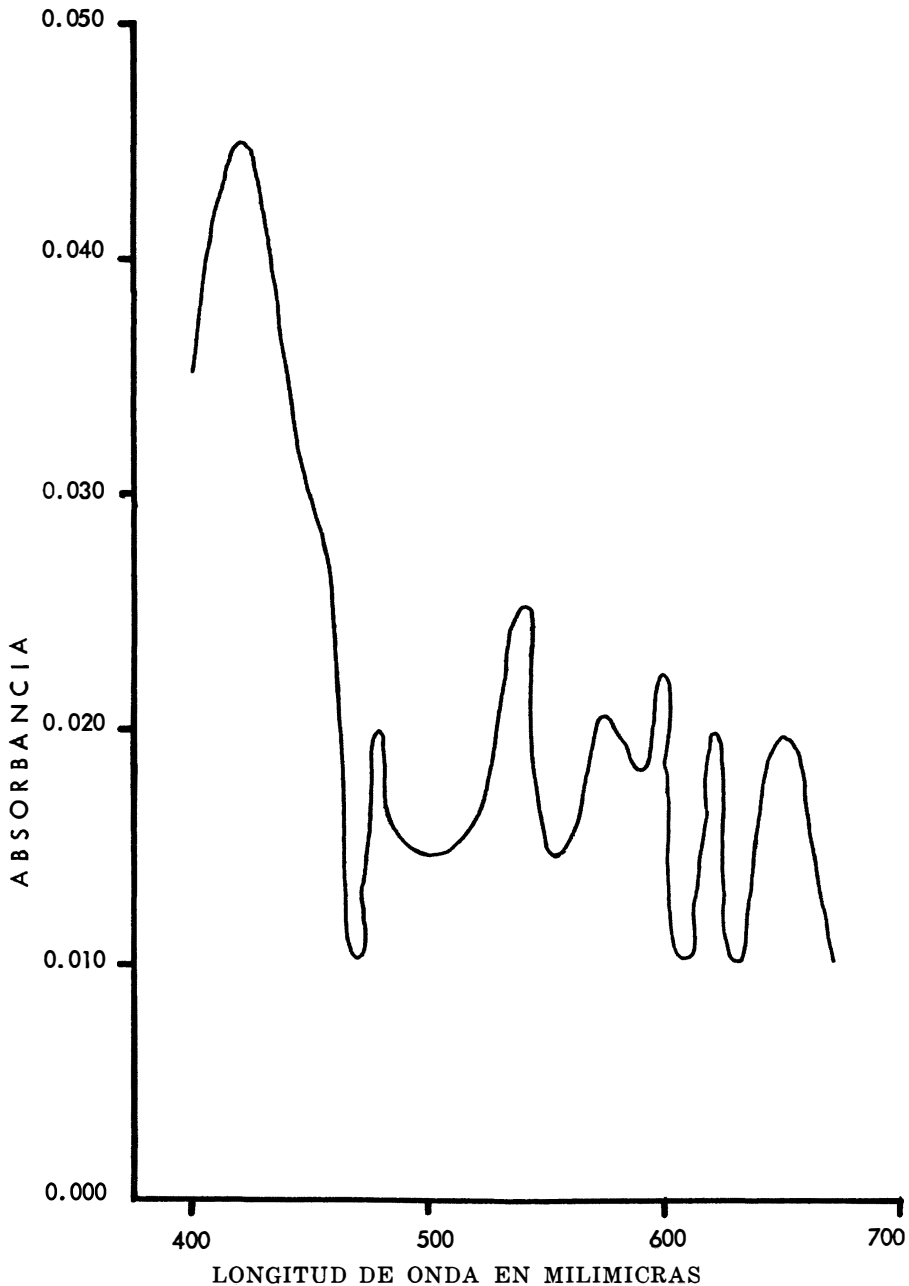


FIGURA Nº 8. REACCION DE LA TIROTRICINA FRENTE AL REACTIVO DE JORISSEN. ESPECTRO DE ABSORCION

Reacción: a 1 ml. de la solución del antibiótico agregar 1 ml. del reactivo y 2 ml. de alcohol etílico de 96 (libre de aldehídos).

Concentración de la solución del antibiótico: 3.000 microgramos/ml.

Blanco: agregar 1 ml. del reactivo a 3 ml. de alcohol etílico de 96 (libre de aldehídos).

Espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6C.

RESUMEN

En el presente trabajo se establecen algunas nuevas reacciones de identidad para la bacitracina, la neomicina, la polimixina y la tirotricina. Se estudia igualmente el posible empleo de estas reacciones en la valoración cuantitativa de los antibióticos citados.

SUMMARY

In the present work some new identity reactions for bacitracin, neomycin, polymyxin and tyrothricin were set up. The possibility of using these reactions for the quantitative determination of the antibiotics mentioned above are also discussed.

RÉSUMÉ

Ils sont mis au point dans le travail quelques réactions nouvelles d'identité pour la bacitracine, la néomycine, la polymyxine et la tyrotricine. Egalement il est faite l'étude de ces réactions pour son éventuelle emploi dans la valoration cuantitative des antibiotiques nommés.

BIBLIOGRAFIA

1. WEST, E. S. y TOOD, W. R. *Textbook of Biochemistry*, segunda edición, The McMillan Company, New York, 1957, pág. 347.
2. WEST, E. S. y TOOD, W. R., op. cit., pág. 348.
3. WEST, E. S. y TOOD, W. R., op. cit., pág. 349.
4. WEST, E. S. y TOOD, W. R., op. cit., pág. 350.
5. WILLIAMS, R. J., y BEERST, E. *An Introduction Biochemistry*, segunda edición, D. Van Nostrand Company, Inc., New York, 1948, pág. 465.
6. HAUROWITZ, F. *Biochemistry an Introduction Textbook*, John Willey & Sons, Inc., New York, 1957, pág. 177.
7. HAUROWITZ, F., op. cit., pág. 179.
8. HAUROWITZ, F., op. cit., pág. 181.
9. WALTER, A. M. y HEILMEYER, L. *Manual de antibióticos y quimioterápicos en la terapéutica moderna*, segunda edición, Editorial Praxis, Madrid, 1958, págs. 120 y 121.
10. GOLDBERG, H. S. *Antibiotics their Chemistry and Non-Medical Uses*. Lancaster Press, Inc., Lancaster, PA., New York, 1959, págs. 124 y 129.
11. British Pharmacopoeia General Medical Council, London, 1963, pág. 71.
12. BURGER, A. *Medicinal Chemistry*, segunda edición, Interscience Publishers, Inc., New York, 1960, pág. 935.
13. MILLER, M. W. *The Pfizer Handbook of Microbial Metabolite*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 1961, pág. 390.

14. Enciclopedia Farmacéutica (Volumen I). Editorial Científico-Médica, Barcelona, 1962, 159.
15. British Pharmacopoeia, op. cit., pág. 1098.
16. NEUMAN, M. *Vade-Mecum des Antibiotiques et Agents Chimiotherapiques anti-infectieux*, sexta edición, G. Doint. et Cie Editeurs, París. 1962, pág. 181.
17. *The Merck Index of Chemical and Drugs*, séptima edición, Merck Co., Inc., Rahway, N. J., U. S. A., 1960, pág. 1078.
18. WALTER, A. M., y HEILMEYER, L., op. cit., pág. 130.
19. BURGER, A. M., op. cit., págs. 897 y 989.
20. NEUMAN, M., op. cit., pág. 237.
21. MILLER, M. W., op. cit., pág. 41.
22. Enciclopedia Farmacéutica (Vol. I), op. cit., pág. 629.
23. British Pharmacopoeia, op. cit., págs. 1100 y 1101.
24. WALTER, A. M. y HEILMEYER, L., op. cit., pág. 127.
25. NEUMAN, M., op. cit., pág. 249.
26. *The Merck Index of Chemical and drugs*, op. cit., pág. 1078.
27. BURGER, A. M., op. cit., pág. 933, 934.
28. WALTER, A. M. y HEILMEYER, L., op. cit., 123, 124.
29. Enciclopedia Farmacéutica (Vol. I), op. cit., pág. 902.
30. Enciclopedia Farmacéutica, op. cit., págs. 901 y 902.
31. NEUMAN, M., op. cit., pág. 261.
32. *The Pharmacopoeia of the United States of America, Sixteenth Revision*, Mack Printing Company, Easton, Pa., 1960, pág. 1074.
33. PAECH, K. y TRACEY, M. V. *Modern Methods of Plant Analysis* (Vol. IV). Springer-Verlag, Berlin, 1955, pág. 373.
34. PAECH, K. y TRACEY, M. V. (Vol. IV), op. cit., pág. 374.
35. *The Pharmacopoeia of the United States of America, Sixteenth Revision*, op. cit., pág. 1077.
36. LABEAU, P. y JANOT, M. M. *Traité de Pharmacie Chimique*, cuarta edición, (Vol. IV), Massonet Cie., París, 1956, pág. 2696.
37. LABEAU, P. y JANOT, M. M. (Vol. IV), op. cit., pág. 2698.
38. *The Pharmacopoeia of the United States of America, Sixteenth Revision*, op. cit., pág. 1073.
39. *The Pharmacopoeia of the United States of America, Fifteenth Revision*. Mack Printing Company Easton, Pa., 1955, pág. 1108.
40. HARROW, B. *Tratado de Bioquímica y Manual de Prácticas de Bioquímica*. Tercera edición, editor Atlante, S. A., México, D. F., 1946, pág. 609.
41. KOLMER, J. A. y BOERNER, F. *Métodos de Laboratorio Clínico*, segunda edición, Editorial Interamericana, S. A., México, 1948, pág. 263.
42. GALVIS, E. *Conferencias de Laboratorio de Química Biológica*, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 1954, pág. 28.
43. TODD, J. C. y SANFORD, A. H. *Diagnóstico Clínico por el Laboratorio*, tercera edición, Manuel Marín y G. Campo S. L., Madrid, 1951, pág. 93.

44. HARROW, B., op. cit., pág. 611.
45. GALVIS, E., op. cit., pág. 35.
46. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 91.
47. GALVIS, E., op. cit., pág. 22.
48. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 90.
49. GALVIS, E., op. cit., pág. 19.
50. GALVIS, E., op. cit., pág. 21.
51. GALVIS, E., op. cit., pág. 20.
52. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 78.
53. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 111.
54. GALVIS, E., op. cit., pág. 31.
55. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., 115.
56. KOLMER, J. A. y BOERNER, F., op. cit., 160.
57. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 94.
58. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 79.
59. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 116.
60. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 121.
61. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 105.
62. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 107.
63. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 106.
64. KOLMER, J. A. y BOERNER, F., op. cit., pág. 253.
65. GALVIS, E., op. cit., pág. 141.
66. The Pharmacopoeia of the United States of America, Fifteenth Revision, op. cit., pág. 564.
67. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 87.
68. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., pág. 99.
69. TOOD, J. C. y SANFORD, A. H., op. cit., 113.
70. KOLMER, J. A. y BOERNER, F., op. cit., pág. 162.
71. HARROW, B., op. cit., pág. 607.
72. HARROW, B., op. cit., pág. 514.