UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Incorporada a la U. N. A. M.
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

SEPARACION CUALITATIVA DE TETRACICLINA, CLOROTETRACICLINA Y DESMETILCLOROTETRACICLINA POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL

T E S I S

que para obtener el título de

QUIMICO

PRESENTA

MARIA TERESA URIBE DEL CASTILLO

MEXICO, D. F. 1964

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

SEPARACION CUALITATIVA DE TETRACICLINA, CLOROTETRACICLINA Y DESMETILCLOROTETRACICLINA POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL

MARIA TERESA URIBE DEL CASTILLO

A LA MEMORIA DE MI PADRE,

Q. E. P. D.

A MI MADRE

A MIS HERMANOS

A FERNANDO

A TODOS LOS QUE ME BRINDARON SUS ENSEÑANZAS, SU AMISTAD Y SU CARIÑO.

ESTE TRABAJO FUE HECHO EN LOS LABORATORIOS DE CONTROL DE CALIDAD DE CYANAMID DE MEXICO, S.A. DE C.V., BAJO LA DIRECCION DEL SR. ING. CARLOS OCTAVIO ARREDONDO, A LOS CUALES AGRADEZCO LA AYUDA Y FACILIDADES QUE ME PROPORCIONARON PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

AGRADEZCO AL SR. GUILLERMO BURGOS Q.F.B. SU VALIOSA COOPERACION EN LA DIRECCION DE ESTE TRABAJO.

Introducción.

Cromatografía :

Antecedentes históricos.

Diversos tipos de cromatografía.

Teorías de la cromatografía en papel.

Tetraciclinas:

Información general.

Métodos analíticos.

Parte experimental :

Material y Método.

Resultados.

Conclusiones.

Bibliografía.

Introducción.

La cromatografía es un método analítico para la separación y purificación de compuestos orgánicos e inorgánicos. El desarrollo de numerosas técnicas cromatográficas como las de columna, en papel, de gases, etc., ha proporcionado un ímpetu considerable en el campo de la química analítica. Estos métodos facilitan en gran parte la separación rápida y conveniente así como la cuantificación de los componentes de una gran variedad de mezclas complejas. Con los avances de la técnica pueden actualmente determinarse e identificarse por este solo procedimiento sustancias en fracciones que varían de un microgramo a un gramo.

Este trabajo es una aportación a la investigación de métodos analíticos aplicables al estudio cualitativo y cuantitativo de mezclas de tetraciclinas.

Sabemos que existen métodos exactos para la determinación individual de tetraciclinas, pero a la fecha ninguno ha dado resultados satisfactorios en los análisis de mezclas de este grupo de antibióticos, a excepción hecha de la separación de aureomicina, acromicina y terramicina, lograda por M.L. Bird Jr. y C.T. Pugh. (1)

Antecedentes históricos.

El botánico ruso Tswett (2) fué el primero que observó la separación de diversas sustancias de estructura química semejante, basándose en su capacidad de adsorción sobre la superficie de un sólido (adsorbente) debido a la acción de un líquido adecuado (disolvente), según lo afirman autores como Weil y Williams (3), Farnsdorf, Zechmeister, etc. (4).

Los primeros trabajos de Tswett publicados por Reichter y Knabenbeschaja, datan del año de 1903 y contienen estudios sobre más de cien adsorbentes, usados en conjunción con diferentes solventes; también hay observaciones sobre los diversos grados de adsorción de cada uno de ellos. En 1909 escribió sobre variaciones en técnicas de cromatografía. Tswett murió en 1920 y sus descubrimientos son casi olvidados en los siguientes años.

Hasta el año de 1931 fué cuando Kuhn y Lederer (5) lograron la separación de carotenos y xantófilos en columnas de vidrio empacadas con alúmina y carbonato de calcio, demostrando así la realidad de los métodos propuestos por Tswett.

Gran desarrollo tuvo este método e investigadores como Brockmann, Karrer, Winterstein y Zechmeister no tardaron en aplicarlo a la química orgánica práctica para lograr separaciones y aislamientos de gran variedad de compuestos.

Posteriormente Reichstein (6) en 1938 modifica los métodos y los aplica a sustancias incoloras. Tiselius (7) en los años de 1940 a 1943, dió a conocer grandes adelantos técnicos como el del análisis frontal. En 1941 Martin y Synge (8) introducen la cromatografía por partición.

La cromatografía en papel, fue descrita por primera vez por Consden, Gordon y Martin (9) en 1944 y se convirtió en uno de los métodos principales para análisis e investigaciones analíticas.

En 1947, una serie de artículos de la Comisión Americana de Energía Atómica, entre los que se encuentran los de Boyd, Spedding y Tompkins (10), exponen el uso de la cromatografía con cambio de iones para la separación de mezclas de tierras raras. El uso de la cromatografía en papel aplicada a la química inorgánica fué introducida en 1948 por M. Lederer (11) y Linstead (12) con sus colaboradores.

En 1952 James y Martin desarrollan los métodos de cromatografía de gases abriendo un nuevo campo en la química analítica con importantes aplicaciones en la investigación y en la industria.

Existe actualmente una técnica nueva, conocida como cromatografía en capa delgada.

Diversos tipos de cromatografía.

En general la base de todos los métodos analíticos cromatográficos es la siguiente: si una serie de compuestos adsorbidos en un sólido se desplazan sobre la superficie de éste, debido a la acción de un líquido adecuado, la velocidad de movimiento dependerá de la fuerza con que están adsorbidos al sólido y al grado en que se disuelven dichos compuestos en la fase líquida. Este desplazamiento es característico para cada sustancia en igualdad de condiciones.

Cromatografía de adsorción simple.

Se aplica a sustancias que no tienen cargas eléctricas en su molécula. La separación en este proceso clásico está basada en la adsorción en varios polvos pre-tratados y seleccionados, contenidos en un tubo vertical de vidrio. La mezcla para analizar se disuelve en un solvente adecuado y se deja pasar a través del tubo o columna, ya sea por medio de la gravedad únicamente, o bien combinando esta fuerza con un gradiente de presión aplicado artificialmente, como puede ser una succión por vacío.

Cromatografía de intercambio iónico.

Se utiliza para separar sustancias que poseen cargas eléctricas en su molécula. En general, se basan en un intercambio de iones entre la sustancia problema y una resina, previamente tratada para que contenga cargas eléctricas en la

superficie reaccionante; dichas resinas pueden ser aniónicas o catiónicas. Este tipo de cromatografía se emplea tanto en columna como en papel.

Cromatografía por partición.

La separación de una mezcla por cromatografía de partición se basa en los diferentes grados de solubilidad de sus componentes en dos disolventes parcialmente miscibles entre sí; esto depende del coeficiente de partición de cada componente. Se conoce como coeficiente de partición a la relación que existe entre la concentración de la sustancia en un disolvente y su relación en el otro disolvente, estando ambos en contacto. Consden, Gordon y Martin (9) mostraron que el papel-filtro podía usarse como soporte en la fase estacionaria en la cromatografía por partición. Estas técnicas cromatográficas también se emplean en columna.

En todos los procesos cromatográficos se encuentran presentes las fuerzas de adsorción, partición e intercambio iónico, pero según los diferentes casos alguna predomina. Todas las separaciones cromatográficas involucran a lo menos dos fases. Existe una clasificación dentro de los procesos cromatográficos de adsorción y partición en la que los sistemas se encuentra apareados en la fase sólida, líquida o gaseosa como sigue:

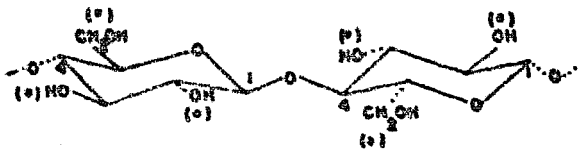
sólido / líquido	cromatografía de adsorción
líquido / líquido	cromatografía de partición
sólido / gaseoso	cromatografía de adsorción
líquido / gaseoso	cromatografía de partición (13)

Cromatografía en papel.

1. Cromatografía de intercambio iónico.

En la cromatografía de intercambio iónico se utiliza una celulosa de elevada pureza en la cual predominan los grupos COOH. Sondenfeld, Dedda, Bedda y Boscott (14) (15) (16) determinaron la cantidad de grupos contenidos en este soporte.

Con objeto de aumentar la capacidad de intercambio iónico de papel filtro usado en cromatografía, se han ensayado métodos que permiten aumentar el número de grupos funcionales o sea los cambiadores de iónes.



Weiland y Berg (17) añadieron grupos carboxílicos al papel oxidándolo con N_2O_4 ; posteriormente Kenyon y Yachel (18) lograron aumentar en un 5 % más los grupos carboxílicos. Sin embargo, el producto obtenido presentaba el inconveniente de ser soluble en álcalis, limitando su uso a disolventes ácidos. Investigaciones más recientes permitieron elaborar papel filtro con diferentes propiedades, según las necesidades que surgieron con el avance de las técnicas, basta citar el papel fosforilado, el hidrofóbico, etc. Peterson (19) preparó a base de muchos estudios e investigaciones una -

celulosa carboxílica tratando celulosa alcalina con ácido cloro acético; esta clase de papel se emplea en la separación de proteínas.

Se conocen actualmente métodos más prácticos para la preparación de papel filtro de intercambio de iónes, como el que consiste en suspender el material en una suspensión coloidal de la resina de elección, sea aniónica o catiónica.

2. Cromatografía por partición.

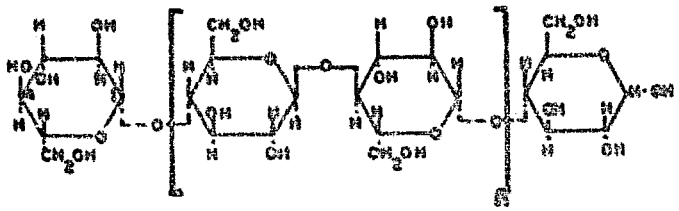
En la cromatografía por partición se aplica el principio de distribución de contra corriente. El procedimiento se basa en el uso de un sistema de dos disolventes no miscibles entre sí y un soporte sólido como el de gel de sílice, almidón etc., como es el caso en la cromatografía en columna.

Uno de los métodos mas ingeniosos de aplicación de la cromatografía de particion es el aprovechamiento del papel filtro como medio de soporte sólido. En esta técnica, descrita por Consden, Gordon y Martin (9), se considera a la celulosa como el soporte inerte de una fase acuosa estacionaria y las separaciones obtenidas se explican como el resultado de particiones sucesivas de la sustancia problema entre la fase acuosa estacionaria y el disolvente orgánico que fluye por el papel.

A la técnica de Martin se objetó que en estas condiciones no puede establecerse un equilibrio suficientemente rápido en un sistema sin agitación, por lo que la separa

ción no sería explicable como una simple extracción disolvente disolvente. Pero tomando como base las constantes de difusión conocidas, se acepta que la eficiencia de los cromatogramas en papel es satisfactoria.

Se pensó también que si existen dos disolventes no miscibles entre sí, existirán por lo mismo dos fases y como consecuencia habrá una partición. Pero en el caso en que ambos disolventes sean miscibles entre sí, como es frecuente, sólo aparecerá una fase, con lo cual no podrá presentarse partición alguna. Pero Martin considera a la fase estacionaria líquida como una solución concentrada de carbohidratos, ya que el papel está formado por celulosa que es un polisacárido de soya.



De acuerdo con lo anterior, tenemos una fase acuosa rica en carbohidratos y otra rica en disolvente, pero conteniendo agua también; y aunque sean miscibles los disolventes, existen dos fases y por lo mismo una partición. Esta fase estacionaria acuosa puede también llamarse complejo agua-celulosa y según Hanes e Isherwood (20) sólo es problema de terminología ela-

nan al mecanismo de cromatografía de partición o de absorción en el complejo agua disolvente.

En la cromatografía de papel que se lleva a cabo en ambientes saturados por la fase estacionaria que generalmente es un disolvente orgánico y en la cual la fase acuosa - es la que se desplaza, se obtiene según Tschesche (21) una - cromatografía de "Partición real".

Generalidades sobre cromatografía en papel.

Una de las múltiples ventajas de la cromatografía en papel es la de que pueden utilizarse cantidades extremadamente pequeñas para una separación analítica. La sustancia por analizar se disuelve en un disolvente adecuado y se obtiene así una solución problema; ésta se coloca en el papel-filtro en el punto indicado como base de partida.

El papel filtro más usado es el papel Whatman #1 y el Whatman #3, con una densidad de flujo mayor que aumenta el tiempo de desarrollo del cromatograma. Ambos papeles están fabricados a base de fibra de algodón. Otro papel de uso común es el Schleicher y Schuell 2043, equivalente en peso y flujo al Whatman #1. La clase alemana 2043 mgl, aunque más pesada es mas resistente al rasgado y presenta la misma velocidad de flujo que la 2043. Cuando se elabora un nuevo método de separación es conveniente seleccionar el papel más adecuado en lo que toca a velocidad de flujo y tenacidad del mismo. El papel debe ser manipulado con precaución, procurando en lo posible

se tocarlo con las manos para evitar manchas que interfie-ran la correcta separación. Toda marca o arruga en el papel lo hace inservible, al igual que el chamuscarlo en rollos muy compactos. Debe almacenarse en sitios bien aislados del ambiente del laboratorio.

El papel filtro posee un 6 % de humedad, pero a 20° C. absorbe de 20 a 22 % más; de esta humedad, un 13 % está unido físicamente a la superficie del papel y un 7 % está unido por fuerzas del tipo de las de Van der Waals. - El agua se requiere para la formación de la fase agua celulosa y para la saturación de los grupos polares de la misma; esta combinación con el agua es la que hace posible la clara separación de las sustancias por analizar. El papel se puede utilizar en forma de tiras, de hojas para análisis bidimensional, o bien circular.

La solución problema se deposita en pequeñísimas cantidades, del rango de 0.030 a 0.010 ml., ya sea usando microburetas o micropipetas; se coloca una gota, se deja secar perfectamente a temperatura ambiente o mediante un se cador de aire puro y se coloca otra gota; así sucesivamente hasta completar la cantidad requerida. Este procedimiento se efectúa con el propósito de colocar la muestra en la mínima superficie posible.

Cuando la muestra esta perfectamente seca, el papel se coloca en una cámara cerrada, y se pone en contacto con un disolvente o mezcla de disolventes a los que co-

DISOLVENTE SE DENOMINA SOLVENTE, O DICHO MEDIO FLUENTE. EL DISOLVENTE SATURADO CON EL AGUA ES ARRASTRADO POR LAS FUERZAS DE CAPILARIDAD DEL PAPEL Y ASÍ RECIDISUELVE Y TRANSPORTA A LO LARGO DEL SOPORTE LA MUESTRA. LAS SUSTANCIAS EN SOLUCIÓN DE LA MUESTRA SE MUEVEN DE ACUERDO CON SUS PROPIEDADES CON DIFERENTES VELOCIDADES ARRÁS DE LA LÍNEA DE FONDO O AVANCE DEL DISOLVENTE.

DESPUÉS DE UN INTERVALO CONVENIENTE, LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA SE DEPOSITAN SEPARADAMENTE COMO MANCHAS A LO LARGO DE LA TRAYECTORIA RECORRIDA. EN ESTE PUNTO SE TIENE UN CROMATOGRAMA DESARROLLADO.

PARA LA ELECCIÓN DEL DISOLVENTE HAY QUE TENER EN CUENTA QUE EL UTILIZADO EN EL MEDIO FLUENTE NO REACCIONE CON LAS SUSTANCIAS DEPOSITADAS EN EL PAPEL. EN GENERAL LA ELECCIÓN ESTÁ DETERMINADA POR LAS SUSTANCIAS QUE SE VAN A ANALIZAR. PARA SUSTANCIAS MUY POLARES, HAY QUE UTILIZAR TAMBIÉN DISOLVENTES MUY POLARES Y LOS DISOLVENTES DÉBILMENTE POLARES SERVIRÁN PARA SUSTANCIAS DÉBILMENTE POLARES. UN DISOLVENTE DÉBILMENTE POLAR CONTRARRESTA LA TENDENCIA DE LOS COMPUESTOS POCO POLARES DE VIAJAR UNA DISTANCIA MUY GRANDE, MIENTRAS QUE UNO POLAR, AYUDA MÁS A ESTA TENDENCIA. LAS SUSTANCIAS DE ELEVADA POLARIDAD TIENDEN A RECORRER UNA DISTANCIA MUY CORTA PERO LOS DISOLVENTES POLARES AYUDAN A QUE ESTA TRAYECTORIA SEA PERFECTAMENTE DETECTABLE.

LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SALES DE BASES ORGÁNICAS

se cromatografían con disolventes ácidos. Las bases orgánicas y sales de ácidos orgánicos se cromatografían con disolventes débilmente alcalinos.

Los disolventes deben ser purificados, ya que las impurezas reaccionan con las sustancias por analizar alterando su Rf, o impidiendo su clara visualización (revelado).

Los métodos para preparación de cromatogramas se clasifican en:

Método ascendente: La muestra se coloca en el punto de partida, en la parte inferior del papel; éste enrollado, se deposita en la cámara saturada, y se coloca en la base del rollo un depósito para el disolvente; el cual es absorbido por capilaridad y la trayectoria recorrida es en sentido opuesto a la fuerza de la gravedad.

Método descendente: En la parte superior de la cámara, se deposita un recipiente con el disolvente y el extremo de papel con la muestra colocada ahí, se suspende del recipiente; el resto del papel queda libre y la muestra corre en sentido a la fuerza de la gravedad. La cromatografía descendente es preferible cuando se separan sustancias con velocidad de flujo similar.

La cromatografía en papel circular se lleva a cabo en un plano horizontal y puede ser de anillos o de círculos, dependiendo de la forma como se deposite la muestra.

El tiempo para desarrollo del cromatograma debe determinarse en cada caso; en general, se recomienda que se

HA TERMINADO UN CROMATOGRAMA CUANDO EL FRENTE DEL DISOLVENTE ALCANZA CASI LA ORILLA DEL PAPEL FILTRO, PERO SIN CORRER EL RIESGO DE QUE LO REBASE.

LAS HOJAS DE PAPEL SE UTILIZAN EN LA MAYORÍA DE LOS CASOS PARA ANÁLISIS BIDIMENSIONALES, ES DECIR, PRIMERO SE CORRE EL CROMATOGRAMA EN UN SENTIDO, SE SECA 70° Y SE VUELVE A DESARROLLAR; ESTE MÉTODO ES MUY SELECTIVO.

UN MÉTODO POCO COMÚN ES LA CROMATOGRAFÍA DE PINCELADA QUE CONSISTE PRECISAMENTE EN DEPOSITAR LA MUESTRA EN FORMA DE PINCELADA EN LA HOJA DE PAPEL FILTRO Y DEJARLA QUE SE DESARROLLE, YA SEA POR EL MÉTODO DESCENDENTE O ASCENDENTE; ESTE MÉTODO SE UTILIZA PARA SEPARAR SUSTANCIAS QUÍMICAS QUE SE ENCUENTREN EN MUY BAJA PROPORCION EN LA MEZCLA. EN ESTE CASO, LA MANCHA DEBERÁ COMPARARSE CON OTRA MANCHA TIPO DE DICHA SUSTANCIA PURA.

AL TENER EL CROMATOGRAMA YA DESARROLLADO, SE PROCEDE AL SECADO DEL MISMO. ES ACONSEJABLE EFECTUAR ESTE PASO LO ANTES POSIBLE PARA EVITAR CONTAMINACIONES. EL PROCEDIMIENTO DEPENDERÁ DE LA SENSIBILIDAD Y VOLATILIDAD DE LAS SUSTANCIAS ANALIZADAS; EL SECADO PUEDE SER A TEMPERATURA AMBIENTE, EN LUGAR A SALVO DE CONTAMINACIONES Y EN ESTUFA A TEMPERATURA CONSTANTE Y APROPIADA PARA CADA MUESTRA, CON O SIN CORRIENTE DE AIRE; O SIMPLEMENTE CON CORRIENTE DE AIRE FRIO PARA SUSTANCIAS MUY VOLÁTILES.

MUCHAS VECES LAS MANCHAS NO SON VISIBLES A SIMPLE VISTA. ENTONCES, LA VISUALIZACIÓN DEL CROMATOGRAMA SE LOGRA DE

DIVERSAS FORMAS, YA SEA POR ACCIÓN DE CIERTAS SUSTANCIAS -- QUE DEN COLOR CARACTERÍSTICO, O BIEN OBSERVÁNDOLO BAJO LUZ- ULTRA VIOLETA DE LONGITUD DE ONDA DE 357 A 366 MILIMICRONES COMO EN EL CASO DE LOS COMPUESTOS CÍCLICOS; OTRA FORMA, SERÍA ATOMIZANDO UNIFORMEMENTE EL CROMATOGRAMA CON ALGUNA -- SUSTANCIA REVELADORA, LA CUAL PUEDE DAR INTENSIDAD A LAS -- MANCHAS O BIEN COLOREAR EL PAPEL Y DEJAR INCOLORAS LAS MANCHAS DE LOS PROBLEMAS. SE MARCA EL CONTORNO DE LA MANCHA, - SI ES NECESARIO, Y SE PROCEDE A LA DETERMINACIÓN DEL CROMATOGRAMA, PARA LO CUAL HAY QUE TENER EN CUENTA LOS SIGUIENTES CONCEPTOS FÍSICO QUÍMICOS :

Rf. EL Rf SE DEFINE COMO LA RELACIÓN INVERSA- QUE EXISTE ENTRE LA DISTANCIA RECORRIDA POR EL DISOLVENTE Y LA DISTANCIA RECORRIDA POR EL PROBLEMA Y SIEMPRE SERÁ MENOR QUE LA UNIDAD. PARA IDENTIFICAR UNA SUSTANCIA SE MIDE EL VALOR DEL Rf DEL PROBLEMA EN RELACIÓN AL Rf DE UNA SUSTANCIA- EMPLEADA COMO REFERENCIA, SIEMPRE QUE AMBAS SEAN TRATADAS - EN IGUALDAD DE CONDICIONES.

EL Rf ES UN VALOR QUE DEPENDE DE LAS CANTIDADES RELATIVAS DE LAS DOS FASES EN CONTACTO Y DEL COEFICIENTE DE PARTICION. EN COLUMNA O EN PAPEL, DEPENDE SÓLO DEL -- COEFICIENTE DE PARTICIÓN, EL CUAL ES UNA CARACTERISTICA DE CADA ESPECIE QUÍMICA, COMO LO SON EL PUNTO DE FUSIÓN, O EL DE EBULLICION, PERO EL Rf POSEE LA VENTAJA DE QUE NO SE VE ALTERADO POR INFLUENCIA DE OTRAS SUSTANCIAS PRESENTES.

-Rf. El Rf puede medirse directamente con una celda propuesta por Jeggnel y Roehlel los resultados obtenidos son cien veces mayores y se conocen como mRf. (13)

Rst. En la distancia recorrida por el problema, relacionada con la recorrida por una sustancia usada de referencia en igualdad de condiciones. En algunos casos el Rst. resulta mayor que la unidad, pero no debe sobrepasar el límite de 1,5 (21)

Ru. Este valor fue propuesto por Bate, Smith y Westal (22) y se determina según la ecuación:

$$Ru = \log (1 / Rf - 1)$$

Se dice que este valor es proporcional a la energía libre necesaria para mover una molécula de una fase a otra.

Antibióticos. Tetraciclinas. Clorotetraciclina, Tetraciclina, Demetilclorotetraciclina y Oxitetraciclina.

Los antibióticos son sustancias químicas producidas como resultado de las actividades metabólicas de ciertas células vivientes y cuyas sustancias, aún en concentraciones muy bajas, inhiben el crecimiento de microorganismos.

Por lo general, al usar el término "antibiótico" nos referimos a sustancias de origen microbial y cuya acción inhibidora característica se puede tomar como una expresión o forma de antagonismo microbial, ya que son sustancias producidas por varias especies de microorganismos, tales como las bacterias, hongos y actinomicetos.

Las tetraciclinas son antibióticos producidos por actinomicetos del género S t r e p t o m y c e s y su descubrimiento se debió a una intensa investigación de microorganismos capaces de producir agentes químio-terapéuticos potencialmente útiles. Esta investigación se inició a raíz del descubrimiento de la importancia de la penicilina primero y la estreptomicina después, como agentes terapéuticos.

De las tetraciclinas, cuatro en total, se puede decir que tienen las siguientes características:

a) Son derivados cercanos del policíclico nafta cenocarboxamida (24)

b) Tres de ellas, la clorotetraciclina, la oxi-

TETRACICLINA Y LA DESMETILCLOROTETRACICLINA SON PRODUCIDAS POR FERMENTACIONES EN TANQUE. LA TETRACICLINA, ES UN SEMI-SINTÉTICO, PRODUCIDO POR MICROBIOTRANSFORMACIÓN CATALÍTICA DE LAS CLOROTETRACICLINA.

c) TIENEN COMO ESQUELETO COMÚN, EL DEL NAFTACENO. (25).

d) A LAS CUATRO DE LOS CUALES, COMO ANTIBIÓTICOS DE AMPLIO ESPECTRO, YA QUE TIENEN ACCIÓN CONTRA RICKETTSIAS, ALGUNOS VIRUS, ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS Y GRAM-NEGATIVOS Y CASI - LOS.

DE LAS CUATRO TETRACICLINAS, TRES SON PRODUCIDAS POR CYANAMID DE MÉXICO, S.A. DE C.V., EN SU PLANTA DE ATEQUIZA, JAL.: CLOROTETRACICLINA, TETRACICLINA Y DESMETILCLOROTETRACICLINA. LA OXITETRACICLINA, ES PRODUCIDA POR LA CASA CHAS. PFIZER - INC. EN LOS ESTADOS UNIDOS.

CLOROTETRACICLINA.- ES UN ANTIBIÓTICO DE AMPLIO ESPECTRO, SEPARADO DE LOS PRODUCTOS METABÓLICOS DEL ACTINOMICETO STREPTOMYCES AUREOFACIENS; INICIALMENTE SE LE NOMBRÓ A-377, LUEGO PASÓ AL MERCADO BAJO LA MARCA REGISTRADA AUREOMICINA Y POSTERIORMENTE SE LE DENOMINÓ AUREOMICINA.

SE PRESENTA EN FORMA DE CRISTALES AMARILLO DORA - DOS, INODOROS, AMARGOS, DE FÓRMULA $C_{22}H_{23}N_2O_8Cl$.

EN SOLUCIONES EN PROPORCIÓN DE 1: 200, POSEE UN - PH ENTRE 2.3 Y 3.3. ES ESTABLE A LA LUZ, PERO SE DESCOMPONE DES - PUÉS DE LARGAS EXPOSICIONES. ES UN COMPUESTO ANFÓTERO Y FORMA - SALES BIEN DEFINIDAS CON ÁCIDOS Y BASES. SU DEGRADACIÓN ALCALI -

metilados. Originalmente fueron producidas por Stanerclon en el laboratorio sobre las Tetraciclinas. La 6-demetiltetraciclina y la 7-cloro-6-demetiltetraciclina se encontraron posteriormente en los procesos metabólicos de una cepa mutante de - - - - - - - S t r e p t o m y c e s a u r e o f a c i e n s . La 7-cloro-6-demetiltetraciclina posee el mismo espectro y sus usos son semejantes a los de la Tetraciclina, pero posee una actividad mayor in vitro que la Aureomicina y la Neomicina.

Sus propiedades son semejantes a las de otros - antibióticos, debido a su parentesco estructural, pero es más - higroscópica, se presenta en forma cristalina y es de color amarillo limón, inodora y de sabor ligeramente amargo.

Oxitetraciclina.- Este antibiótico se encontró simultáneamente con la Clorotetraciclina y fué aislado de los - productos metabólicos del actinomiceto S t r e p t o m y c e s r i m o s u s . En la industria se le conoce como Terramicina- y es una sustancia amarilla, cristalina, inodora de fórmula - - $C_{22}H_{24}O_9N_2 \cdot 2H_2O$.

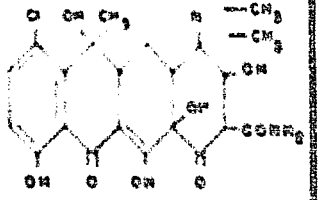
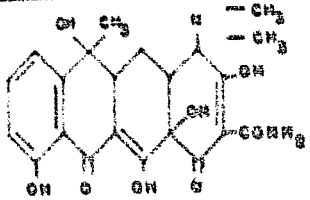
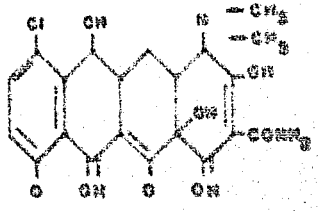
Es un compuesto anfótero y forma salos bien definidas con ácidos y bases; una solución saturada del antibiótico tiene un pH de 6.5. Se descompone por largas exposiciones a la luz, así como en soluciones muy ácidas o alcalinas. Por análisis espectrofotométrico y por titulaciones se sabe que de ocho átomos de hidrógeno activo, dos pueden identificarse como- fenólicos o enólicos. Por acción del anhidrido acético, se - -

IDENTIFICAN DOS GRUPOS DIMETILO ALCOHÓLICOS.

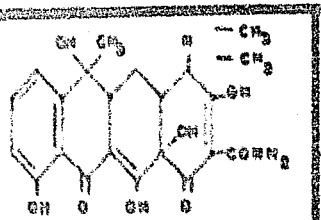
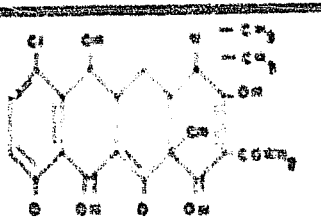
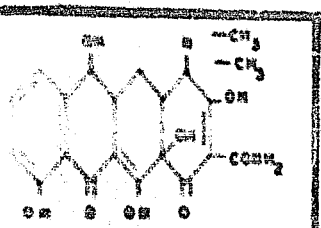
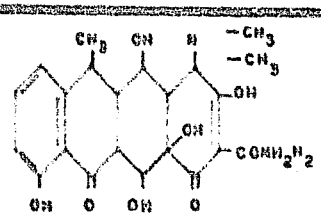
UN RESUMEN DE LAS PROPIEDADES MÁS IMPORTANTES DE LAS TETRACICLINAS SE EXPONE EN EL SIGUIENTE CUADRO:

(24) (30) (31) (32)

CUADRO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES DE

FORMULA ESTRUCTURAL.							
NOMBRE COMERCIAL.	AUREOMICINA.		ACROMICINA.		LEDERMICINA A-VIII.		
NOMBRE QUIMICO.	CLOROTETRACICLINA.		TETRACICLINA		6-DESMETIL-CLOROTETRACICLINA.		
SAL.	HCl	NEUTRA	HCl	NEUTRA	HCl	NEUTRA	
FORMULA EMPIRICA.	$C_{22}H_{24}N_2Cl_2O_8$	$C_{22}H_{23}N_2ClO_8$	$C_{22}H_{23}N_2ClO_8$	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	$C_{21}H_{23}N_2ClO_8$	$C_{21}H_{22}N_2ClO_8$	C_{2}
PESO MOLECULAR.	515.34	478.88	480.89	444.43	501.92	466.88	
POTENCIA γmg.	1000	1070	1000	1090	1000	1070	
ROTACION OPTICA.	-241° (AGUA 1%)	— 278° (MEOH 1%)	— 227° (AGUA 5%)	— 250° (MEOH 1%)	— 253° (IN H_2SO_4 5%)	———	———
MAXIMA ABSORBANCIA EN U.V. EN SULFURICO O.1N.	230, 268 368	———	220, 269 375	———	227, 269 369	———	
PUNTO DE FUSION.	210°	168 – 169°	214°	170 – 175°	210°	———	2
PKa.	3.4, 7.4, 9.2	———	———	3.3 , 10.2	4.99 , 7.82	———	
ANALISIS ELEMENTAL. C	51.27	59.17	54.94	59.45	50.51	55.26	
ANALISIS ELEMENTAL. H	4.62	4.82	4.82	5.44	4.22	4.53	
ANALISIS ELEMENTAL. N	5.40	5.83	5.83	6.30	5.59	6.03	
ANALISIS ELEMENTAL. Cl	13.76	7.41	7.37	———	14.19	7.41	
ANALISIS ELEMENTAL. O	24.92	26.77	27.04	28.81	25.74	26.75	

O DE LAS PROPIEDADES DE LAS TETRACICLINAS.

			
ACROMICINA.	LEDERMICINA A-VIII.	LEDERMICINA A-IX.	TERRAMICINA.
TETRACICLINA	6-DESMETILCLOROTETRACICLINA	6-DESMETILTETRACICLINA.	OXITETRACICLINA.

HCl	NEUTRA	HCl	NEUTRA	HCl	NEUTRA	HCl	NEUTRA
$C_{22}H_{25}N_2ClO_8$	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	$C_{22}H_{23}N_2Cl_2O_8$	$C_{22}H_{22}N_2ClO_8$	$C_{22}H_{23}N_2ClO_8$	$C_{22}H_{22}N_2O_8$	$C_{22}H_{25}N_2ClO_9$	$C_{22}H_{24}N_2O_9$
480.89	444.45	501.32	484.85	466.87	430.40	496.89	460.43
1000	1080	1000	1078	1000	1089	927	1000
− 327° (AGUA 5%)	− 238° (MEOH 1%)	− 255° (1N H_2SO_4 5%)	——— ———	− 264° (1N H_2SO_4 5%)	——— ———	——— ———	− 196° (1N H Cl. 5%)
280,268 336	———	227,268 365	———	217,267 353	———	218,268 352	———
214°	170-175°	210°	———	203-208°	177-180°	———	185-188°
———	0.5 , 10.2	4.90 , 7.62	———	5.15, 8.90	———	3.49, 7.55, 9.24	———
54.00	59.45	50.31	54 26	54.02	58.60	53.10	57.39
4.02	5.44	4.22	4.53	4.07	5.11	5.06	5.25
5.03	8.50	5.59	6 05	6.00	8.51	5.64	6.00
7.37	———	14.19	7.41	7.17	———	7.15	———
27.04	26.81	25.74	26 75	27 84	26.76	29.15	31.28

Métodos analíticos para cuantificación de tetraciclinas.

Los métodos usados en la actualidad para determinación de las tetraciclinas se pueden agrupar en dos ramas : Métodos Espectrofotométricos y Métodos Microbiológicos.

Los primeros son métodos colorimétricos con longitudes de onda característica, los cuales se basan en las diferentes absorbancias de los anillos cromóforos de las tetraciclinas. La absorbancia máxima de cada compuesto (pico de absorción) es específica a una determinada longitud de onda.

Los métodos microbiológicos son en realidad métodos fundamentales, en los cuales se lee la transmitancia de una solución tampón obtenida por la inhibición del crecimiento de un microorganismo testigo a diferentes concentraciones del antibiótico. Una variante de este método es medir zonas de inhibición de crecimiento en una placa de agar saturada con el microorganismo testigo, al cual se le ha puesto el antibiótico en diversas concentraciones y mediante pequeños cilindros de acero inoxidable (penicilindros).

Otra técnica de análisis de tetraciclinas consiste en la titulación del antibiótico en un medio acuoso ; como ejemplo se puede citar la titulación con ácido perclórico del antibiótico en una solución de ácido acético glacial. Sin embargo, este procedimiento no se emplea en la industria debido a las condiciones tan rigurosas que se requieren.(30)

Material.

Para este estudio se emplearon mezclas de clorhidrato de clortetraciclina, clorhidrato de tetraciclina y clorhidrato de oxitetraciclina.

Los muestras de antibióticos fueron proporcionadas por la Planta de Cyanamid de México, S.A. de C.V. de Azcapotzalco, Jalisco. La potencia de las muestras varía de 95 a 100 % de pureza. Se dosificaron cromatogramas de 23 lotes diferentes.

El departamento de Investigación empleó antibióticos de referencia cuya pureza es de 99.95 % o más. Estos antibióticos de referencia fueron proporcionados por la U.S.P. Reference Standards. Se corrieron 30 cromatogramas de antibióticos individuales, 29 de mezclas de dos antibióticos y 12 de mezclas de los tres antibióticos.

Método.

El método empleado en nuestro estudio es el propuesto por C.J. Speciale, del Departamento de Investigaciones de American Cyanamid, S.A. de C.V., División Laboratorios Lederle en Nueva York. (33)

Equipo:

Juego cromatográfico de vidrio, equipado con soporte de acero inoxidable, cuba de vidrio para el ambientador, esta cuba de acero inoxidable y recipiente de vidrio para el disolvente.

Micropipetas de 0.050 ml. (descartar N° 6510)

Papel para cromatografía Whatman #1

Lámpara de luz ultravioleta Spectroline

Pulverizador Bellows modelo Zonyware

Papel Filtro Econo. 85, en hojas

Cubetas de separación de 250 ml. de vidrio Pyrex

Matraces Erlenmeyer de 10 ml. de vidrio Pyrex

Atomizadores de vidrio Pyrex

Reactivos:

Alcohol n-butílico

Acetato de n-butilo

Acetato de etilo

H Cl c.p.

a) Solución de H Cl 0.1 N: medir 85 ml. de ácido clorhídrico c.p. y llevar a 1000 ml. con agua destilada.

Amoníaco c.p.

Solución amortiguadora pH 3

Disolver 61.4 g. de fosfato monobásico de so-

dio en 500 c.c. de agua destilada, ajustar el pH a 3 con solución de ácido fosfórico c.p., completándose con el potenciómetro y aforar a 1000 c.c. con agua destilada.

Solución amortiguadora pH 2

Se prepara de igual manera que el anterior pero ajustando con fosfórico a pH 2

Solución amortiguadora pH 4.5

a) Disolver 102.2 g. de acetato sódico de sodio en agua y aforar a 1000 c.c.

b) Disolver 45 c.c. de ácido cítrico en agua y aforar a 1000 c.c.

Mezclar partes iguales de las dos soluciones para obtener el pH 4.5

Técnica:

1. Preparación de la muestra: del antibiótico por analizar, previamente secado a 60° C. durante tres horas en estufa de vacío, pesar 0.050 g., disolver y aforar con H Cl 0.1 N en un matraz aforado de 10 c.c.

La solución de aureomicina se prepara 24 horas antes de su aplicación. La solución de aureomicina requiere un tratamiento previo que consiste en agregar 1 c.c. de una solución de hidróxido de amonio concentrado a 10 c.c. de la solución problema y dejarla en reposo 24 horas antes de su aplicación. La solución de tetraciclina no requiere ningún paso especial.

Tanto las soluciones tipo como los problemas de preparación de las mismas considerados. Para las mezclas de dos componentes tipo, medir 1 ml. de la solución individual y 1 ml. de la segunda solución individual y mezclarlas; de análogas la muestra. Para el sistema de tres componentes, preparar cantidades iguales de cada sustancia, homogeneizarlas y pesar la cantidad indicada.

2. Introducción de la columna preparada una cantidad de la mezcla de componentes indicada con ayuda de una jeringa de 10 µl y registrar el cromatograma en las condiciones de la prueba en primer lugar la columna de comparación. La cámara de gas para esto de 20 a 25 horas.

3. Preparación de las tiras de papel filtrado: Cortar una tira de 10 cm. de largo, trazar una raya longitudinal a la mitad y otra más a una distancia de 4.5 cm. a cada lado de la línea central; el punto medio de dichas rayas se indica con una marca, esta marca será el punto de aplicación de la muestra. En el extremo de la tira, colocar una pinza de acero inoxidable para que permanezca en posición vertical dentro de la cámara. Impregnar las tiras con el adsorbente correspondiente a cada sistema y dejarlas secar.

4. Aplicación de la muestra: Tomar la muestra con la micropipeta, aforar, limpiar el líquido que pudo haber quedado adherido a las paredes. Depositar una gota de la muestra en el punto de origen, secarla en corriente de aire

puso, se coloca otra porción en el mismo lugar y secar; así sucesivamente, hasta terminar con la muestra dudosa. En caso de tira se depositan con marcadores en la parte central de la tira, anotar con lápiz de grafito una clave para identificación de cada muestra.

5. Ya secas las muestras colocar las tiras en la siguiente forma: la línea central en una dirección y las laterales en la opuesta, para que la tira corra de forma de M.

6. Desarrollo del cromatograma. Colocar la tira sobre la cuba cromatográfica de la cámara, depositar en el fondo a de ésta la parte central de la tira y sostenerla con una pinza de vidrio, los bordes coinciden con los bordes de la cuba y la tira quede verticalmente.

7. Dentro de la cuba depositar 10 ml. del sistema correspondiente a cada sistema, previamente saturado en un embudo de separación con el disolvente correspondiente: para el sistema alcohol n-butílico, amortiguados pH 3 para el de acetato de n-butilo, amortiguados pH 2 y el pH 4.5 se utiliza para el sistema de acetato de etilo.

8. Cerrar la cámara y sellarla con grasa.

9. El tiempo de desarrollo de cada sistema es el siguiente: alcohol n-butílico 16 horas, acetato de n-butilo - 4 horas y acetato de etilo 4 horas.

10. Revelado: Transcurrido el tiempo de desarrollo, sacar las tiras de la cámara, colocarlas sobre papel filtro y dejarlas secar a temperatura ambiente.

11. Cortar las cuerdas por la mitad para obtener cada banda con dos cuerdas, coloreándolas con color verde una franja vertical de papel dibujo previamente situada en una distancia de cuarenta cm. Numerarlas las vigas con numeración arábiga desde 1 correlativamente hasta la última violeta.

12. Hacer dichas las marcas con lápiz de grafito el desplome de las cuerdas e indicar con una clave el corte de las vigas y marcar la distancia que descienda el cordel.

13. Clavar una de las bandas de la manera con la numeración descrita en (11) marcándola con un punto y medir la distancia entre este punto y el de origen. Determinar la distancia entre el punto del cordel y el sitio de origen. Relacionar dichas distancias y obtener el N°. - Proceder de igual manera con cada cuerda.

Resultados.

Al probar el método original del Dr. Speciale (33) se observó que la succinicina y la lecitinicina presentaban la misma coloración (amarillo limón) y que Rf muy próximos, lo que dificultaba su diferenciación en el cromatograma. Este problema se resolvió con la adición de nidrógeno de amonio a la solución de succinicina obteniéndose así una mancha azul, a diferencia de la lecitinicina de azul de amarillo limón y de la acromicina que da coloración amarillo dorado.

Ni la lecitinicina ni la acromicina se ven afectadas por el amoníaco en la mezcla ni los tres antibióticos.

La lecitinicina no necesita tiempo de reposo antes de hacer su aplicación, ni ni ese amoníaco; pero la prolongación del tiempo o la adición [illegible] nidrógeno a las mezclas en las que se encuentra presente no le afectan tampoco.

Según el método en cuestión, cada tira de papel se impregna con el amortiguador adecuado para cada sistema y después se seca. Tras de aplicar la muestra, se desarrolla el cromatograma encontrándose que, aún cuando la muestra corre en forma satisfactoria y hay separación, en ningún caso fué perceptible la línea de avance del disolvente, ni antes ni después del revelado. De lo anterior se deduce que esta técnica no es apropiada, por lo que en nuestro caso se trabajó con las tiras sin tratamiento previo.

La visualización o revelado de las tiras se puede -

llevan a cabo también con una solución de cloruro férrico al 5% en metanol (13), observándose lo que se llama una coloración negativa, es decir, la tira no tiñe de un color naranja y las manchas se encuentran incoloras. Sin embargo, en el caso de aureomicina no se obtiene tal decoloración de la mancha debido a la modificación mecmal al hacerse el ensayo.

En los cuadros 1, 1a, 2, 2a, 3 y 3a, se exponen los resultados obtenidos en los 9 cromatogramas desarrollados. En dichos cuadros se encuentran los Rf de los antibióticos tipo del mercado individualmente, con papel y en mezcla de ellos. También se encuentran los resultados de las mezclas problema.

En las figuras I y II se puede observar un sistema completo desarrollado.

CUADRO N° 1

SISTEMA ALCOHOL N-BUTILICO

ANTIBIOTICOS TIPO

ACROMICINA	AUREOMICINA	LEDERMICINA
.221	.612	.604
.231	.650	.672
.221	.604	.612
.288	.717	.504

ACRO- MICINA.	AUREO- MICINA.	LEDER- MICINA.	AUREO- MICINA.	ACRO- MICINA.	LEDER- NICINA.
179	613	425	593	130	.420
.140	540	.456	.607	.143	.506
156	573	.456	.627	.100	.510

ACROMICINA - LEDERMICINA - AUREOMICINA		
.187	400	615
.186	460	.607
.189	434	.630
.200	.409	.625

CUADRO Nº1A

SISTEMA ALCOHOL N-BUTILICO

PROBLEMAS

	AUREOMICINA - AUREOMICINA - LEDERMICINA		
LOTE A	227	802	548
LOTE B	200	721	502
LOTE C	183	645	407
LOTE D	267	712	638
LOTE E	262	721	901
LOTE F	266	713	617
LOTE G	279	718	617
LOTE H	245	695	523
LOTE I	229	692	514

CUADRO Nº 2

SISTEMA ACETATO DE N-BUTILO
ANTIBIOTICOS TIPO

ACROMICINA	AUREOMICINA	LEDERMICINA.
261	722	.640
290	720	.500
256	.741	525

ACRO- MICINA	AUREO- MICINA	LEDER- MICINA	AUREO- MICINA	ACRO- MICINA	AUREO- MICINA
.254	718	.590	.714	.271	.642
.237	705	556	.660	.240	.624
236	775	590	.755	.200	.612

ACROMICINA-	LEDERMICINA-	AUREOMICINA
.320	.591	749
.237	.604	732
290	.500	.743
271	592	.750

CUADRO Nº 2A

SISTEMA ACETATO DE N-BUTILO

PROBLEMAS

	ACROMICINA	AUREOMICINA	LEDERMICINA
LOTE J	242	745	600
LOTE K	222	750	625
LOTE L	245	744	630
LOTE M	242	774	667
LOTE N	285	841	700
LOTE O	245	745	540
LOTE P	255	717	524
LOTE Q	254	706	545
LOTE R	220	718	537

CUADRO Nº 3

SISTEMA ACETATO DE ETILO

ANTIBIOTICOS TIPO

ACROMICINA	AUREOMICINA	LEDERMICINA
350	011	659
283	.744	.606
285	.706	.606

ACRO- MICINA	AUREO- MICINA	LEDER- MICINA	AUREO- MICINA	ACRO- MICINA	LEDER- MICINA
329	707	612	776	343	673
315	612	629	629	344	662
300	700	600	800	606	629

ACROMICINA — LEDERMICINA - AUREOMICINA		
343	626	791
314	637	656
295	610	650
283	653	625

CUADRO N° 3A

SISTEMA ACETATO DE ETILO

PROBLEMAS

	ACROMICINA	AUREOMICINA	LEDERMICINA
LOTE S	343	802	624
LOTE T	361	841	654
LOTE U	362	832	660
LOTE V	387	835	672
LOTE W	299	801	606

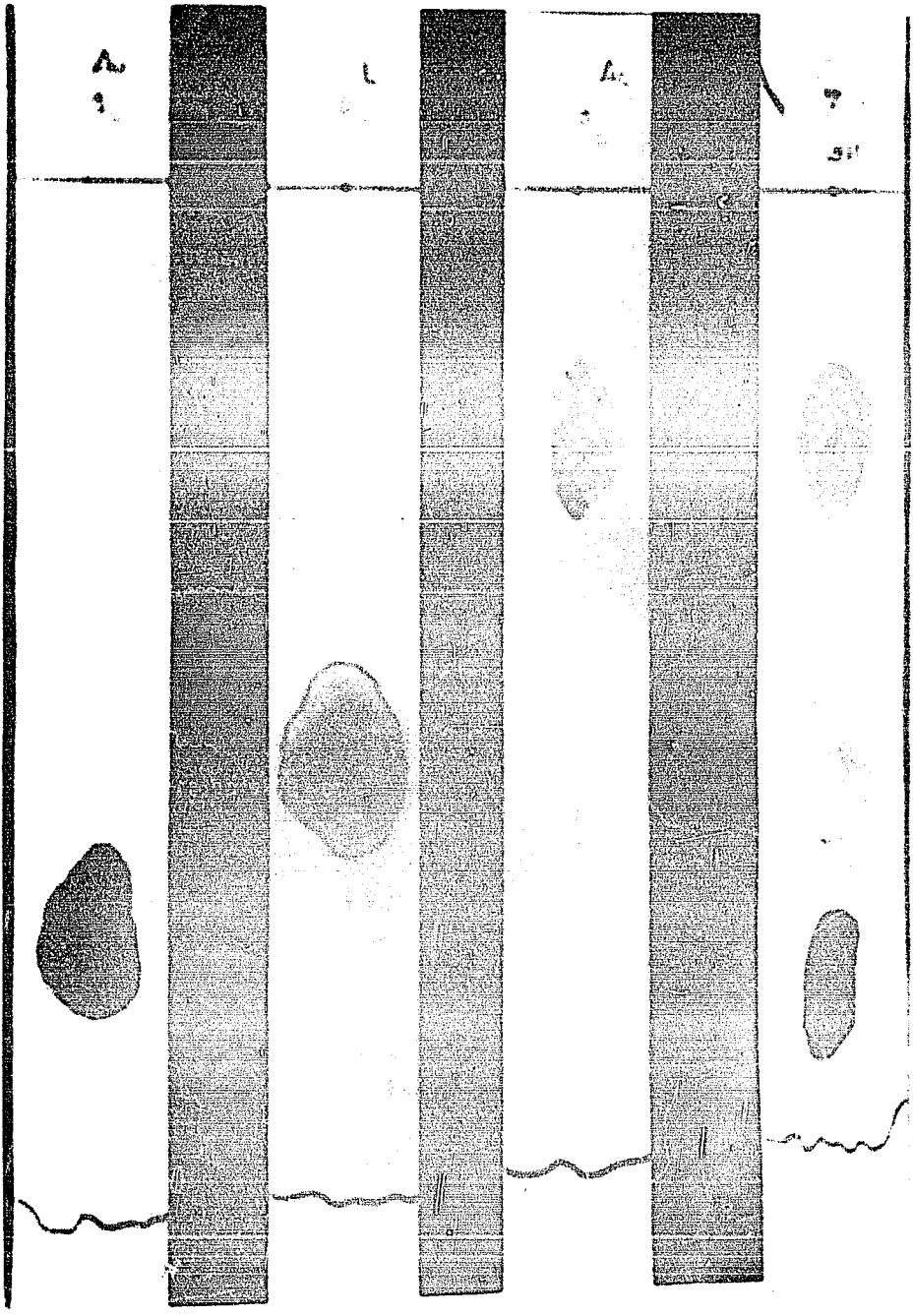


FIGURA N° 1

Conclusiones.

1) En el laboratorio de control de calidad es un problema habitual el detectar la clase de antibiótico o antibióticos que se encuentran presentes en una muestra. La identificación de ellos no está exenta de dificultades técnicas que en nuestro caso se han obviado con el método de C.J. Specialé (33) modificado convenientemente en dos partes:

1. Preparación de la cuchilla de cuchillería, modificación que nos permitió una mejor separación y visualización del antibiótico.
2. Preparación de las tiras de papel filtro, lo cual facilitó la visualización de la línea frontal del disolvente y permitió un cálculo exacto del Rf.

2) En lo que respecta a los resultados tabulados, se ve que éstos son relativamente constantes, sin embargo las diferencias que presentan en los Rf se pueden atribuír a que se trabajó con lotes diferentes, los cuales sabemos contienen cantidades variables de epímeros e isómeros aún no identificados, los que al mezclarse con los antibióticos en estudio modifican su desplazamiento en mayor o menor proporción. Observamos sin embargo que al trabajar sobre el mismo lote las diferencias son menores, lo que nos indica una buena reproductibilidad del procedimiento.

3) El método no exige un equipo muy especializado y puede llevarse a la práctica aún en laboratorios sin grandes-

ocurrido.

b) El tiempo de análisis no excede de 2 horas ya- que el intervalo para desarrollar el cromatograma no requiere - atención personal y representa un gasto mínimo de tiempo compa- rado con el método de Dino y Puck (1).

5) Tomando en consideración que los factores arri- ba mencionados afectan el desarrollo del cromatograma, como mé- todo de precaución debe correrse simultáneamente para cada lí- nea un sistema tipo, lo cual nos permite el que de ocurrir - - cualquier variación en el desarrollo del cromatograma. El pH de las soluciones amortiguadoras se controló cuidadosamente, así - como la saturación de la cámara y se procuró controlar la tempe- ratura, ya que estos factores se consideran determinantes, en - el desarrollo de la operación.

Bibliografía.

1. Bird Jr., H.L. y Ch.F. Pugh Separation of chlortetracycline, tetracycline and oxytetracycline by paper chromatography. Antibiotics and Chemotherapy, 4, 750-2, 1954.
2. Tswett Citado en el 23.
3. Weil H. y T.I. Williams Quantitative paper chromatography of amino acids. Nature, 166, 1090, 1950. Early history of chromatography. Nature, 167, 905, 1951. Early history of chromatography. Nature, 167, 405, 1951.
4. Fernbams J. History of chromatography. Nature, 167, 120, 1951.
5. Kuhn R. y E. Lederer Fraktionierung und Konzentrierung des Carotins. Naturwissenschaften, 19, 306, 1931.
6. Stelcher M. y Stein von Kamienny. Der papier chromatographische Nachweis primärer, sekundärer und tertiärer Alkylamine in Pflanzen. Naturwissenschaften, 40, 483, 1953.
7. Tiselius I.P. Studies on adsorption analysis. C.A. 36, - 3413-5, 1942.
8. Martin A.J.P. y R.L.M Singe A new form of chromatogram - employing two liquid phases. Biochem. J., 35, 1358, 1941.
9. Consden R., A.H. Gordon y A.J.P. Martin Qualitative analysis of proteins a partition chromatographic method using - paper. Biochem. J., 38, 224, 1944.
10. Boyd, Speding y Tompkins Citado en el 23.
11. Lederer M. Anal. Chim. Acta, 2, 261, 1948. Citado por el 23.

12. Anson T.W., F.M. Goodall, C.R. Davies, J.A. Lewis y R.P. Linstead A new method for separation, detection and estimation of inorganic compounds. Nature, 162, 691, 1948.

13. Wase E., Darmstadt A.G., Ed. Chromatographie (with part: Color combination of paper chromatography) Darmstadt, Als manuscr., 1955.

14. Burma D.P. Partition mechanism of paper chromatography - Anal. Chem., 24, 545, 1953.

15. Bockaert R.J. The use of microscopic agents and electrolytes in paper chromatography. Chem. and Ind., 472, 1952.

16. Schöchlin Y. y E. Broda Microchim. Acta, 36/37, 537, 1951. Citado en el 23.

17. Wieland T. y E. Bend Chromatographie and carbonyl papier - Angew. Chem., 64, 418, 1952.

18. Vacket E.C. y B.O. Kenyon The oxidation of cellulose by microbes bioxidz. J.Am.Chem.Soc., 64, 121, 1942.

19. Seber H.A. y E.A.Peterson Chromatography of proteins on cellulose ion-exchangers J.Am.Chem.Soc., 26, 1711, 1954.

20. Hamer C.S. y F.A. Isherwood Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. Nature, 164, 1107, - 1949.

21. Tschesche R., G. Grimmer y F. Seenofen Die quantitative Trennung und Identifizierung von Her Isoflavonfarbstoffen aus digitalis purpurea un Lanata durch "Echte Verteilungschromatographie and papier". Chem. Ber., 86, 1255, 1953.

22. Bate E.C. y R.O. Wetall Chromatographic behaviour and chemical structure. Biochim. Biophys. acta, 4, 427, 1950.

23. Lederer E. y M. Lederer Chromatography a review of principles and applications. The Macmillan Co. Amsterdam, Londres y Nueva York, 1957.

24. Goodman S. y A. Gilman The pharmacological basis of therapeutics. The Macmillan Co. Nueva York, 1955.

25. Fieser L.F. y M.Fieser Organic chemistry. Reinhold. Nueva York, 1956.

26. Waller, Hoychinson et al. Synthesis of degradation products of Aureomycin. J.Am.Chem.Soc., 74, 3710, 4978-4981, 1952.

27. Jenkins G.,W.M. Hartung, E. Hamlin Jr. y J.B. Data The chemistry of organic medicinal products. John Wiley & Sons, - Inc. Nueva York, 1957.

28. Booth, Morton, Petrow, Wilkinson y Williams Tetracycline - J.Am.Chem.Soc., 75, 4621, 1953.

29. Conover, Moreland, Englion, Stephens y Pilgrim Terramycin and Tetracycline. J.Am.Chem.Soc., 75, 4622, 1953.

30. Obol-Farman. United States Dispensatory. J.B. Lippincott Co. Filadelfia y Montreal, 1953.

31. Cook Martin. Remington's practice of pharmacy. Mack Publishing Co. Easton, Pensilvania, 1951.

32. Raimbow C. y H.A. Rose. Biochemistry of industrial Microorganisms. Academic Press, Londres y Nueva York, 1963.

33. Speciale C.J. Comunicación personal.