

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE ALGUNOS  
SOLVENTES PARA LA  
EXTRACCION INDUSTRIAL  
DE LA PENICILINA

TESIS

QUE PRESENTA EL ALUMNO  
CARLOS ALARCON SALIDO  
PARA SU EXAMEN PROFESIONAL  
DE LA CARRERA DE QUÍMICO

MEXICO, D. F.

1949

950



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*A mis padres:*

**SR. JOSÉ ALARCÓN NEGRETE**

**y SRA. MA. IGNACIA SALIDO DE ALARCÓN**

*con gratitud y cariño.*

*Agradezco en todo su valer las facilidades que se me proporcionaron en la PLANTA DE PENICILINA de los Laboratorios E. R. SQUIBB & SONS de MEXICO, S. A., así como la valiosa ayuda del Sr. Q. B. P. Francisco Salgado, del Sr. Dr. J. S. de Frates, del Sr. Q. B. P. Carlos Wild y del Sr. Q. F. B. Manuel Doderó, quienes me permitieron llevar a un feliz término este sencillo trabajo.*

*Con profundo respeto y agradecimiento,  
a los Sres. Profesores:*

ING. Q. RAMÓN MEDELLÍN OSTOS

Q. T. RAFAEL ILLESCAS FRISBIE

Q. MANUEL MADRAZO G.

ING. Q. GUILLERMO CORTINA A.

## INDICE DE CAPITULOS

- I. Introducción.
- II. Generalidades.
- III. Extracción.
- IV. "Primer Paso".
- V. Planteo del Problema.
- VI. Métodos empleados en la experimentación.
- VII. Resultados obtenidos.
- VIII. Conclusiones.
- IX. Bibliografía.

## CAPÍTULO I

### *INTRODUCCION*

La producción de la penicilina en gran escala, por el método de cultivo sumergido, es reciente, y por ello es posible decir que actualmente está en su fase de mejoramientos sucesivos, pues día a día existe la tendencia a la obtención de esta droga en sus máximas formas de actividad y pureza.

Ha sido mi objeto al ejecutar este trabajo en los estudios que he hecho, encontrar algo que aunque no pretenda ser de una gran utilidad inmediata, sí, por lo menos, realizar una serie de experiencias que puedan ser base para investigaciones futuras de un valor realmente práctico para la industria de nuestro país.



**CAPÍTULO II**

***GENERALIDADES***

El éxito de la producción comercial de la penicilina está basado especialmente en dos factores. Uno es la selección de cepas que produzcan mayor cantidad del antibiótico en tiempos más cortos, y el otro es el mejoramiento de los métodos extractivos que permitan un mejor recobro tanto en lo referente a la cantidad como calidad del producto.

Por lo que respecta a los problemas que se tienen durante la producción de la penicilina, fase que se designa generalmente como fermentación, abarcan diversos aspectos, siendo los más importantes la esterilidad de los cultivos, mantener al hongo en condiciones óptimas (temperatura, flujo de aire, sin espuma etc.), a más de conservar las cepas en condiciones adecuadas que eviten la aparición de mutantes inactivos.

Los problemas que se tienen durante la extracción son también de gran importancia, pudiéndose citar como el de mayor atención el de la selección de solventes adecuados, de precio bajo, que permitan su manejo en grandes cantidades y que verifiquen una extracción efectiva de la penicilina, sin destruirla, y que además permitan la purificación del antibiótico por la eliminación de los pigmentos y otras impurezas que lo acompañan. El problema antes citado trae consigo otros de diferentes tipos, como son: emulsiones, solubilidad de unos solventes en otros, etc.

Para el estudio general del proceso industrial, se hará la siguiente división:

1. Selección de cepas activas y preparación de un inóculo adecuado para usarlo en escala industrial.
2. Preparación de los medios de cultivo.
3. Incubación.
4. Cosecha.
5. Extracción.
6. Cristalización.

Aunque en este trabajo me concreté a estudiar algunos problemas del inciso 5, describiré brevemente los demás puntos con el objeto de presentar una visión de conjunto.

1. *Selección de Cepas activas y preparación de un inóculo adecuado para usarlo en escala industrial.*—La primera cepa que se utilizó en la producción de penicilina, como es bien sabido, fué la aislada por Sir Alexander Fleming en 1928, habiendo sido clasificada inicialmente como *Penicillium rubrum* por los micólogos del St. Mary's Hospital, citándosele con ese nombre en las primeras publicaciones. Posteriormente se revisó su clasificación designándosele como *Penicillium notatum*, un hongo muy semejante al *Penicillium Chrysogenum* (penicillum del latín Pincel): la clasificación correcta se debió a Raistrick.

El hongo aislado por Fleming fué el que se utilizó en las primeras experiencias, pero una vez demostrada la utilidad de la penicilina como agente terapéutico, se han aislado gran número de cepas, de las que existen actualmente numerosas variedades, habiéndose seleccionado las más adecuadas para los métodos modernos de producción. A dichas cepas y variedades se les designa generalmente por claves.

Una vez seleccionada una cepa adecuada, se prepara el inóculo generalmente en botellas de blake, ya sea utilizándose un medio líquido como el Czapek-Dox o el Sabouraud, con el objeto de obtener un cultivo en superficie, o un medio con granos vegetales, generalmente trigo, tratándose de obtener una mayor superficie de crecimiento para el hongo y en esa forma asegurar un inóculo más rico en esporas.

Las cepas deben estar bajo perfecto control, ya que, como observó Thom, los caprichos del *Penicillium notatum* son tales, que cultivos sucesivos pasados de laboratorio a laboratorio y aún de investigador a investigador, presentaban una diferencia extraordinaria en su rendimiento.

Esta experiencia condujo a la conclusión de que "a menos que el *Penicillium notatum* sea cultivado con gran cuidado puede perder su valor efectivo en el laboratorio de fermentación". Thom considera que estas diferencias pueden deberse a una constitución metabólica individual, como en los seres humanos, o posiblemente a la existencia de complejos enzimáticos.

2. *Preparación de los medios de cultivo.*—Las fórmulas de los medios de cultivo actualmente en uso varían notablemente de una compañía a otra, siendo además diferentes cuando se usa el método de cultivo en superficie o el sumergido; pero en general son variedades del medio de Czapek-Dox, semisentéticos usados desde 1930 por Raistrick y sus colegas, que con las modificaciones actuales estos medios tienen como ingredientes principales a los siguientes:

1. Agua del cocimiento del maíz.
2. Sacarosa.
3. Nitrato de sodio.
4. Fosfato monopotásico.
5. Sulfato de magnesio.
6. Carbonato de calcio.
7. Aceite de soya.
8. Sulfato de zinc.
9. Agua.

El medio empleado en las plantas que usan el método de cultivo sumergido es preparado en el mismo tanque, así como esterilizado. Estos grandes tanques construídos expresamente deben llenar, como factor de primera importancia, el mantenimiento de la esterilidad del medio tanto antes de la inoculación como después de ella, ya que la entrada

de cualquier otro microorganismo a éstos o a los frascos de cultivo puede ocasionar la pérdida total de la penicilina por acción enzimática (penicilinasas) en muy poco tiempo.

La esterilización del medio se hace generalmente en forma enérgica, a veces hasta  $1\frac{1}{2}$  horas a  $120^{\circ}$  C. y a 20 libras de presión, enfriándosele en seguida lo más rápidamente posible hasta una temperatura favorable para el cultivo ( $+ o - 25^{\circ}$  C.), usándose agua helada o salmuera que pasan por serpentines o chaquetas. La presión interior de los tanques debe procurarse que sea siempre mayor que la atmosférica, con el objeto de evitar la entrada de partículas de polvo o microorganismos del exterior, a través de posibles fugas.

Las transferencias del medio de cultivo o cultivos de un tanque a otro, se hace siempre a través de tuberías que se han esterilizado también en forma enérgica con vapor.

3. *Incubación.*—Para este paso es indispensable considerar las exigencias del hongo; es decir, temperatura óptima para su desarrollo, aereación constante, ya que se trata de un organismo aerobio, agitación continua para favorecer el desarrollo sumergido y una presión mayor a la atmosférica que nos asegure la imposibilidad de que organismos contaminantes se introduzcan al interior del tanque en trabajo.

Para mantener una temperatura lo más constante posible, los tanques están provistos de chaquetas o serpentines por los que circula agua o deja de circular, siendo regulado por medio de controles automáticos. Esta temperatura es mantenida alrededor de  $25^{\circ}$  C. y se ha considerado como la óptima para trabajar bajo las condiciones de nuestro país.

La aereación es hecha por medio de grandes compresoras que mandan el aire a un tanque almacenador; más tarde, en este proceso, el aire pasa a través de unos cilindros metálicos que contienen en su interior lana de vidrio estéril, verificándose una verdadera filtración. De los filtros, el aire pasa al serpentín que se encuentra en la

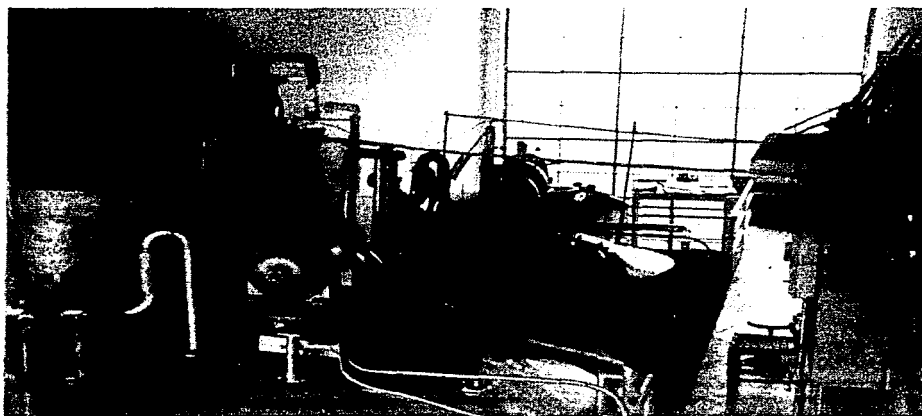
parte inferior del tanque. El volumen de aire utilizado por unidad de tiempo está controlado automáticamente en forma análoga a la temperatura.

La agitación es producida por medio de aspas que están colocadas cerca del fondo del tanque y movidas por motores eléctricos.

La presión se regula manualmente ajustando las válvulas de entrada y salida del aire.

El tanque GERMINADOR es similar al tanque fermentador, y tiene por único objeto permitir el desarrollo de gran cantidad de micelio vegetativo, que se usará como inóculo de los fermentadores, teniendo en cuenta que este último es 10 veces mayor. (Ver la figura del Departamento de Fermentación.)

La inoculación de los germinadores se hace vaciando en condiciones estériles el contenido de una botella de Blake (frascos que presentan una gran superficie para el desarrollo de colonias) con cultivo de *Penicillium*, ya sea en medio líquido o en trigo.



Vista del departamento de fermentación. 1. Tanques germinadores, 2. Tanques fermentadores, 3. Tanque de almacenamiento de caldo rico para tenerlo a bajas temperaturas.

Una vez inoculado el germinador, se espera a que éste tenga un crecimiento de aproximadamente 30 horas, tiempo después del cual se verifica una transferencia completa al tanque fermentador, en donde el tiempo de desarrollo es de alrededor de 50 horas, lapso suficiente para proceder a la cosecha.

- a) BOTELLA DE BLAKE
- ↓
- b) TANQUE GERMINADOR
- ↓
- c) TANQUE FERMENTADOR
- ↓
- d) COSECHA EN EL FILTRO ROTATORIO
- ↓
- e) TANQUE ALMACENADOR

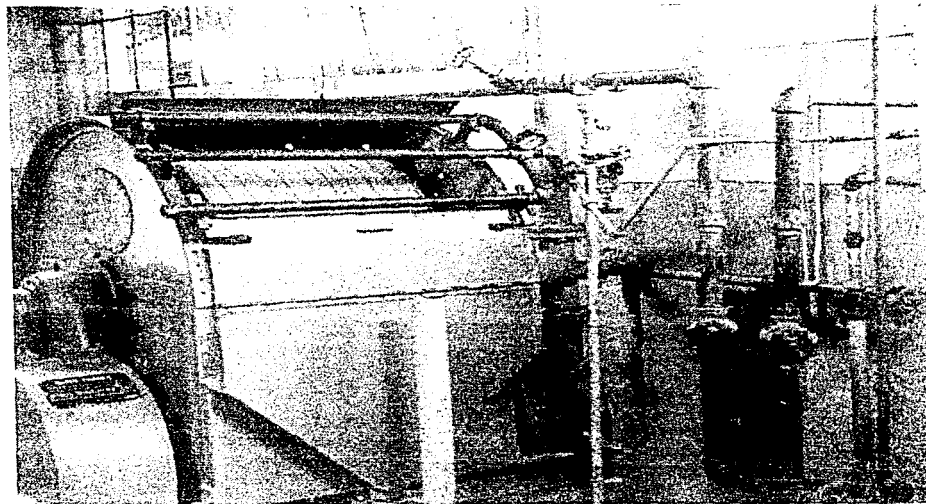
Es necesario hacer notar que generalmente éste es el tiempo de producción, pero estará regido por diversas circunstancias que modifiquen el tiempo que tarda en obtenerse la *máxima potencia*.

Cuando un cultivo es demasiado viejo (80 horas) la potencia decrece considerablemente, motivo por el que es necesario fijar el momento de cosecha de acuerdo con este dato.

La potencia se determina cada 12 horas por medio de pruebas que se verifican en el laboratorio, siendo las principales de rutina: la prueba corta, la prueba de copa y además la prueba de esterilidad que nos indicará la presencia de microorganismos contaminantes.

4. *Cosecha*.—La cosecha consiste en la separación del micelio vegetativo del líquido metabólico al que llaman “caldo rico” y que contiene a la penicilina en solución. Esta operación se verifica en

un filtro rotatorio de gran capacidad (ver figura) o en grandes filtros prensa. El líquido así obtenido pasa a un tanque de almacenamiento, donde se enfría a bajas temperatura:  $5^{\circ}$  C. (tanque de caldo rico), con el objeto de disminuir la destrucción de la penicilina.



Filtro rotatorio en el que el caldo rico es separado del micelio.



## CAPÍTULO III

### *EXTRACCION*

En una Planta de Penicilina, esta operación se hace generalmente en varios pasos; y se llama "extracción" a un conjunto de extracciones sucesivas que tienden a ir disminuyendo de volumen el líquido que contiene a la penicilina hasta llegar a las llamadas "sales", que son soluciones acuosas de sales de los ácidos penicílicos relativamente puras y que se toman como base para las cristalizaciones.

La penicilina está formada en realidad por esas sales, las cuales, cuando son de metales alcalinos como el sodio y el potasio o alcalinotérreas como las de calcio, son muy solubles en agua, pero a pHs bajos; es decir cuando por estar en presencia de ácidos muy disociados dejan de estar bajo forma de sal. Los ácidos penicílicos son mucho más solubles en algunos solventes orgánicos, y basándose en esta propiedad se hacen los diversos sistemas extractivos.

Describiendo en pocas palabras un método de extracción, podemos decir que consiste en hacer pasar la parte activa del caldo rico (ácidos penicílicos) a un solvente orgánico, haciendo esta operación a pH bajo. Los ácidos penicílicos son recobrados tratando la solución orgánica ya sea con una solución de Buffer o agregando agua y ajustando el pH con un álcali hasta un punto cercano a la neutralidad. A la nueva solución acuosa de la penicilina se le trata otra vez con un solvente orgánico a pH bajo y es recobrada en forma análoga hasta que la penicilina haya eliminado en los diversos cambios de solvente a la mayor parte de las impurezas que la acompañan.

Lógicamente una extracción ideal sería aquella en que se utilizara un solo solvente orgánico.

## PROCESO DE EXTRACCION

a) PENICILINA DE LOS FERMENTADORES



b) CALDO RICO (sin micelio)



**Primer Paso**

El caldo rico es tratado con un solvente orgánico y  $H_2SO_4$

c) CALDO GASTADO (drenaje)      d) SOLVENTE RICO (Acido penicílico disuelto)

**Segundo Paso**

d) SOLVENTE ORGANICO RICO  
El caldo rico es tratado con una solución Buffer neutra.

e) SOLVENTE GASTADO (a recuperación)      f) BUFFER RICO

**Salas**

f) BUFFER RICO  
El buffer rico es tratado con un solvente orgánico y  $H_2SO_4$

g) 2o. SOLVENTE RICO      h) BUFFER GASTADO (drenaje)

El 2o. solvente rico es tratado con agua y neutralizado con un álcali.

i) PENICILINA

**CAPÍTULO IV**

***PRIMER PASO***

Una vez obtenido el Caldo Rico (producto de la separación del líquido metabólico del micelio), se hace el llamo "primer paso", que es en realidad la primera extracción que se verifica utilizando un solvente orgánico.

Industrialmente, el Caldo Rico es guardado en un tanque dispuesto adecuadamente para el almacenamiento del líquido a bajas temperaturas; de ahí es transportado por tuberías a un *mezclador*, llegando en forma análoga a este mezclador el ácido sulfúrico diluido y el solvente orgánico.

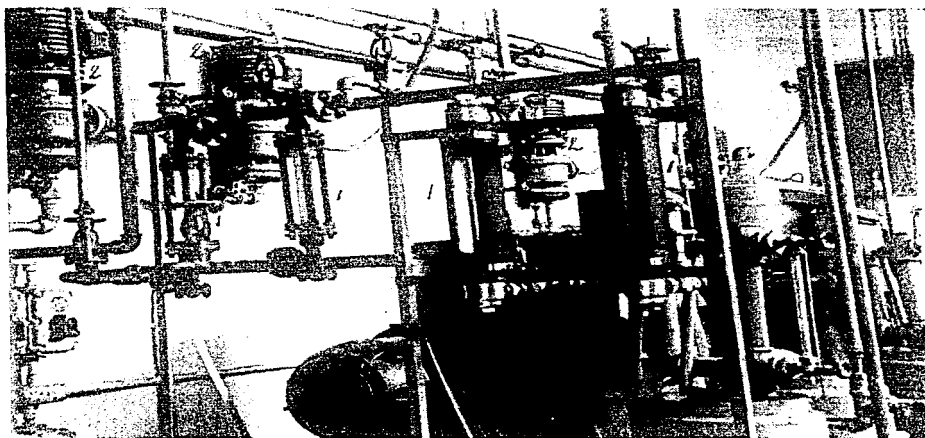
El ácido será el encargado de bajar el pH y el solvente orgánico extraerá los ácidos penicílicos del caldo. Estos procesos están regulados por tres medidores de gasto que permiten controlar el paso en litros por minuto de cada una de las substancias en trabajo. (Ver figura de la sección en donde el primer paso es efectuado.)

Posteriormente la fase acuosa es separada del solvente orgánico por gravedad o centrifugación. Una vez separados los dos líquidos se obtiene por un lado el caldo gastado y por otro el solvente rico, que es colocado en un tanque semejante al almacenador del Caldo Rico, siendo también a baja temperatura para disminuir las pérdidas por destrucción.

El operador debe comprobar que el pH del caldo sea correcto, ya que de esta parte depende el éxito del "primer paso"; para el caso se toman muestras periódicas en las que además se determina potencia. Generalmente las muestras son tomadas cada quince minutos y

comprobadas inmediatamente con un potenciómetro que se encuentra cerca de los medidores de gasto con objeto de corregir inmediatamente cualquier irregularidad.

La operación es correcta cuando se logra agotar el Caldo Rico y además las pérdidas por destrucción son pequeñas.



Vista de la sección en donde el primer paso es efectuado: 1. Medidores de gasto.  
2. Mezcladores.



Vista de una de las centrifugas.

**CAPÍTULO V**

***PLANTEO DEL PROBLEMA***



En el capítulo anterior se especificó que el Caldo Rico por primera vez se pone en contacto con el solvente para proceder a su extracción en el Primer Paso; asimismo se citó al pH como uno de los factores más importantes para efectuar una buena extracción.

1. Se va a tratar de usar otros solventes orgánicos, preguntándose, de los solventes por ensayar: ¿cuáles serán los más adecuados para la extracción de la penicilina?

2. ¿Es realmente el pH un factor determinante en el proceso de extracción?

3. ¿Cuál será el pH adecuado para trabajar con cada uno de los solventes en estudio?

4. ¿Puede ser agotado el Caldo Rico y sin embargo el antibiótico extraído no ser estable en el solvente usado?

## CAPÍTULO VI

### *MÉTODOS EMPLEADOS EN LA EXPERIMENTACION*

Las pruebas que realicé fueron con el objeto exclusivo de determinar la utilidad de algunos solventes y al mismo tiempo fijar el pH óptimo para la extracción. Usé para el estudio que me ocupa los siguientes:

ACETATO DE AMILO  
BENCENO

BUTANOL  
ETER DE PETROLEO

CLOROFORMO

El método utilizado en mi práctica es el que a continuación describo:

a) Tomé 200 c.c. de caldo rico, al que le ajusté el pH, agregándole lentamente ácido sulfúrico q. p. diluído al 1/10 con agua destilada, hasta obtener la acidez deseada.

b) Más tarde añadí 200 c.c. del solvente en prueba.

c) Mezclé el caldo rico con el solvente y lo agité enérgicamente en un embudo de separación durante dos minutos.

d) Dejé reposar el tiempo necesario para obtener una separación clara entre los dos líquidos; este tiempo fué alrededor de 10 minutos casi siempre.

e) Tomé muestras para potencia tanto de la fase acuosa (caldo gastado) como del solvente orgánico rico, en la siguiente forma:

*Caldo gastado.*—Separé un volumen de aproximadamente 60 c.c. y lo neutralicé con bicarbonato de sodio sólido hasta un pH de 6.8-7.0. El líquido neutralizado se distribuyó en tres tubos de ensaye, que se guardaron en el refrigerador y ensayé su potencia por separado.

*Solvente rico.*—Traté un volumen del solvente (10 c.c.) con 25 volúmenes (250 c.c.) de solución Buffer de un pH de 7.4 hecha a base de fosfatos. Esta operación la hice con el objeto de extraer el solvente con el Buffer, ya que las técnicas que se usan en el cuanteo de la penicilina requieren que ésta se encuentre en solución acuosa. Usé una relación de 1 a 25 con el objeto de asegurarme de que la totalidad de la penicilina se encontraba en la fase acuosa. De esta fase acuosa tomé tres muestras que también ensayé por separado.

f) Los pH a que hice las extracciones fueron los siguientes: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.00, excepto el acetato de amilo que se hizo a 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0.

g) Todas las experiencias las hice a temperaturas lo más bajas posible, nunca superiores a 10°. C.

h) Las diferentes muestras las ensayé usando la prueba de copa, técnica que a continuación describo:

#### PRUEBA DE COPA CON ESTAFILOCOCOS

*Preparación de las placas.*—El medio de cultivo empleado se compone de Agar, Extracto de carne y Levaduras deshidratadas; prefiriéndose usar el de la casa Difco, que para el caso de titulaciones de penicilina tiene la fórmula preparada y lista para proceder.

Se pesa en matraces secos un día antes de usarse, los que son puestos en el refrigerador y sacados hasta la mañana siguiente cuando se les agrega agua destilada y se agitan. Más tarde se colocan en el autoclave a 20 libras durante 30 minutos, y las cajas Petri, limpias y estériles, se llenan con 10 c.c. del agar tan caliente como sea posible manejarlo; verificándose esta operación estando las cajas en un lugar plano hasta que el medio se haya endurecido, después de lo cual se meten tres cuartos de hora en la estufa a 37° C.

Como paso siguiente, se hierve un termómetro durante 10 minutos y se coloca en alcohol de 95%, dejándolo ahí durante toda la noche, manejándolo después con unas pinzas estériles se toma la temperatura

del agar para obtener con un dispositivo de agua corriente una temperatura de 45° C., procediéndose entonces a inocularlo con un cultivo de estafilococos. El cultivo usado es controlado por titulaciones y es generalmente de 2 c.c. por cada 100 c.c. de medio; este conjunto es mantenido a 45° C. poniendo el matraz en un baño de maría.

Al hacer la inoculación a las cajas Petri, se emplean 4 c.c. del inóculo por caja: usando para el caso una máquina llenadora automática. Rotando cuidadosamente las cajas, se distribuye lo mejor posible el inóculo, el que más tarde se coloca en un lugar plano para que solidifique.

Por último, para la preparación de estas placas, se espera durante 15 minutos para poner los cilindros de acero inoxidable, los que tienen 9 mm. de altura por 5.3 mm. de diámetro interior. Antes de usarse se lavan, se hierven varias veces, se enjuagan con agua destilada, se meten en el autoclave durante  $\frac{3}{4}$  de hora a 15 libras, se secan a 148° C. durante 2 horas y se enfrían. Se pone el dispositivo colorador, que generalmente es de cobre, y ya con las distancias horadadas sobre la placa y los cilindros en esta forma son puestos en su lugar.

Las cajas, con su medio inoculado y con los cilindros de acero inoxidable o de vidrio en sitio, se guardan en el refrigerador quedando en esta forma ya listas para su uso en un momento dado.

*Preparación del cultivo.*—Para el objeto se usa el estafilococo aureus, cuya cepa es la P-209, que se mantiene en agar compuesto de levadura y extracto de carne. Una vez al mes, este inóculo es transferido, incubándolo después 16 horas a 37° C. y almacenado a 4° C.

Para la prueba de copa se hace un cultivo de 16 horas a 37° C. cada viernes de la semana, trasladándolo a caldo de peptona y levadura y usando para cada 200 ml. de éste un ml. del inóculo; el sábado se hacen diluciones en agar al 1/100 y 2/100 en series de 6 cajas para cada dilución; del Standard se coloca una serie de diluciones en estas placas y aquella que dé zonas de 15 a 17 mm. para 0.25

unidades y 27 a 28 mm. para 4 unidades es la que se usa durante la siguiente semana como inóculo para las cajas de prueba.

*Técnica de prueba.*—DILUCIONES: Estas son hechas con Buffer estéril al 1.63% de fosfato para que dé esta solución un pH de 6.0.

Las diluciones deben calcularse en tal forma, que den entre 0.5 y 1 unidad por ml.

Las pipetas se limpian exteriormente con gasa estéril para impedir que algunas partículas lleguen al tubo de dilución (tubo de ensaye en el que el Buffer y la muestra se agregan en proporciones adecuadas para dar la dilución deseada). Las pipetas usadas para el objeto son serológicas, y como están calibradas especialmente, su manipulación es delicada, motivo por el que no deben de soplarse; asimismo deben de sumergirse en el líquido tres veces antes de chupar, procurando no sumergirlas completamente sino únicamente la punta.

Para medir cantidades de 0.1 ml. se usan pipetas de Kahn de 0.2 ml.; en todas las otras diluciones se usan las serológicas exceptuando la medición de 0.5 y 1.0 de los standards, los que se miden con pipetas volumétricas.

*Llenado de copas.*—Una jeringa conectada a un tubo de hule y éste a un tubo de vidrio de cuatro pulgadas terminado en punta fina, es lo que se usa para llenar las copas. El émbolo de la jeringa se lubrica con un producto llamado Lubriseal. Para llenar las copas, las pipetas deben ser insertadas en el interior de éstas hasta que toquen el agar para evitar que se formen burbujas de aire que podrían impedir el poder de difusión de la solución de penicilina. Es esencial que las copas sean llenadas uniformemente hasta su capacidad, va que pequeñas diferencias en su volumen podrían dar como resultado grandes variaciones en el tamaño de las zonas, por lo que debe procurarse que el menisco toque la parte superior de estas copas. Antes de volver a usar la jeringa, la punta del tubo de vidrio debe ser limpiada con ácido, enjuagada con agua destilada y esterilizada.

Dependiendo del grado de exactitud se requieren cuatro, cinco o más cajas Petri para cada serie de cinco diluciones y éstas deben

ser calculadas en tal forma que den entre 0.5 y 1.0 unidades Standard por ml. Ejemplo: si se sospecha que la potencia de una cantidad de penicilina sea de 300 unidades por ml., la primera dilución se hará en una proporción de 1 ml. por 299 de Buffer para obtener en esta forma una aproximación de una unidad por ml., la segunda de 1:400, la otra de 1:500, una más de 1:600.

Las placas se incuban en la estufa a 37° C. de 14 a 18 horas.

Para la prueba de copa de rutina se usan dos standards: Uno consiste en cristales de penicilina sódica G de 1667 unidades por miligramo y otro en sal cálcica Squibb 3285 de 470 unidades por miligramo. El standard sódico se pesa cada dos semanas en una microbalanza y se disuelve en agua tridestilada para obtener 100 gammas por ml. Esta solución se conserva en ampulas previamente limpiadas con ácido, guardando el conjunto en el congelador a 4° C. Se usa una diariamente.

Para preparar los standards de sal cálcica, ésta debe ser conservada seca en ampulas de vidrio selladas y colocadas en un desecador a 4° C. Se pesan 15 a 20 miligramos en una balanza analítica y se disuelven en agua tridestilada hasta tener una concentración de 47 unidades por ml. Los tipos se diluyen en el mismo Buffer fosfado que se va a usar para hacer las diluciones de los problemas.

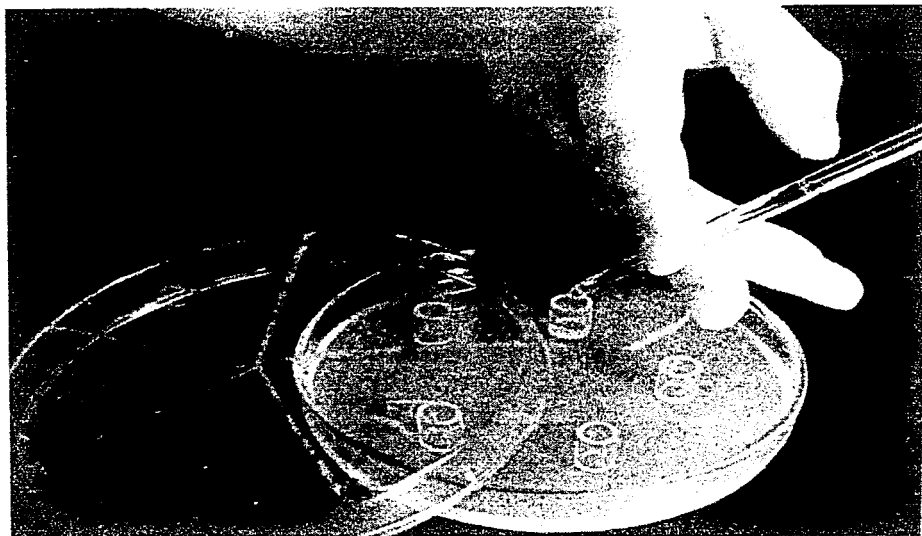
Es necesario tener en cuenta que las muestras deben ser suficientes para formar seis series de 5 diluciones cada una.

La posición de la copa número 1. debe ser marcada en la caja Petri con un lápiz graso, debiendo llenar las otras en el sentido de las manecillas del reloj. La 5a. copa deberá tener siempre el standard.

Las cajas que van a ser usadas se ponen abiertas enfrente del llenador; si las diluciones van a ser llevadas a cabo en 4 cajas, 4 serán las que estén enfrente del llenador, y las tapas de estas cajas se marcarán con lápiz graso (6a, 6b, 6c...) para indicar en esto que se trata de la sexta serie copa a, b, c.

La copa número 1 a será la primera en llenarse, la b después, y

así sucesivamente en cada placa. Las lecturas se harán en el mismo orden: para ello, se leen los diámetros de las zonas por medio de un contador de colonias tipo Quebec, equipado con escala milimétrica. (Ver figuras correspondientes.)



La copa número 1 será la primera en llenarse, la 2 después y así sucesivamente en cada placa.





Lecturas: los diámetros de las zonas se leen con un contador de colonias de tipo Quebec equipado con una escala milimétrica.

Los problemas se miden en la escala más cercana al  $\frac{1}{2}$  milímetro, no así los tipos, que se leen en la escala más cercana a 0.2 milímetros. El paralaje se evita haciendo las lecturas en la sombra que proyecta el calibrador en el agar. (Cada serie de cajas debe ser leída por la misma persona para evitar en lo posible errores ópticos.)

Las copas deben ser quitadas antes de hacer las lecturas volteando rápidamente la caja. Los derrames pueden ser observados fácilmente por las irregularidades en los límites de la zona; asimismo si se observa que hay pequeñas gotas en el exterior de las copas es seguro que hubo un derrame.

*Cálculo de la potencia.*—Para esto se usa papel semilogarítmico, colocando en el eje de las abscisas las *lecturas en milímetros* de las diferentes zonas *leídas en los tipos*, y en el eje de las ordenadas la potencia en unidades de las varias *diluciones* de los mismos y que son del entendimiento de uno al usar los standards de potencia conocida. En igual forma se procederá con los problemas. Haciendo hincapié que una vez obtenidos los resultados en la gráfica de estos últimos, será necesario multiplicarlos por su dilución, eliminando aquellos que varíen en un 10% o más.

Si tenemos como resultado de la gráfica una línea recta en el papel semilogarítmico comprobaremos que el medio y el cultivo fueron satisfactorios. Del conjunto de lecturas se hace un promedio, obteniéndose de esta manera la potencia final.

CAPÍTULO VII

*RESULTADOS OBTENIDOS*

Los resultados por mí obtenidos, aunque tienen valor práctico, no pueden tomarse como datos absolutos, ya que para poderlos aceptar en este último sentido, deben de ser repetidas las experiencias varias veces y en condiciones diferentes, con el objeto de comprobar la eficacia o ineficacia de algún solvente en particular, ya que probablemente los resultados varíen debido a la diversidad de cargas en el tanque; es decir, en las experiencias realizadas usé muestras de tanques de potencia media, pero debe tenerse en cuenta que posiblemente los resultados difieran grandemente unos de otros al usar muestras de tanques de potencia notable, o de aquellos de mínimo rendimiento; en una forma u otra el trabajo hecho me ha conducido a conclusiones finales que discuto en el penúltimo capítulo.

Los datos obtenidos en las diversas experiencias son los siguientes:

Experimento N° 1.—SOLVENTE: Acetato de amilo q. p.  
 pH del caldo rico: 6.6  
 Potencia del caldo rico: 260 uO / c.c.

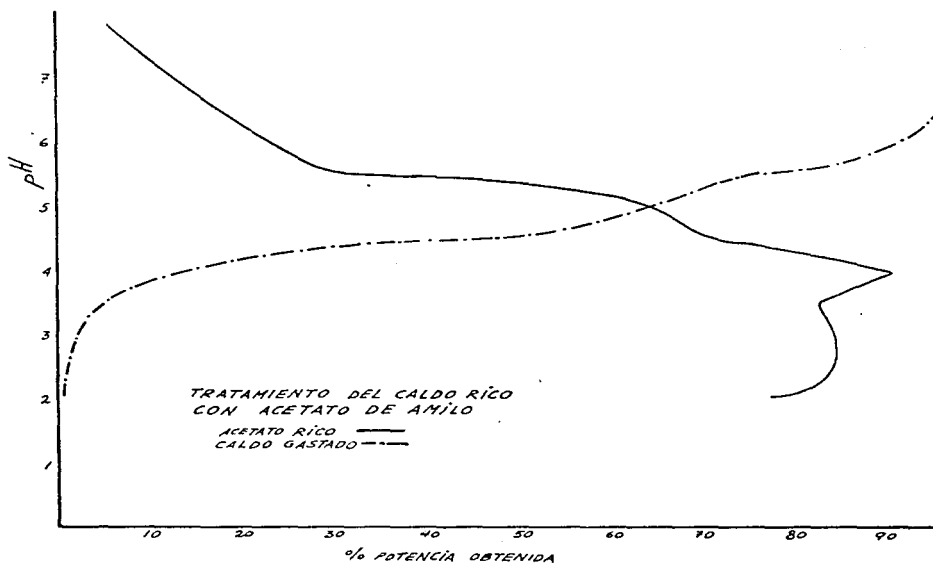
#### CALDO GASTADO

Nombre de muestra	pH	Resultado final de la potencia en prueba de copa
A- 1	6.5	250 uO / c.c.
A- 2	6.0	238 " "
A- 3	5.5	190 " "
A- 4	5.0	171 " "
A- 5	4.5	114 " "
A- 6	4.0	39.7 " "
A- 7	3.5	13.9 " "
A- 8	3.0	6.85 " "
A- 9	2.5	3.7 " "
A-10	2.0	1.83 " "

### ACETATO RICO

A-11	6.5	47.5	uO / c.c.
A-12	6.0	59.25	" "
A-13	5.5	77.25	" "
A-14	5.0	170.0	" "
A-15	4.5	182.5	" "
A-16	4.0	235.5	" "
A-17	3.5	215.0	" "
A-18	3.0	220.0	" "
A-19	2.5	218.75	" "
A-20	2.0	200.25	" "

(Cada una de las muestras se tomó por triplicado)



Experimento N° 2.—SOLVENTE: *Eter de petróleo*

pH del caldo rico: 6.8.

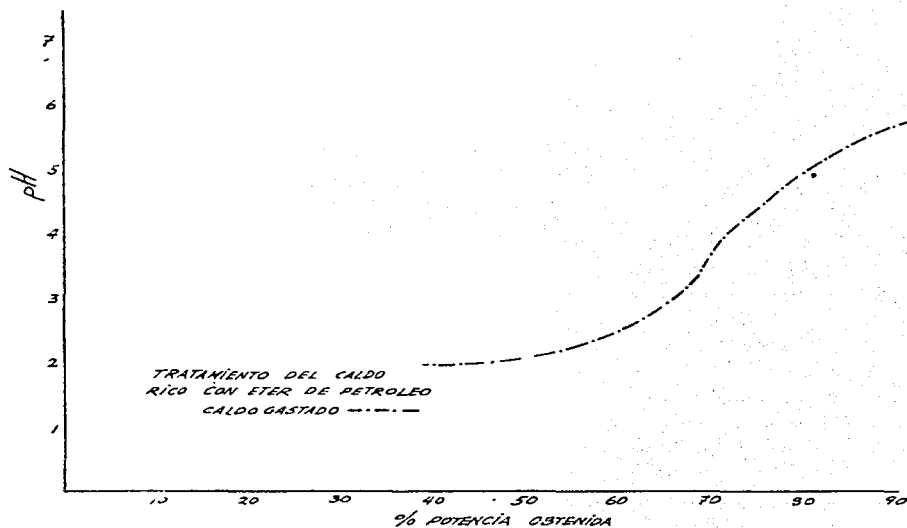
Potencia del caldo rico: 250 uO / c.c.

**CALDO GASTADO**

Nombre de muestra	pH	Resultado final de la potencia en prueba de copa uO / c.c.
A-21	2	98
A-22	3	165
A-23	4	180
A-24	5	204
A-25	6	243

**ETER RICO**

A-26	2	No dió zonas
A-27	3	" " "
A-28	4	" " "
A-29	5	" " "
A-30	6	" " "



Experimento N° 3.—SOLVENTE: Cloroformo.

pH del caldo rico: 6.3.

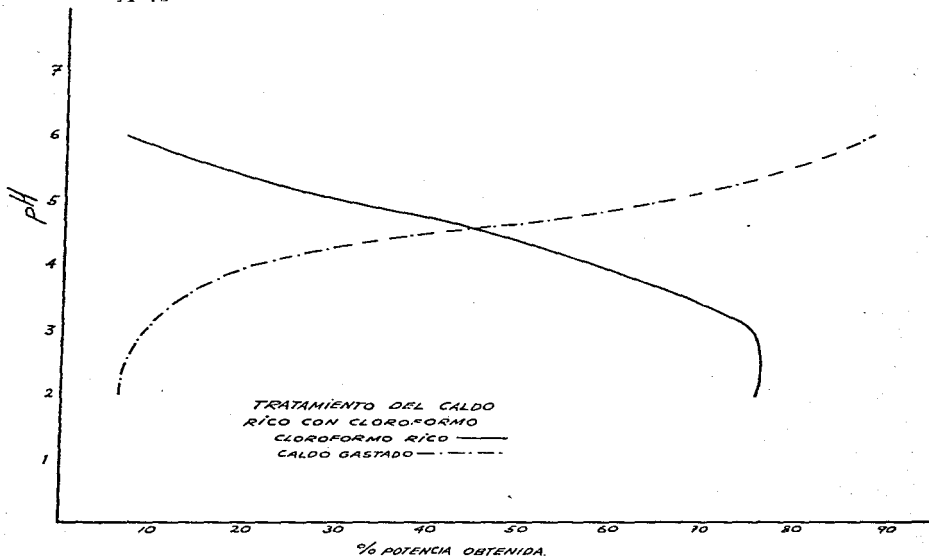
Potencia del caldo rico: 270 uO / c.c.

**CALDO GASTADO**

Nombre de muestra	pH	Resultado final de la potencia en prueba de copa
A-31	2	18.2 uO / c.c.
A-32	3	24.5 .. ..
A-33	4	58.9 .. ..
A-34	5	176.2 .. ..
A-35	6	235.0 .. ..

**CLOROFORMO RICO**

A-36	2	203.75 uO / c.c.
A-37	3	203.75 .. ..
A-38	4	155.0 .. ..
A-39	5	81.25 .. ..
A-40	6	18.75 .. ..



Experimento N° 4.—SOLVENTE: Butanol.

pH del caldo rico: 9

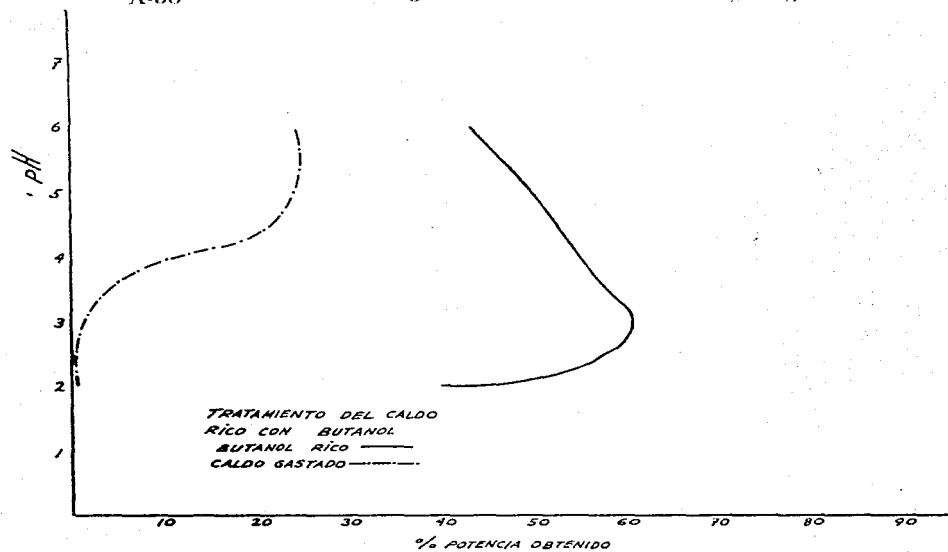
Potencia del caldo rico: 248 uO / c.c.

CALDO GASTADO

Nombre de muestra	pH	Resultado final de la potencia en prueba de copa
A-41	2	1.8 uO / c.c.
A-42	3	2.7 " "
A-43	4	30.0 " "
A-44	5	61.5 " "
A-45	6	61.0 " "

BUTANOL RICO

A-46	2	100.0 uO / c.c.
A-47	3	152.5 " "
A-48	4	135.0 " "
A-49	5	125.0 " "
A-50	6	107.5 " "





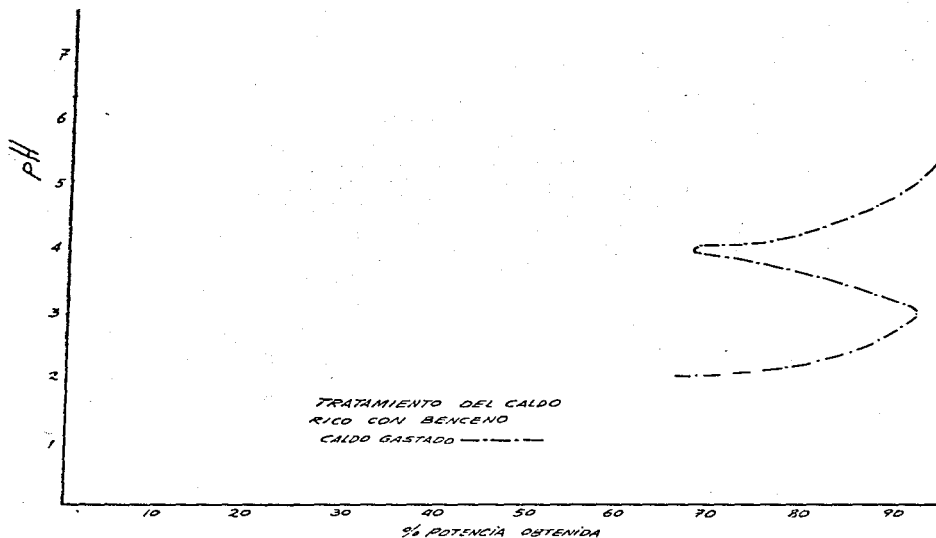
Experimento N° 5.—SOLVENTE: *Benceno*  
 pH del caldo rico: 6.85  
 Potencia del caldo rico: 310 uO / c.c.

CALDO GASTADO

Nombre de muestra	pH	Resultado final de la potencia en prueba de copa uO / c.c.
A-51	2	205
A-52	3	285
A-53	4	210
A-54	5	283
A-55	6	297

BENCENO RICO

A-56	2	No dió zonas
A-57	3	" " "
A-58	4	" " "
A-59	5	" " "
A-60	6	" " "



**CAPÍTULO VIII**

***CONCLUSIONES***

a) De los resultados obtenidos en mi trabajo se puede deducir que hay gran número de solventes que se pueden utilizar para la extracción de la penicilina.

b) El pH a que los diversos solventes tienen su máxima actividad extractiva varía de uno a otro.

c) Un control constante sobre el pH a que se efectúa la extracción es de primerísima importancia, ya que la efectividad de los solventes varía notablemente con éste.

d) Algunos solventes orgánicos tienen la propiedad de extraer la penicilina, siendo ésta destruída en su seno muy rápidamente, o es el mismo solvente el que la destruye.

e) No todos los solventes orgánicos son utilizables en la extracción de la penicilina, ya que su capacidad extractiva es variable y algunos ocasionan la destrucción del antibiótico por mecanismos que me son desconocidos.

CAPÍTULO IX

*BIBLIOGRAFIA*

1. Fleming A.: "Penicillin". Its Practical Applications. Blakiston Co. Philadelphia, 1946.
2. Thom C., Mold Research and Medicine, Oil Paint & Drug Reporter, pgs. 7, 50-56, Enero 3, 1944.
3. "Penicilina". Revisión sobre los estudios actuales; Abbott Laboratories International Co., págs. 45-50, 1946.
4. Clutterbuck, P. W., Lovel R., Raistrick.: Biochemical Journal, p. 26, 1932.
5. Coghill R. D.: Chemical & Engineer News. 22. p. 588, 1944.
6. Heatley, N. G.: Biochemical Journal, XXXVIII, p. 61, 1944.
7. *Federal Register*, p. 2217, abril 3 de 1947.
8. Abraham E. P. & Chain E.: "Nature", London; vol. 146. p. 837, 1940.
9. "Science". Vol. 102, pgs. 627-629. Dic. 21, 1945.