



FACULTAD DE QUIMICA

U. N. A. M.

PRODUCCION Y VALORACION DE LA  
PENICILINASA EN EL LABORATORIO

TESIS PROFESIONAL

CORITA LOJESTO MARTINEZ GARCIA

México, D. F.

1966

00006



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.

**U. N. A. M.**

**Facultad de Química**

**PRODUCCION Y VALORACION DE LA  
PENICILINASA EN EL LABORATORIO**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**p r e s e n t a**

**CORITA OJESTO MARTINEZ GARCIA**

**México, D. F.**

**1966**

A mis padres de quienes  
he recibido todo con mi  
cariño y admiración.

A mis hermanos, hermano  
político y sobrinos.

A toda mi familia.

Este trabajo se efectuó en  
Laboratorios Grossman, S. A.  
Agradeciendo a su Gerente Sr.  
Eduardo Grossman Z., la oportu  
nidad que me brindó.

A la Srta. Q. F. B. Luzmaría Balderas V.  
Por quien fué posible la realización de  
este trabajo.

A mis compañeros y compañeras de trabajo.

A todos mis maestros en especial a la  
Sra. Etelvina M. de Jaimes con agradeci  
miento.

A la Srita. Q. F. B. Rosalba Cruz D.  
Por su valiosa ayuda.

Al Sr. Ing. Quím. Javier R. Higuera.

A mis compañeros y amigos.

## INDICE.

INTRODUCCION . . . . .	1
GENERALIDADES . . . . .	2
PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	16
RESUMEN . . . . .	35
CONCLUSIONES . . . . .	37
BIBLIOGRAFIA . . . . .	39

## I N T R O D U C C I O N .

Como la enzima penicilinasasa es indispensable para llevar a cabo la prueba de esterilidad de productos farmacéuticos inyectables con contenidos de penicilina y, atendiendo a las limitaciones impuestas a tal prueba - provocadas por la escasez de esta enzima en el mercado, se pensó en la posibilidad de producirla en el mismo laboratorio, para poder así, disponer de la cantidad necesaria para llevar a cabo la prueba, sin estar supeditados a factores ajenos.

La finalidad de este trabajo se concreta a la producción, en el laboratorio, de la enzima penicilinasasa y sus controles de esterilidad y potencia.

## G E N E R A L I D A D E S .

En 1940, se observó (1) que en los cultivos de Escherichia coli y de otros microorganismos, existía una sustancia con la propiedad de inactivar la acción antibiótica de la penicilina. Esta sustancia no aparecía libre en el medio de cultivo, si no que era necesario desintegrar las células en un molino bacteriano para ser liberada. A dicha sustancia se le llamó penicilinasas por tener las propiedades de una enzima.

Actualmente se emplea el término penicilinasas, al referirse a toda enzima cuyo substrato es la penicilina, obteniéndose como resultado de la reacción, la inactivación del antibiótico.

Florey y colaboradores establecieron que muchas bacterias tenían la propiedad de producir penicilinasas y que ésta podía ser intra o extracelular (1, 12).

La penicilinasas la sintetizan muchos microorganismos, ya sean insensibles o sensibles a la penicilina.

El poder para destruir la penicilina se encuen-

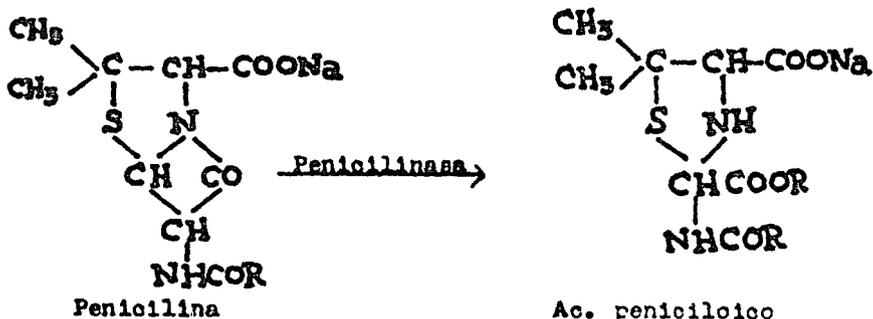
tra con frecuencia entre las bacterias, levaduras y hongos; sin embargo, las que más sobresalen a este respecto, son las bacterias formadoras de esporas (34).

Las penicilinasas sintetizadas por los diferentes microorganismos tienen propiedades diferentes.

Entre las bacterias esporuladas que mayor cantidad de exoenzima forman, pueden citarse Bacillus subtilis (32), Bacillus mesentericus (10) y Bacillus cereus (26).

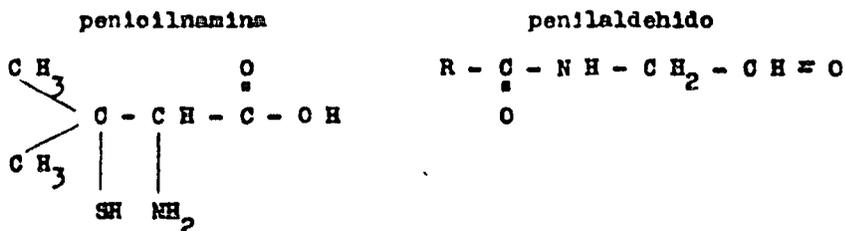
La penicilinasasa cataliza la hidrólisis de la unión peptídica en el anillo lactámico de la molécula de la penicilina.

Por los estudios concernientes a la acción de la enzima sobre la penicilina, se descubrió la formación de un nuevo grupo ácido (5, 2, 13), demostrándose que el producto de la reacción de inactivación era el ácido peniciloico.



(R en la  $\Delta^2$  pentenilpenicilina o penicilina F es  $C_5 H_9$ ; y en la bencilpenicilina, penicilina G, es  $C_7 H_7$ ).

El producto de la reacción de la penicilina F con la penicilinasasa, es insoluble en disolventes orgánicos - no polares y se descompone con cloruro mercúrico en solución acuosa en:

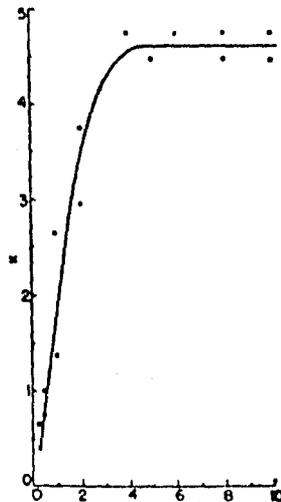


y dióxido de carbono (2).

La penicilina tiene un grupo ácido de pK 2.9. El ácido peniciloico, tiene dos grupos ácido fuertes y un átomo de nitrógeno débilmente básico en el anillo de la tiazolidina (3, 25). Durante la inactivación de la sal sódica de la penicilina con la penicilinasasa, se libera un grupo ácido fuerte y un grupo básico débil. Debido - al pK bajo, del grupo básico, se absorbe un equivalente al álcali para mantener la neutralidad de la solución.

Se ha encontrado que cuando actúa la penicilinasasa sobre la penicilina G cristalina, puede titularse un - nuevo grupo de pK 4.7 (5), cercano al pK del átomo de - nitrógeno básico, en el ácido bencilpeniciloico.

La inactivación de la penicilina catalizada por la penicilinasasa de Bacillus cereus, es una reacción de orden cero en presencia de un exceso de sustrato. La medida de la velocidad de reacción ( $k$ ) en presencia de cantidades constantes de penicilina ( $P$ ) demuestra que existe una relación lineal entre el log de  $k$  y el log de  $P$  hasta que el sustrato se empieza a saturar con la enzima; en este punto, es cuando la velocidad de reacción alcanza su máximo. Si lo que varía es la concentración de penicilina y la penicilinasasa permanece constante, la velocidad ( $k$ ) cambia como se muestra en la figura 1 (16, 3). La curva obtenida es la típica de las reacciones enzimáticas cuando varía la concentración del sustrato.



Unidades de penicilina.

Figura 1.- Actividad de penicilinasasa a diferentes concentraciones de sustrato.

Se ha calculado que el coeficiente de temperatura de la reacción a pH 7 es de 1.56 y la energía de activación - aparente es de  $7460 \pm 750$  calorías, por mole (16).

La penicilinasasa en general, muestra su máxima actividad a un pH cercano a la neutralidad.

Se informó que la penicilinasasa extracelular de una - de las variedades de Bacillus cereus, tiene su máxima actividad a pH 7, siendo así, doble de activa que a pH 5 y - veinte veces más activa que a pH 5 (1), lo que demuestra - que la actividad de la penicilinasasa varía también de acuerdo con el pH al que se desarrolle la reacción.

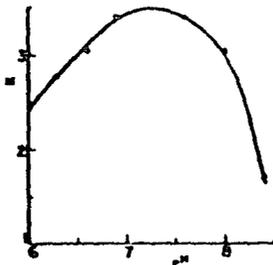


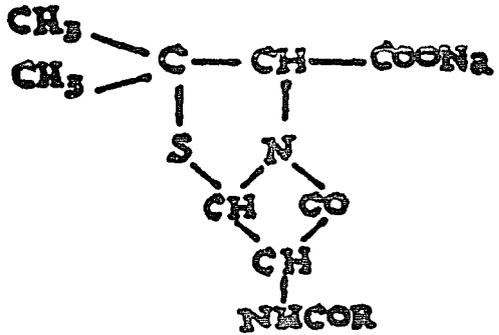
Figura 2.- Efecto del pH en la actividad de la penicilinasasa.

La temperatura óptima de actividad, para la penicilinasasa de Bacillus cereus, es de  $36^{\circ}$  C (16).

La penicilinasasa es capaz de inactivar a algunas peni

cilinas naturales biosintéticas. Estas penicilinas difieren solamente en su cadena lateral (R). La penicilinasasa de Bacillus cereus inactiva a las penicilinas, según de la que se trate, a velocidades diferentes.

La penicilinasasa se comporta como una peptidasa, - con acción restringida a la hidrólisis de un tipo especial de anillo lactámico, pues la penicilina contiene - un sistema de anillos beta-lactámico y de tiazolidina - unidos, como se ve en la fórmula a continuación:



La penicilinasasa se inactiva fácilmente por diferentes factores, aún cuando los informes a este respecto son variables.

INACTIVACION POR CALOR.

Hay muchos informes sobre la estabilidad de la penicilinasasa sometida a la acción del calor. Parece que - la mayoría de las penicilinasasas, ya sean extra o intracelulares, se inactivan por la acción del calor en su

lución acuosa.

La penicilinasasa extracelular producida por diferentes clases del género Bacillus, se inactiva rápidamente a 100° C. Se trató de protegerla agregándole - - sustancias con alto peso molecular, observándose que tiene un efecto limitado en la termoestabilidad de las preparaciones enzimáticas (22).

Benedict y colaboradores, encontraron que se destruye más del 50 % de actividad sometiendo la enzima a la acción del calor durante 30 minutos, a 60° C, en - amortiguador, regulador a pH 7 (5).

En solución acuosa la enzima es más estable a - pH cercano a 7.

La penicilinasasa de Bacillus cereus no se inactiva por la acción de venenos enzimáticos, como son el ácido yndoaóptico y la azida de sodio (16).

De igual modo, a la penicilinasasa procedente de Bacillus cereus, no le afectan el fluoruro de sodio, cianuro de potasio, dietil-tiocarbamato, etil-uretano, sulfadiazina sódica, formaldehído y tioglicolato de sodio. Se concluye que esta enzima no tiene los grupos sulfhidrilo o amino libres necesarios para que no lleve a -

cabo la inactivación de la enzima por estas sustancias. Tampoco tiene grupo prostético que contenga hierro o cobre (16).

La enzima de Bacillus cereus, se inactiva en un 65 % por la acción de 25 gamas/ml de iones cálcicos y - en un 95 % con 50 gamas/ml de iones férricos (16).

Duthie indicó que la penicilinasas, procedente de varias fuentes, se inactiva al precipitarse con acetona o alcohol a temperatura ambiente. También se inactiva al tratarla con dioxano o acetato de amilo (34,23).

Su actividad puede ser inhibida por compuestos - estructuralmente relacionados a una porción de la molécula de penicilina (4).

La inactivación de la penicilinasas se acelera en presencia de substratos análogos, (tienen igual el núcleo de la penicilina, ácido 6-aminopenicilánico, pero difieren en las cadenas laterales que imparten un alto grado de resistencia a la acción de la penicilinasas), a diferencia de los substratos (penicilinas, cuyas cadenas laterales substituidas varias veces aumentan la acción enzimática) (8).

Se encontró que la actividad de la penicilinasas -

en medio líquido de tioglicolato (que contenía 0.05 % de tioglicolato de sodio), es 15 % mayor que en agua destilada (6).

La penicilinasa producida por Bacillus cereus, cuando se dializa, a través de membranas de celofán, pierde su actividad (16), posiblemente debido a la adsorción en el celofán.

Se ha visto que no todas las preparaciones de penicilinasa pueden filtrarse a través de filtros de tipo Seitz, porque pierden gran parte de su actividad (7).

La determinación del peso molecular de la enzima producida por Bacillus cereus, dió como resultado un peso molecular de 56 000.

Entre los agentes precipitantes de la penicilinasa de Bacillus cereus, que pueden usarse para su purificación, se encuentran: sulfato de amonio (que la precipita al 70 % de saturación) (24), acetona (27) y etanol (28).

La enzima producida por Bacillus cereus, se adsorbe en alúmina (20) y polvo de vidrio (19). La propiedad de ser adsorbida también se usa para la purificación de las preparaciones enzimáticas.

Hasta el año de 1951, a pesar de haberse descubierto la penicilinasa en 1940, no se había establecido una unidad de penicilinasa que fuera de uso general. Las mediciones de la actividad se hacían midiendo las mínimas cantidades de enzima requeridas para destruir una cantidad determinada de penicilina, bajo ciertas condiciones arbitrarias, obteniéndose así, diferentes unidades de penicilinasa que no eran intercambiables.

En la actualidad, se aceptan las unidades de Levy (21) y las de Kersey (17).

Para la medición de la actividad enzimática de la penicilinasa, existen varios métodos, entre los que se encuentran:

#### 1. METODOS BIOLOGICOS.

En la mayoría de los métodos descritos en la literatura al respecto, se deja que la enzima actúe sobre la penicilina durante un tiempo determinado y la cantidad de - penicilina residual se valoriza por su efecto sobre el - crecimiento de microorganismos sensibles a ella.

La reacción enzimática puede detenerse calentando - la mezcla antes de cuantificar la penicilina remanente (1, 6). Filtrando la penicilina se obtiene el mismo resulta-

do cuando la penicilinasasa se encuentra dentro de las células (14).

Otro método para detener la reacción, es por extracción de la penicilina residual, de la mezcla de reacción con disolventes orgánicos.

La penicilina activa residual puede cuantificarse por el método de dilución en tubo. Se hacen diluciones decrecientes de la penicilinasasa, que se agregan a tubos con medio de cultivo conteniendo una cantidad constante de penicilina; se deja actuar la enzima durante un tiempo determinado; se inactiva; se inocula cada tubo con organismos sensibles a la penicilina; se incuban durante la noche a 36-37° C y se ve el tubo en el que se encuentra la dilución mayor de penicilinasasa que permite el desarrollo del microorganismo. Los microorganismos utilizados para esta clase de ensayo, han sido Staphylococcus aureus (15) y Bacillus anthracis (16, 7).

Otro método para medir la penicilina residual es el de cilindro-placa. Siguiendo la misma secuela que para el método de dilución en tubo, al final, se hace una dilución para tener una concentración estimativa de una unidad por ml. La determinación de la penicilina activa residual, se hace por medio de las zonas de inhibición. Se usa como organismo de prueba Stachylococcus

aureus (10, 6).

## 2. METODO MANOMETRICO.

Consiste en medir la velocidad de conversión de la penicilina a ácido peniciloico por acción de la penicilinasa. La inactividad de una molécula de penicilina da - por resultado un grupo carboxilo nuevo, llevándose a cabo de la liberación de una molécula de dióxido de carbono.

Si se agrega penicilinasa a una solución de penicililina regulada, con bicarbonato de sodio, en un respirómetro de Warburg de volumen constante, es posible medir la velocidad de desprendimiento del dióxido de carbono. Dentro de una escala determinada de concentraciones, la reacción es de orden cero y el logaritmo de la velocidad de liberación de dióxido de carbono es una función lineal del logaritmo de la concentración de la penicilinasa. De modo que, cuando se representan gráficamente - los logaritmos, se obtiene una línea recta. Esta gráfica se puede emplear (usando soluciones normales de penicilinasa), para buscar la actividad desconocida, de una solución de penicilinasa (16).

## 3. METODOS VOLUMETRICOS.

La acidez total producida por la penicilina por - la acción de la penicilinasa, se puede titular potenciom

métricamente con NaOH 0.01 N. Se representan gráficamente los mililitros de NaOH necesarios para mantener el pH constante, contra el tiempo en minutos. El máximo de la curva es la medida de la actividad de la penicilinasasa (33).

La destrucción de la penicilina, puede medirse por la absorción de yodo (17). Una solución de penicilina G en regulador de fosfatos de pH 7, se usa como sustrato con la penicilinasasa, se deja actuar durante un tiempo, se le agrega solución de yodo 0.01 N, se pone en la obscuridad durante diez minutos y se titula con solución de tiosulfato de sodio 0.01 N.

La potencia de la penicilinasasa se calcula con la siguiente fórmula:

$$500\ 000 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{0.078} \times \frac{I_1 - I_0}{t} = \text{Unidades de penicilinasasa /ml.}$$

en donde

V = volumen de penicilinasasa

0.078 = absorción de yodo por minuto de 500 000 unidades de penicilinasasa.

$I_0$  = yodo absorbido inicialmente

$I_1$  = yodo absorbido al final de la titulación.

t = tiempo transcurrido en minutos entre  $I_0$  y  $I_1$

#### 4. METODO DE ROTACION OPTICA.

Se pone la mezcla reaccionante en un tubo de polarí

metro de dos decímetros, se mantiene a 30° C se mide el cambio de la rotación óptica a los 10 y a los 60 minutos. La potencia de la enzima se calcula con la siguiente fórmula:

$$500\ 000 \times \left[ \frac{1}{V} \times \frac{1}{0.012} \right] \left[ \frac{\Delta \alpha D}{t} \right] \text{ Unidades de penicilinas/ml.}$$

en donde

V volumen de penicilinas

0.012 cambio en la rotación óptica por minuto, producido por 500 000 unidades de penicilinas.

$\Delta \alpha D$  diferencia entre  $\alpha D_1$  y  $\alpha D_0$

t tiempo en minutos entre  $\alpha D_0$  y  $\alpha D_1$

Las penicilinasas, intra y extracelulares, se pueden obtener en forma cruda mediante extracción de las células bacterianas y de los líquidos de cultivos de los microorganismos productores, respectivamente.

Se ha preparado penicilinasas intracelulares de bacilos paracolon (15), microorganismos Gram-negativos no identificados (23) y de estafilococos penicilino-resistentes (14). La rutina consiste en hacer desarrollar los microorganismos en gelosa nutritiva (15) o en el medio propio (23, 14) se colectan las células y algunas veces se secan, ya sea al vacío (23) o por tratamiento con acetona o éter etílico. El polvo resultante contiene la enzima unida a las células, pero en ocasiones se presenta actividad enzimática al usarlo en suspensión (15).

Los microorganismos aerobios esporógenos son los que más se usan como fuente de penicilinasa extracelular.

Se han obtenido preparaciones enzimáticas de penicilinasas de Bacillus subtilis (32), de Bacillus cereus (26, 5, 20) y de Bacillus licheniformis (10).

Duthie descubrió que se aumentaba la producción de penicilinasas en los cultivos al adicionar penicilina al medio (9). Así, la producción de penicilinasas se hace utilizando penicilina para inducir la síntesis de la enzima (26); dicha producción es una respuesta a la simple adición de penicilina a los cultivos de Bacillus cereus. La formación de la penicilinasas inducidas, se efectúa en tres fases: la primera es una reacción rápida de las células receptoras con el azufre de la penicilina, esto ocurre sin metabolismo de la célula; la segunda, es una fase latente que dura quince minutos, no la afecta la concentración de penicilina, pero es indispensable la presencia de oxígeno; por último, en la tercera fase, la penicilinasas se forma a una velocidad constante.

El aumento de la concentración de penicilina, a más de una unidad por ml, aumenta la velocidad de pro -

ducción y las condiciones anaeróbicas la inhiben, pero se inicia inmediatamente que se le suministra oxígeno (29, 30).

La penicilinasa extracelular se puede purificar - por diferentes métodos que incluyen diálisis, adsorción y elución, precipitación por ajuste de pH y precipita - ción con sulfato de amonio, acetona y alcohol.

Los usos de la penicilinasa son: en el laboratorio, para la prueba de esterilidad de la penicilina y médica mente para contrarrestar los choques producidos por la - sensibilidad a la penicilina.

## P A R T E   E X P E R I M E N T A L .

## PRODUCCION DE LAS ESPORAS.

Para la producción de las esporas de Bacillus cereus variedad 5/B ( N T C C 9946 ), que son las - productoras de la penicilinas, se procedió de la - siguiente manera:

a) El microorganismo liofilizado se sembró en medio líquido de tioglicolato y se puso a incubar a 36° C. hasta que se observó un desarrollo abundante.

b) A partir del desarrollo obtenido, se resembraron varios tubos inclinados con medio "Seed Layer" de Difco Laboratories Inc. y se pusieron a incubar a 36° C. durante 24 horas.

c) El desarrollo de los tubos anteriores se lavó con 5 ml. de agua destilada estéril.

d) La resultante suspensión de microorganismos se pasó a botellas de Roux con contenido de 300 ml.- de medio "Seed Layer" de Difco Laboratories Inc.

Para que la suspensión se extendiera perfectamente sobre la superficie del medio, se adicionaron perlas de vidrio estériles; incubándose las botellas durante una semana a 36° C.

e) Transcurrido dicho tiempo, el cultivo bacteriano se lavó con 30 ml. de agua destilada estéril y se pasó a un tubo de centrifuga, con tapón, estéril; la suspensión así obtenida se calentó a baño maría a 65° C. durante 30 minutos y se centrifugó tres veces, lavando con agua destilada estéril después de cada-centrifugación.

f) Obtenida la suspensión se guardó en frascos ampula con perlas de vidrio para evitar la formación de grumos, manteniéndola refrigerada.

#### PRODUCCION DE LA ENZIMA.

La producción de la penicilinasas se hizo a -- partir de las esporas de Bacillus cereus variedad-

5/B ( N T C C 9946 ), preparadas como ya se explicó - anteriormente.

El medio de cultivo empleado fué el Caldo de soya tripticasa de Baltimore Biological Laboratory, Inc., en una proporción de 2 % en peso en volumen, al que se le agregó 0.5 % en peso en volumen de citrato de sodio. Este medio se distribuyó en matraces Erlenmeyer - en porciones de 100 ml. cada una, esterilizándose en autoclave a 121° C. durante 15 minutos.

Cada matraz con el medio esterilizado se inocularó con 1 ml. de la suspensión de las esporas previamente preparadas de Bacillus cereus de la variedad productora de penicilinas y se metieron a incubar a 36° C. -- durante cuatro días, que es el tiempo requerido para que el microorganismo se desarrolle al máximo, produciendo el máximo de penicilinas, ( esto se puede acelerar poniendo los matraces con el medio inoculado, en un agitador mecánico durante 16-18 h.).

Los cultivos se centrifugaron para eliminar las células y desechos celulares.

#### ESTERILIZACION DE LA ENZIMA.

Se esteriliza la solución enzimática, filtrandola a través de un filtro de membrana. Se empleó esta clase

de filtro debido a que se ha informado que, si se pasa a través de filtro microbiológico del tipo Seitz, la enzima pierde gran parte de su potencia al ser parcialmente adsorbida por la placa porosa. El material de la membrana es de ésteres de celulosa biológicamente inertes cuyo tamaño de poro es de 0.02 micras.

La solución enzimática obtenida es un caldo claro de pH aproximadamente de 8.0 a 8.2; una vez esterilizada se guardó en matraz Erlenmeyer y se puso en refrigeración. Después se hizo la prueba de esterilidad y se procedió a efectuar la valorización.

#### PRUEBA DE ESTERILIDAD.

La prueba de esterilidad se realizó siguiendo los lineamientos que aconsejan la Farmacopea Nacional (11) y que consisten en:

a) Sembrar una serie de siete tubos de medio líquido de tioglicolato y siete tubos de medio líquido de Sabouraud, con la substancia a la que se le va a hacer la prueba de esterilidad.

b) Una vez sembrados, se ponen a incubar los de

tioglicolato a 36-37° C. durante cinco días y los de Sabouraud a 24° C o a temperatura ambiente, durante siete días, teniendo un tubo testigo con cada uno de los ---- medios.

c) Transcurrido ese tiempo, se observan los tu--bos para ver si hay o no contaminación.

En el desarrollo práctico de la prueba, se sem--bró 1 ml. de la enzima esterilizada a cada uno de los tubos de la serie y se incubaron como ya se indicó. Al final no hubo ningún tubo contaminado comprobándose, - así, la efectividad de la esterilización.

#### DETERMINACION DE LA POTENCIA.

El método usado, está basado en la definición de Levy (21) de la unidad de penicilinasas: "Una unidad de penicilinasas inactiva 59.3 unidades de penicilina G - por hora, a 25° C y a pH 7.0 en solución amortiguadora de fosfatos de una sal pura alcalina de penicilina G", y es el descrito por Kirshbaum y colaboradores (18).

Se dejó que cinco diluciones igualmente espa---ciadas, de la solución enzimática, reaccionaran sobre el sustrato, consistente en 10 000 unidades de penici--lina G por ml.

La valorización se hizo en dos etapas: prueba pre

liminar y prueba final.

Prueba preliminar: se preparan cinco diluciones diferentes, con agua destilada, igualmente espaciadas - a partir de la enzima concentrada, de la siguiente manera:

1	Concentrada
2	50 %
3	10 %
4	5 %
5	2 %

Se tomó 1 ml. de cada una de estas diluciones - poniéndolas en tubos de ensayo, se agregaron 3 ml. de agua destilada, 1 ml. de solución amortiguadora de -- fosfatos de pH 7 al 10 por ciento (100 g. de fosfato-monobásico de potasio, 43.56 ml. de solución de hidróxido de sodio 10 N y agua destilada c.b.p. un litro) - y 5 ml. de solución acuosa de penicilina G sódica con 20 000 unidades por ml. Mezcladas las soluciones se - dejó actuar la enzima durante una hora a temperatura-ambiente. A continuación se pusieron a baño maría a - 50° C durante quince minutos para inactivar la enzima. Igual procedimiento se siguió con dos tubos testigos, adicionando 1 ml. de agua destilada en lugar de la enzima.

Se determinó la cantidad de penicilina activa re

sidual, por el método de cilindro-placa, que consiste en hacer una curva patrón con cinco puntos que contengan las siguientes cantidades de penicilina G sódica por ml.

1	1.5	unidades	por	ml.
2	1.25	"	"	"
3	1.0	"	"	"
4	0.75	"	"	"
5	0.5	"	"	"

La solución original de penicilina se hace calculando tener 200 unidades de penicilina G sódica por -- ml.; de esta solución se toma 1 ml. y se lleva a 100 -- ml. con solución reguladora de fosfatos de pH 6 al 1 %.

A partir de esta dilución, se hacen diluciones, las necesarias, a tener las unidades indicadas anteriormente, llevando a un volumen final de 8 ml. con solución reguladora de fosfatos de pH 6 al 1 %. Para las diluciones de la enzima, se diluyen todas las soluciones a una -- concentración estimativa de una unidad por ml., que es la concentración del punto medio de la curva.

Las placas para la determinación se preparan de la siguiente manera:

A cada una de las cajas se les ponen 21 ml. de -- medio fundido "Base Layer" de Difco Laboratories Inc.;

se dejan solidificar y se les agregan 4 ml. del inóculo, para el cual se usó como organismo de prueba — Staphylococcus aureus.

El inóculo se prepara a partir de un tubo inclinado con desarrollo de 24 horas de Staphylococcus aureus. El cultivo se lava con 10 ml. de agua destilada estéril. De la suspensión resultante, se pone 1 ml. para cada 20 ml. de medio fundido "Seed Layer" de Difco Laboratories Inc., el cual debe estar a 40° C.

Puesto el inóculo en las cajas se ponen los anillos, llenándolos con las diluciones.

Para la curva patrón se utilizan seis cajas, — en las que se ponen cinco anillos, uno para cada una de las diluciones y, para las diluciones de la enzima se usan cuatro cajas para cada dilución, en estas cajas se ponen seis anillos de acero inoxidable de 8 mm. de diámetro externo, 6 mm. de diámetro interno y 10 mm. de altura, que se llenan alternando los problemas y la dilución del tipo que contiene una unidad por ml. (tipo 3). Incubados 18 horas a 36-37° C, se miden los diámetros de las zonas de inhibición.

Para hacer los cálculos, se promedian los diámetros de cada dilución y se procede a corregir la curva por medio de las siguientes formulas:

$$\text{PUNTO ALTO} = \frac{3(1) + 2(2) + 3 - 5}{5}$$

$$\text{PUNTO BAJO } = \frac{3(5) + 2(4) + 3 - 1}{5}$$

Con los resultados obtenidos se traza la curva y en ella se busca el punto medio.

Se promedian los diámetros del tipo 3, y los -- del problema. Si el promedio del tipo 3 es más grande que el tipo 3 en la curva, se restan y, el resultado-- se resta al promedio de los diámetros del problema. -- Por el contrario, si el promedio del tipo 3 es menor -- que el tipo de la curva, también se restan, pero el -- resultado se suma al promedio de los diámetros del pro- blema.

Con el resultado de la suma o resta del prome-- dio de los diámetros del problema, se busca en la grá- fica el contenido de penicilina G sódica presente en- la dilución y se hacen los cálculos necesarios para - determinar la cantidad de penicilina activa residual- presente en cada dilución.

En la serie de diluciones al 100, 50, 10, 5 y - 2 % del concentrado de la penicilinasasa, cuando se hi- zo la determinación de la penicilina activa residual, no se encontraron zonas de inhibición en las cajas -- con soluciones que contenían enzima, demostrándose -- así, que toda la penicilina fué inactivada por la enzi

ma presente en las cinco diluciones.

Se procedió a hacer otra serie de diluciones, a partir de la más alta de la serie anterior, o sea:

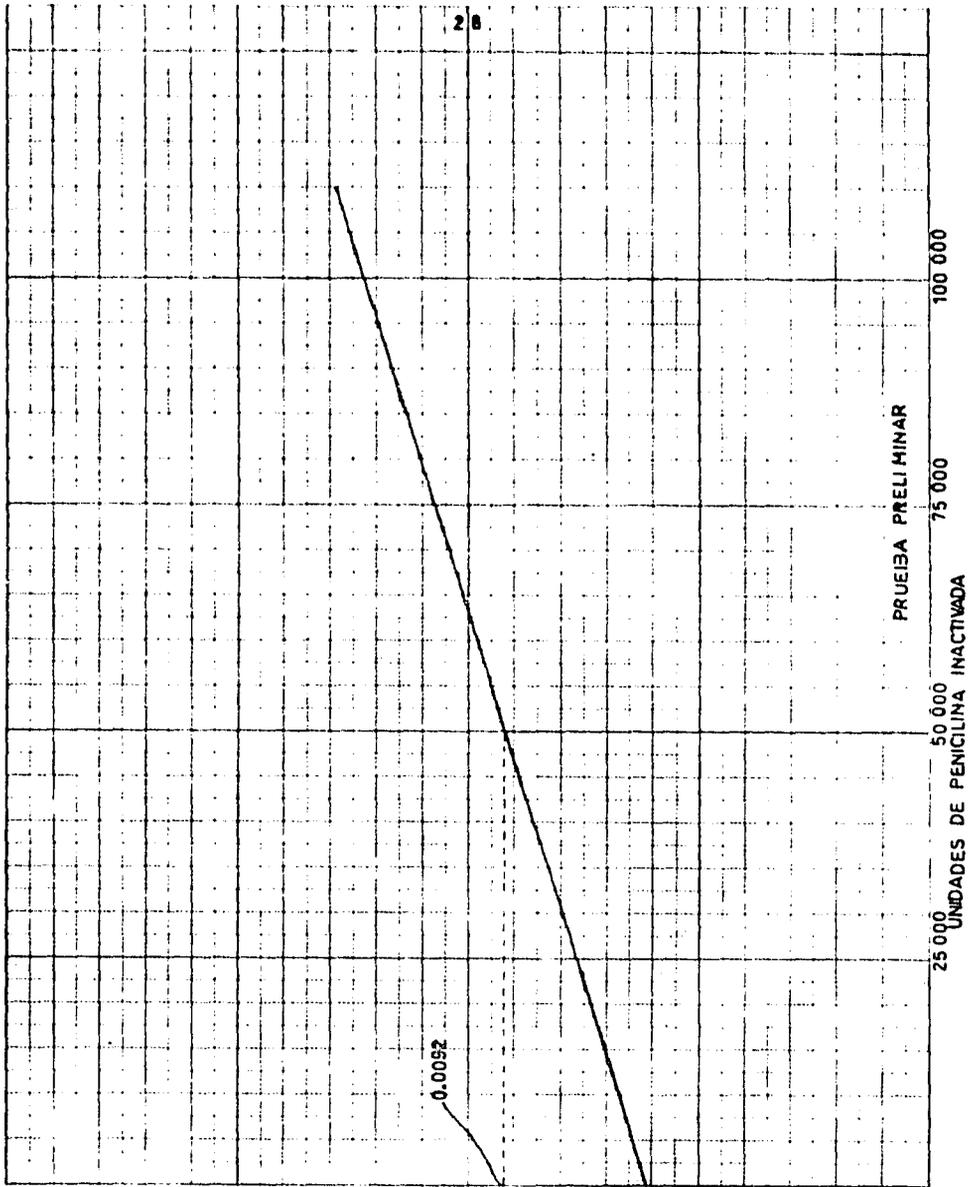
1. 1.2 %
2. 1.1 %
3. 1.0 %
4. 0.9 %
5. 0.8 %

El promedio de los resultados obtenidos en ésta prueba fueron los siguientes:

DILUCION.	U. DE PENICILINA ACTIVA.	U. PENICILINA INACTIVADA.
1. 1.2 %	8 750	97 750
2. 1.1 %	43 500	67 500
3. 1.0	57 500	53 250
4. 0.9 %	65 750	45 000
5. 0.8 %	78 500	35 750

Quantificada la penicilina activa residual, se procedió a determinar la cantidad de penicilina inactivada, - restando al promedio de los datos obtenidos de los ensayos de las soluciones testigo la penicilina activa residual, - encontrada en las soluciones tratadas con la enzima.

DILUCIONES



Siendo cinco los datos obtenidos para trazar la curva (unidades de penicilina inactivada contra diluciones de la enzima), se hizo la corrección con las fórmulas de punto alto y punto bajo. El resultado de la corrección fue: para el punto alto, 96 300 unidades y para el punto bajo, 30 550 unidades. Con estos datos se trazó la curva y se buscó el porcentaje de penicilinasa que se requería para inactivar 50 000 unidades de penicilina. Al buscar en la gráfica se encontró que era el 0.92 %.

#### PRUEBA FINAL.

Conociendo la cantidad necesaria de penicilinasa para inactivar 50 000 unidades en 10 ml. se procede a hacer esta prueba final.

Se prepararon tres diluciones del concentrado de penicilinasa, de tal modo que las concentraciones finales fueran de 50, 100 y 150 % de la concentración que parecía inactivar 5 000 U/ml/h. Se pusieron 1, 2, 3 y 4 ml. de cada dilución de la penicilinasa, en tubos de ensayo; se agregó a cada tubo 1 ml. de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7 al 10 %; 5 ml. de solución acuosa de penicilina G sódica, que contenía 20 000 unidades por ml. y agua suficiente para llevar a un volumen total de 10 ml. Como en la prueba preliminar, se -

hicieron dos testigos libres de enzima, conteniendo ca de uno 10 000 unidades por ml. de penicilina G sódica en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7 al 1 %. - También, como en la prueba preliminar, se dejó actuar la enzima sobre el sustrato durante una hora y luego, se inactivó calentando a baño maría a 80° C durante - quince minutos. Después se diluyeron las soluciones a una concentración estimativa de una unidad por ml. y - se determinó la penicilina activa residual. Se repre - sentaron gráficamente las dosis de las muestras probadas contra las unidades de penicilina inactivadas y se determinó, en la gráfica, el porcentaje de penicilinasas requerida para inactivar 5 000 unidades de penicilina - por ml. Puesto que esta cantidad de enzima inactiva - 50 000 unidades de penicilina por hora en un total de 10 ml., esto contiene 50 000/59.3 o sea, 843 unidades Levy de penicilinasas. La potencia del concentrado de - penicilinasas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{UNIDADES DE PENICILINASA /ml.} = \frac{843 \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen de la enzima probada}}$$

La prueba práctica se efectuó con los siguientes datos:

DILUCION	ENZIMA
150 %	1.38 ml.
100 %	0.92 "
50 %	0.46 "

Para la dilución al 150 ‰, se tomaron 1.38 ml. - del concentrado de la enzima, que se diluyeron a 100 - ml. con agua destilada. Siguiendo la técnica descrita, se encontró que en las soluciones tratadas con 2, 3 y 4 ml. de la dilución al 150 ‰, se inactivó toda la penicilina, pues no aparecieron zonas de inhibición al - - cuantificar la penicilina activa residual. Hecha la determinación, el resultado obtenido fué de 75 000 unidades inactivadas.

Los resultados en la dilución al 100 ‰ en las soluciones tratadas con 3 y 4 ml. de la dilución de penicilinasa, fueron totalmente inactivadas las 100 000 - unidades de penicilina. En las soluciones tratadas con 1 y 2 ml. se obtuvieron los siguientes resultados:

DILUCION	ml. DE DILUCION.	UNIDADES INACTIVADAS.
100 ‰	1	37 875
100 ‰	2	96 125

En la dilución al 50 ‰ si se encontró penicilina activa residual y los datos obtenidos son los siguientes:

DILUCION.	ml. DE DILUCION.	UNIDADES INACTIVADAS.
50 ‰	1	13 750
50 ‰	2	33 750
50 ‰	3	55 250
50 ‰	4	89 250

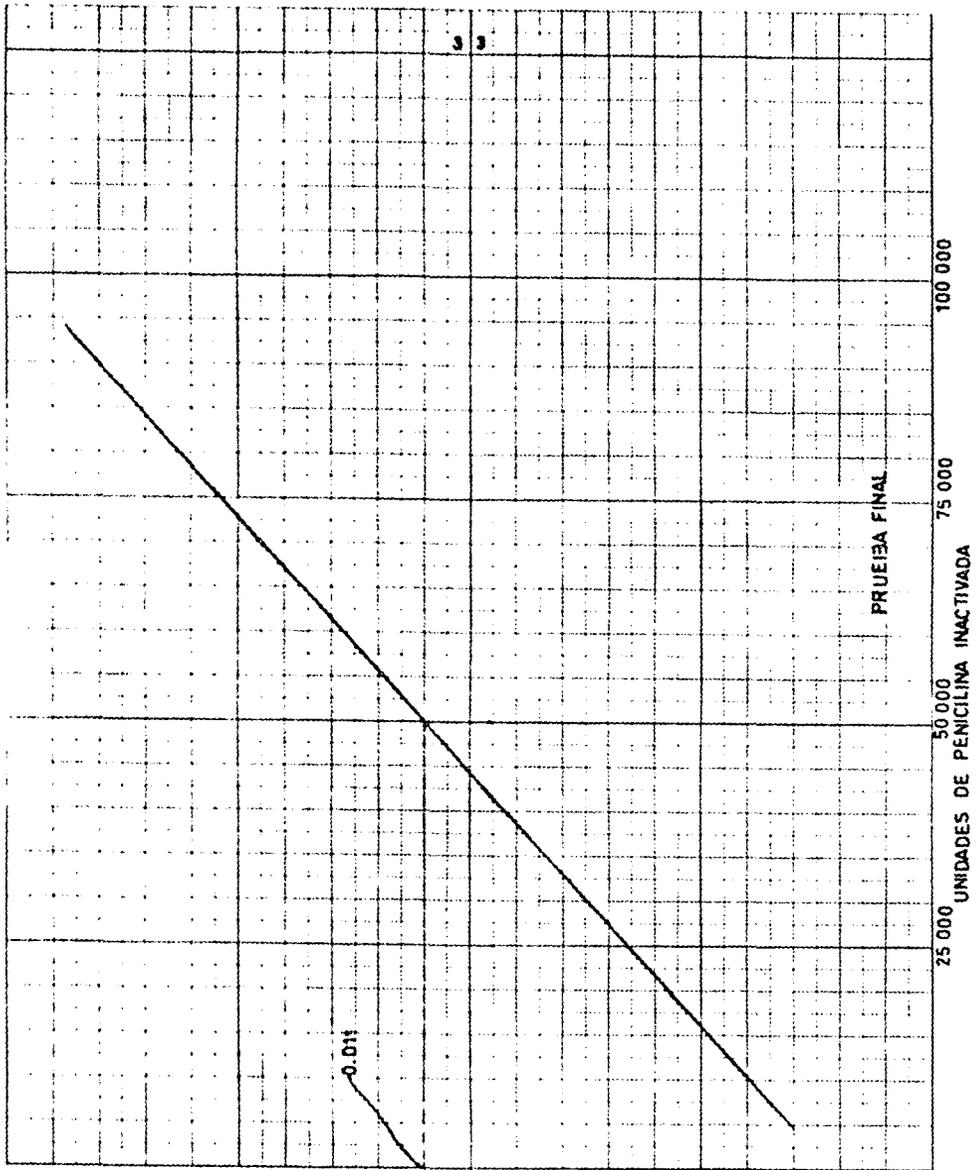
Para hacer el cálculo de la potencia del concentrado de penicilinas, se representaron gráficamente las dosis de la enzima contra las unidades de penicilina G sódica inactivadas, buscando en tal gráfica, el porciento de enzima necesario para inactivar - - - 5 000 U/ml/h y, este dato, substituirlo en la fórmula para encontrar el número de unidades Levy de penicilinas por ml. de concentrado enzimático. Así se encontró que la cantidad necesaria para inactivar - - - 5 000 U/ml/h era de 1.1 ml, que es una dilución al - 125 %.

Este dato se substituyó en la fórmula:

$$\text{UNIDADES LEVY/ml.} = \frac{843 \times 1\ 000}{1.1}$$

En donde 843 es el factor obtenido al dividir - 50 000 entre 59.3 de acuerdo con el siguiente razonamiento: si una unidad Levy inactiva 59.3 unidades de penicilina, 50 000 unidades serán inactivadas por X unidades de penicilinas; 1 000 es la dilución, porque se tomó 1.1 ml del concentrado y se llevó a 100 ml. - con agua destilada, de aquí se tomó 1 ml. y se llevó a 10 ml. para llevar a cabo la reacción; y 1.1 es el volumen de enzima utilizada.

Desarrollando la fórmula se obtuvo como resultado que en cada ml. de la solución enzimática hay 766 363 -



DILUCIONES

PRUEBA FINAL

25 000 50 000 75 000 100 000  
UNIDADES DE PENICILINA INACTIVADA

unidades Levy. Por consiguiente, un ml. de concentrado tiene la capacidad de inactivar 45 455 325 unidades de penicilina.

Para utilizar la enzima en la prueba de esterilidad de los productos inyectables con contenido de penicilina, se diluyeron 2 ml. del concentrado a 100 ml. - con agua destilada estéril, se guardó en frascos ampulla estériles, se engargolaron y se les hizo prueba de esterilidad, dando como resultado una solución estéril. Un ml. de dicha solución inactiva 908 906 unidades de penicilina.

Para la prueba de esterilidad de las materias primas de penicilina, se diluyeron 5 ml. del concentrado a 100 ml. con agua destilada estéril. La potencia de esta solución es de 38 318 unidades Levy de penicilinas por ml. Un ml. de la solución, inactiva - 2 272 266 unidades de penicilina.

## R E S U M E N .

Se dejaron desarrollar esporas de Bacillus cereus, de la variedad productora de penicilinas, en un medio de cultivo especial líquido, se centrifugó y el líquido sobrenadante se pasó a través de un filtro bacteriológico para esterilizar la solución enzimática, con la cual se procedió a las pruebas de esterilidad y potencia.

La prueba de esterilidad se llevó a cabo sembrando la enzima filtrada en tubos de medio líquido de Sabouraud y de tioglicolato, incubándolos durante siete días, como indican las regulaciones oficiales para esta clase de pruebas.

La determinación de la potencia se realizó haciendo actuar a la enzima en diferentes diluciones sobre una cantidad constante de unidades de penicilina G sódica en solución acuosa a pH 7 durante una hora. Después de esto, se procedió a inactivar la enzima calentando a baño maría a una temperatura de 80° C. la penicilina activa residual se determinó por el método del cilindro--

placa y se restó a la penicilina original. Se trazó una -  
curva y se calculó la potencia.

**CONCLUSIONES .**

Los resultados de este trabajo, se estima, fueron altamente satisfactorios, demostrándose:

1°. La producción de penicilinas por este método, es práctica y relativamente sencilla.

2°. Las determinaciones efectuadas probaron la obtención de una solución enzimática estéril, con alto - poder inactivador para la penicilina.

3°. Siendo el método perfectamente accesible a las prácticas usuales de laboratorio, no existe limitación alguna a la generalización de producción de penicilinas en México.

4°. Atentos al punto precedente, puede decirse, desaparece la dependencia que existe a mercados ajenos, con

todos los inconvenientes que esto representa, como son tiempo, distancia, aranceles, divisas y otros.

## B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Abraham, E. P., & Chain, E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146, 837 (1940).
- 2.- Abraham, E. P.; Baker, W., & Robinson, R.: *The Chemistry of Penicillin*, Princeton Univ. Press. Princeton (1949), cap. 2.
- 3.- Banfield, S. E.: Kinetics activity of penicillinase. - *Experientia* 13, 403 (1951).
- 4.- Behrens, O. K., & Garrison, L.: Penicillinase inhibitors. *Arch. Biochem.* 87, 94 (1950).
- 5.- Benedict, R. G.; Schmidt, W. H., & Coghill, R. D.: Penicillinase. *Arch. Biochem.* 8, 377 (1945).
- 6.- Bowman, F. W., & Holdowsky, S.: Production and control of a stable penicillinase. *Antib. and Chemo.* 8, - 508 (1960).
- 7.- Brodersen, R.: Penicillinase from a Gram-negative bacterium. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 24, 383 - - - (1947).
- 8.- Citri, N., & Gerber, N.: Interaction of penicillinase with penicillins. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 64 - (1963).
- 9.- Duthie, E. S.: The production of penicillinase by organisms of the subtilis group. *Brit. J. Exptl. Path.* 25, 96 (1944).
- 10.- Duthie, E. S.: Production of stable and potent preparations of penicillinase. *J. Gen. Microbiol.* 1, 370 (1948).
- 11.- *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 3a. edición. Talleres Gráficos de la Nación, México - - - (1962) pag. 751.
- 12.- Florey H. W.; Chain, E.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Sanders, A. G.; Abraham, E. P., & Florey, M. E.: *Antibiotics*, Oxford Univ. Press, London (1949) cap. 33.
- 13.- Foster, J. W.: Penicillinase. *Science* 101, 205 (1945).
- 14.- Gilson, B. St. C., & Parker, R. F.: Bacterial penicillinase. *J. Bact.* 55, 801 (1948).

- 15.- Harper, G. J.: Inhibition of penicillin in routine culture media. Lancet 245, 569 (1943).
- 16.- Henry, R. J., & Housewright, R. D.: Studies on penicillinase. J. Biol. Chem. 161, 559 (1947).
- 17.- Kersey, R. C.; Iriye, T.; Mechan, B. M., & Kasper, M. A.: A kinetic assay for penicillinase and its importance in sterility testing. Antibiotic Ann. 2, 1947 (1954 - 1955).
- 18.- Zirshbaum, A.; Arret, B., & Harrison, J. D.: Dose-response lines for antibiotic microbial assays. Antib. and Chemo. 2, 30 (1959).
- 19.- Kogut, M. K.; Pollock, M. R., & Tridgell, E. J.: Crystalline bacterial penicillinase. Biochem. J. 62, - 391 (1956).
- 20.- LePage, G. A.; Morgan, J. F., & Campbell, M. E.: Production and purification of penicillinase. J. Biol. Chem. 166, 465 (1946).
- 21.- Levy, G. B.: A unit of penicillinase. Nature 166, 740 (1950).
- 22.- Manson, E. E. D., & Pollock, M. R.: The thermostability of penicillinase. J. Gen. Microbiol. 8, 163 (1953).
- 23.- McQuarria, E. B., & Liebmann, J.: Production of penicillinase. Arch. Biochem. 5, 307 (1944).
- 24.- Morgan, J. F., & Campbell, M. E.: A rapid method for production and isolation of penicillinase. J. Biol. Chem. 169, 337 (1947).
- 25.- Neuberger, A.: The Chemistry of Penicillin, Princeton Univ. Press, Princeton (1949) cap. 14.
- 26.- Pollock, M. R.: Penicillinase adaptation in B. cereus: Adaptative enzyme formation in the absence of free substrate. Brit. J. Exptl. Path. 31, 739 (1951).
- 27.- Pollock, M. R., & Torriani, A. M.: Purification and physical-chemical characteristics of penicillinase from B. cereus. Compt. rend. 237, 276 (1956).
- 28.- Pollock, M. R.; Torriani, A. M., & Tridgell, E. J.: - Bacterial penicillinase. Biochem. J. 62, 387 - - - (1956).

- 29.- Pollock, M. R.: Penicillinase adaptation in B. cereus: An assay of three faces in the logarithmic response of the growth in the inductive cultures for the formation of penicillinase by penicillin. - Brit. J. Exptl. Path. 33, 587 (1952).
- 30.- Pollock, M. R.: Effect of the lack of oxygen in the inductive formation of penicillinase by B. cereus. Brit. J. Exptl. Path. 34, 251 (1953).
- 31.- Pollock, M. R.: Production of penicillinase of higher titre. J. Pharm. and pharmacol. 9, 609 (1957).
- 32.- Ungar, J.: Penicillinase from B. subtilis. Nature 154, 236 (1944).
- 33.- Wise, W. A., & Twig, G. H.: Activity determination of penicillinase. Analyst 75, 106 (1950).
- 34.- Woodruff, H. B., & Foster, W. T.: Bacterial penicillinase. J. Bact. 49, 7 (1945).