

46

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS



ACCION ANTI-NOCARDIA DE MEZCLAS
PARABENOS-ANTIBIOTICOS.

TESIS PROFESIONAL

Mg. ALICIA CRUZ LARA

MEXICO, D. F.

1957



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.

87/1000 *61(04)*
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

**ACCION ANTI-NOCARDIA DE MEZCLAS
PARABENOS-ANTIBIOTICOS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA

Ma. ALICIA CRUZ LARA

MEXICO, D. F.

1957

INDICE DE CAPITULOS.

- I.- INTRODUCCION.
- II.- METODOS Y MATERIALES.
- III.- RESULTADOS Y DISCUSION.
- IV.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.
- V.- BIBLIOGRAFIA.

A mis Padres:

Sr. Francisco D. Cruz

Sra. Alicia L. de Cruz.

A quienes deseo complacer con la reali
zación de mis estudios en recompensa a todos sus
sacrificios.

Con cariño y agradecimiento.

A mis Hermanos:

Cariñosamente.

A mi tío:

Dr. Alejandro Velasco Zimbrón.

Como muestra de admiración y cariño.

A todos mis Familiares
Cariñosamente.

Mi agradecimiento al Dr. Alfredo Sánchez Marroquín
Por su valiosa ayuda y dirección.

A mis Maestros
Con gratitud y respeto

ESTE TRABAJO SE EFECTUO
EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
DE LA ESCUELA NACIONAL DE
CIENCIAS QUIMICAS.

INTRODUCCION.

En el campo de la micología médica, se ha reconocido un considerable número de - pacientes con infecciones fungicas progresi--vas y para las cuales no existe todavía un - efectivo agente terapéutico.

En este grupo de infecciones se encuentran las micosis producidas por Actinomy--cetes de los géneros Nocardia y Actinomyces - que se distinguen entre sí fundamentalmente - por ser el segundo anaerobio y el primero ae--robio (10).

El presente trabajo estudia el com--portamiento de las diversas cepas de Nocardia frente a los siguientes agentes antifúngicos: ésteres hexílico y heptílico del ácido para--hidroxi-benzoico, Candicidina y Nistatina.

Brevemente describiremos las cepas--estudiadas y los compuestos probados.

Género Nocardia (12): está consti--tuido por Actinomyces que fragmentan en ele--mentos bacilares o coccoides de dimensiones va--riables pero generalmente inferiores a una mi--cra; Gram positivos, aerobios, parcialmente - ácido-resistente o no ácidos-resistentes, cre--cen en medios ordinarios a la temperatura del

laboratorio pero hay especies que sólo desarrollan a 37°C.

En ambos casos el crecimiento es lento, existiendo especies de *mycobacterium* es de cir granuloso, glabro o pulverulento, sin formación de micelio aéreo o desarrollo ligero en ciertos medios especiales. Generalmente producen pigmentos de diverso color: crema, naranja rosado, rojo, amarillo, coral, etc., produciendo lesiones que forman granos de color blanco-amarillento o rojizo como consecuencia del desarrollo micelial, rodeándose de prolongaciones claviformes típicas llamadas "masa".

Nocardia brasiliensis.- Es el agente etiológico del 96 % de los casos de micetoma - actinomicótico en México padecimiento apirético que se inicia con la aparición de nódulos pequeños que se reblandecen a los dos meses, ulcerándose y secretando un líquido amarillento de apariencia granulosa. En la periferia de estos nódulos se forma posteriormente una zona de esclerosis limitando una depresión cupuliforme y se notan claramente las regiones endurecidas y las de consistencia normal. Esta especie crece bien en Sabouraud glucosado, formando colonias discoides, y regulares de color amarillento naranja o ladrillo, que al cabo de algún tiempo desarrollan un micelio aéreo rudimentario de aspecto blanquesino polvoso de consistencia semejante a gis o yeso. Microscópicamente puede verse el micelio fragmentante en elementos cocoides de 0.4 a 0.6 micras de diámetro por 4 a 10 micras de largo, parcialmente ácido-resistentes.

Nocardia asteroides.- Esta especie - fué descrita como el primer actinomiceto aerobio patógeno para el hombre en el que causa abscesos cerebrales y lesiones meníngeas semejantes a la tuberculosis, maduro micosis o miceto

mas semejantes a los producidos por la especie anteriormente descrita y otras diversas infecciones de la piel, tejido celular subcutáneo y huesos, especialmente de las extremidades.

Cuando vive parasíticamente toma dos aspectos: el de granulos semejantes a los de otras Nocardias y Actinomyces y el de filamentos cortos ácido-resistentes, poco ramificados y a veces casi baciliformes semejando tuberculosis. Las colonias en Sabouraud glucosado son también semejantes a esta especie bacteriana - de color amarillo pálido crema o aún café oscuro.

Nocardia madurae.- No se distingue - morfológicamente de las otras Nocardias, pero existen algunas diferencias respecto a sus caracteres bioquímicos: licuación de gelatina, - coagulación de la leche, etc. En Sabouraud glucosado desarrolla colonias aéreas, rugosas, de color crema, volviéndose luego rosadas y aún - rojas.

Puede producir enfermedades semejantes a las ya descritas: micetomas, lesiones -- pulmonares, etc.

El rápido desarrollo que ha sufrido - nuestro conocimiento de los agentes químico te rapeúticos de origen microbiano, conocidos como antibióticos (2) ha dado lugar en estos últimos años a varias sustancias que han hecho - posible el control de muchas enfermedades. Sin embargo el control de los virus y enfermedades fúngicas permanece casi invariable para los investigadores en el campo de los antibióticos.

Hay pocos padecimientos clínicamente importantes de origen bacteriano que no respon dan al tratamiento con uno o más de los anti-- bióticos que han sido descubiertos (17) y he-- chos comerciales para uso químico desde la ob-

servación de la penicilina de Fleming, en 1929 Pero por más de dos décadas a partir de esa observación las infecciones de hongos permanecieron fuera del rango de la terapia antibiótica. De los cientos de antibióticos que han sido reportados en la literatura científica sólo unos pocos tienen alguna actividad contra los hongos y menos aún un futuro clínico como fungistáticos y fungicidas contra los mohos y levaduras patogénicas.

En las ciencias médicas la palabra - antibiótico puede ser usada significando literalmente algo dañino a la vida (63,3) como nombre o bien como adjetivo pero en cualquier caso tiene un significado restringido (5,6,18, - 26), varias definiciones del nombre antibiótico han sido propuestas, siendo aquella formulada por Waksman (65,66) la más generalmente --- aceptada. De acuerdo con esta definición un antibiótico es una sustancia química producida - por un microorganismo la cual aún presente en muy bajas concentraciones es nociva para la vida de otros microorganismos. La definición de Waksman dice que los antibióticos fundamentalmente son productos naturales (68) es decir -- biosintéticos pero no excluye la posibilidad . de síntesis industrial (51,50) del producto natural químicamente, es convencional también incluir derivados que son producidos en el laboratorio por una modificación ligera del antibiótico natural (50) y que tiene la actividad antimicrobiana del producto. Los antibióticos verdaderos son activos antibacterianamente en concentración de microgramos por ml. (58).

El fenómeno de la antibiosis o antagonismo (29,30,31,36,57) en organismos vivientes ha sido reconocido aunque no específicamente nombrado durante siglos antes del desarrollo de la bacteriología (54) como una ciencia, aprendiéndose que también existe el antagonis-

mo que se presumía se debía a la liberación de inhibidores químicos específicos y podía ser - aplicado terapéuticamente. (34)

El éxito terapéutico adquirido por - la penicilina condujo a una búsqueda ávida para productos biosintéticos similares provenientes del metabolismo microbiano, y más de mil - microorganismos diferentes (14) incluyendo bacterias, actinomicetos, hongos, líquenes y protozoarios han sido reportados como productores de sustancias con propiedades antibióticas.

De los cientos de antibióticos que - han sido estudiados sólo un pequeño número de ellos posee las propiedades deseadas, como ya se ha dicho antes. En baja concentración su acción puede ser lo mismo bactericida que bacteriostática, en algunos casos puede ocurrir bacteriolisis. A continuación mencionaremos algunos de los pocos antibióticos que tienen actividad contra los hongos: Amidomicina, Candicidina, Filipina, Nistatina, Anfotericina B, de los cuales se estudiaron en el presente trabajo la Nistatina y la Candicidina.

NISTATINA (fungicidina), Micostatina (Squibb) (48).

El descubrimiento de dicho antibiótico fué particularmente importante debido al amplio campo en el uso de los antibióticos de la tetraciclina, los cuales cuando se emplean en cursos prolongados o repetidos a menudo de tratamiento, parecen favorecer el desarrollo de la moniliasis (43) y aún variedad de otros síntomas clínicos y estados enfermizos atribuíbles a la proliferación excesiva de Candida albicans y otros mohos. En 1849 trabajando con cultivos y un actinomiceto aislado de una muestra de estiércol recolectada en Virginia, reportaron preparaciones de concentrados crudos de un nuevo antibiótico antifúngico, mostrando

su actividad en concentraciones de 1 a 6 microgramos por ml. El antibiótico inhibía el crecimiento de un gran número de hongos saprofitos-patógenos y fitopatogénicos in vitro, pero el antibiótico tenía muy poca actividad contra -- las bacterias. Concentraciones superiores a -- 100 microgramos por ml. no inhibían el creci-- miento de ninguna de las bacterias que se ensa-- yaron, subsecuentemente el actinomiceto. fué -- descrito como Streptomyces noursei y el anti-- biótico fué llamado fungicidina, más tarde el nombre se cambió a Nistatina La Nistatina es -- única entre los antibióticos corrientemente -- usados no sólo por su fuerte actividad contra los hongos sino también debido al hecho de que es recolectado tanto del micelio como del caldo fermentado. El polvo microcristalino seco, -- de color amarillo pálido tiene una potencia de 25000 a 30000 unidades por mg.

Propiedades químicas.- Dutcher (13)- y asociados, mostraron que las propiedades químicas y físicas de la Nistatina la diferencian de otros antibióticos (2) cercanos elaborados por otros actinomicetos. La fórmula empírica -- probable de la Nistatina es $C_{46}H_{77}NO_{19}$. En solución el compuesto es rápidamente inactivado por exposición al calor, luz, oxígeno o extremos de pH. en soluciones acuosas-orgánicas a -- temperatura ambiente y protegidas de la luz -- del sol y del aire, pierde aproximadamente el 50 % de su actividad a los 5 días. El antibiótico almacenado en recipientes herméticos y refrigerado retiene su potencia por lo menos 6 -- meses a 40°C. con el 25 % de su actividad -- aproximadamente.

Ensayo.- Un ensayo químico ha sido -- desarrollado para la Nistatina por Gold y asociados (20), quienes describieron métodos de -- ensayo (16) por difusión en agar así como dilución en caldo usando *C. albicans* y *S. cerevisiae* --

siae como organismos de control. El *C. albicans* en la técnica del agar es el empleado en los ensayos que se acostumbra durante la producción-comercial (24).

Para determinar la Nistatina en sangre, orina, o heces la técnica de dilución en tubo con *S. cerevisiae* es usada. Este método es capaz de revelar cantidades tan pequeñas como una unidad por ml. Un valor de 1000 unidades por mg. ha sido arbitrariamente asignado a un estándar de Nistatina.

Acción y usos.- Estudios llevados a cabo in vitro pronto demostraron que la Nistatina ejerce una acción fungistática y fungicida contra dermatofitos y agentes micopatógenos.

Experimentos en animales pronto demostraron la efectividad terapéutica de la Nistatina en coccidioidomicosis, histoplasmosis y criptococosis en ratones y el efecto protector de la Nistatina oral o parenteral en ratones inoculados con moniliasis (62) o con mezclas normalmente fatales de *C. albicans*.

Extendiendo el estudio a los humanos (62,46) encontraron que levaduras como hongos en las evacuaciones fueron reducidas notablemente en número cuando a los sujetos se les suministró 500 mg. de Nistatina oralmente 2 ó 4 veces al día. El tratamiento se continuó durante una semana pero usualmente el efecto antifúngico se estableció claramente de 2 a 3 días. Los hongos reaparecieron cuando la droga se suspendió.

El Mystecilin (Squibb) conteniendo tetraciclina y Nistatin es un producto comercial que se puede obtener para la terapia bacteriana. Pruebas clínicas indican que la Nistatina puede volverse un medicamento importante para infecciones de hongos y también monilias cutá-

neas, empleandose en polvo oral, trociscos y tabletas vaginales.

Toxicidad.- La Nistatina parece tener baja toxicidad: dosis orales de 300 mg. por Kg, durante 30 días no causaron diferencia en el grado de crecimiento ni produjeron cambios graves hematológicos o patológicos. Los perros toleraron más de 3 veces esa dosis por períodos prolongados (62) y ningunas reacciones tóxicas se observaron en ratones inyectados con dosis superiores a 24 mg. por Kg. por día durante largo tiempo (47)

En hombres trastornos transitorios -- gastrointestinales han sido observados al suministrar altas dosis, pero los efectos aparentemente no son serios (46).

La Nistatina es poco absorbida del conducto gastrointestinal, aún en dosis administradas oralmente puede recobrase de las evacuaciones (46).

Entre otros antibióticos antimicóticos están la bacilomicina, mycimbtilina y toximicina, producidos por cepas de Bacillus subtilis; ascosina, candicidina, endomicina, micomicina, rimocidina y estreptomycin, elaborados por diferentes especies de Streptomyces; biformina, clavacina, frequentina, glutinocina y otros hongos (42). La actidiona, candicidina y rimocidina han tenido pruebas limitadas en animales infectados experimentalmente y basados en algunas de esas pruebas, Kligman y Lewis (37) sugirieron el uso de la candicidina en terapia humana para prevenir el desarrollo de moniliasis (71).

La importancia potencial de los antibióticos contra los hongos fitopatogénicos puede mencionarse también, aún cuando tales anti--

bióticos han tenido solo una acción insignifi--
cante en el control de los padecimientos vegeta--
les (23).

Obtención de la Candicidina pura y or--
ganismos que la producen (38).-- Un grupo de 197
cultivos de actinomicetos pertenecientes al gé--
nero *Streptomyces* aislados de tierras, fueron --
probados por su actividad contra *Ceratostomella*
ulmi, los cultivos fueron puestos en medios de
papas o glucosa-peptona en agar e incubados por
2 - 4 días a 28 grados C. sembrados después con
dicha cepa e incubados a la misma temperatura --
de 4 a 5 días. La zona de inhibición del creci--
miento de *C. ulmi* fué medida.

Las pruebas iniciales indicaron que --
aproximadamente el 50 % de los extractos eran --
antagónicos, en varios grados, contra el orga--
nismo de prueba y 7 cultivos seleccionados debi--
do a su actividad alta y consistente por el mé--
todo de la siembra en cruz, fueron usados para--
estudio posterior en medio líquido. Cuatro de --
ellos mostraron actividad contra las bacterias--
(*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) y hon--
gos (*C. ulmi*, *Aspergillus niger*). Dos cultivos --
exhibieron actividades tanto antibacterianas co--
mo antifúngicas. Su espectro fuertemente antimí--
crobiano indicaba sin embargo que eran cepas --
que producían neomicina y pradicina, aunque por
su cultivo eran diferentes del *Streptomyces pra--*
diae (67).

De la última cepa de los 7 cultivos --
se vió que poseía una fuerte actividad antifún--
gica, este cultivo fué por lo consiguiente se--
leccionado para estudio posterior. Se encontró--
que producía una nueva substancia antibiótica --
que no tenía actividad antibacteriana, pero que
estaba caracterizada por notables propiedades --
fungistáticas y fungicidas, especialmente con--
tra *C. albicans*. Fué designada por consiguiente

Candicidina.

Estandarización y ensayo de la Candicidina.--

La unidad de Candicidina se definió como la cantidad mínima de antibiótico por ml. de agar-peptona-glucosa que inhibía completamente el crecimiento del *C. albicans*.

Un cultivo de 18 horas de *C. albicans* producida en agar-levadura-glucosa fué usado como agente inoculante. La edad del cultivo empleado como inoculante no influyó en los resultados. Ningún cambio se observó cuando la concentración de la glucosa en el cultivo de agar se varió de 0.25 a 2.5 % por otra parte entre más grande fué el pH y la concentración de Na Cl dentro de ciertos límites, más altos fueron los valores obtenidos en la prueba.

Producción de Candicidina.-- La candicidina se produjo por reproducción del cultivo en medio de levadura glucosa a 28°C. Los caldos produjeron potencias de candicidina de 1000 a 5000 unidades en un medio de ácido glutámico-glucosa en recipientes de 250 ml. conteniendo 100 ml. -- del medio inoculado e incubado a 28°C. por 5 --- días.

De otros agentes antifúngicos, no antibióticos, los parabenos prometen ser sustancias de probable uso en terapéutica. Por ésta razón se estudiaron también en el presente trabajo.

Parabenos.-- Desde hace años los ésteres del ácido para hidroxibenzoico (POB) se emplearon como medio de conservación en la industria de conservas alimenticias, cosmética, de productos farmacéuticos y otras ramas de la economía (45) pero últimamente algunos ésteres del POB, han sido introducidos en la medicina. El empleo de ellos se remonta desde los trabajos he--

chos por Sabalitschka (53) en diversos preparados orales de gelatina (19) que se emplean como emulsionantes de medicamentos orales, los cuales son de utilidad limitada, por la frecuencia con que en ellos proliferan diversos microorganismos, éste efecto puede ser neutralizado por la adición de ésteres del POB; estos compuestos también son útiles en la conservación de cremas nasales, colirios, pomadas, soluciones vitamínicas y otros productos de la industria farmacéutica (1). Han sido empleados también con excelente resultado para la protección de las soluciones de penicilina frente a la acción de hongos.

Todos los preparados de tipo cosmético suelen ser muy sensibles al ataque de los -- microorganismos.

Los medios de conservación de éstos -- tienen que llenar una serie de exigencias que -- cumplen los ésteres del POB, y encuentran un -- elevado empleo como estabilizadores de shampus, cremas, lociones, aceites, gelatinas (19) soluciones gomosas, polvos y otros preparados. Para los productos de elevado contenido acuoso son -- preferentemente aconsejables los ésteres metílico y etílico, mientras que para los productos -- abundantes en grasas son preferibles los ésteres propílico y butílico, la explicación de esto estriba en la diversa hidro o liposolubilidad de los mismos.

El empleo terapéutico de los ésteres del POB, se redujo al principio a su aplicación externa en las afecciones micóticas de la piel (41). Se prepararon en forma de soluciones, pomadas, unguentos, polvos, en diversas concentraciones y dieron con frecuencia muy buenos resultados. Se viene hablando con frecuencia de afecciones micóticas de órganos internos y se cita a menudo a la *C. albicans* como causante de tales afecciones. No se sabe todavía exactamente

si el incremento de las diversas micosis descan-
sa bien en un trastorno del equilibrio natural-
de los microorganismos o bien a una acción de -
los antibióticos o sustancias satélites de és-
tos; favorecedora al crecimiento de los hongos.
La administración interna de los parabenos pue-
de ser ensayada sin temor, una vez demostrada -
escasísima toxicidad de éstas sustancias no so-
lo a través de su largo empleo anterior sino -
también merced a una serie de amplias y deteni-
das investigaciones. Esta aplicación interna se
ha visto además favorecida por el hecho de que
ni siquiera a dosis muy superiores a las tera-
péuticas ha podido comprobarse en ningún caso -
efecto nocivo alguno (53).

Una favorable cualidad de éstos ésteres es que no perjudica la acción antibiótica -
de aquí que resulten incluso apropiados para la
esterilización de los preparados antibióticos.-
Su favorable acción frente a las manifestacio-
nes secundarias de la acción antibiótica ha si-
do repetidamente confirmada (44).

Son muy favorables también los efec-
tos observados en el tratamiento de las micosis
pulmonares en las que habían fracasado los anti-
bióticos (25).

En éstos casos se pudo conseguir en -
el espacio de 3 días la desaparición de la fie-
bre y la liberación de las monilias en heces y
esputos mediante la administración diaria de -
0.8 gr. del éster metílico del POB. Las reclu-
siones intersticiales del lactante, que habían-
sido tratadas anteriormente sin resultado algu-
no con vitamina K5, curaron total y prontamente
mediante la combinación de ésta vitamina con el
éster propílico del POB.

La historia de los alquil-ésteres del
ácido parahidroxi benzoico o parabenos, como --

agentes antimicrobianos data de 1924 y desde entonces ha sido recordada periódicamente.

(55) Skol también reportó esas propiedades e incluyó más completa información de la actividad antifúngica y antibacteriana y su farmacología; AALTC y sus colaboradores (1) también estaban interesados en los parabenos como preservativos.

Los parabenos son efectivos en bajas concentraciones contra hongos y bacterias Gram-positivas, pero menos efectivos contra bacterias Gram-negativas. Estos agentes son más fungistáticos que fungicidas. Su efecto aditivo sugiere el uso de combinaciones para lograr mayores concentraciones totales en medio acuoso en el cual son solamente ligeramente solubles. Son igualmente efectivos bajo condiciones de pH comprendido entre 4 y 8, y su actividad sólo ligeramente se retarda en presencia de suero humano. No son tóxicos, hasta en dosis elevadas. Solamente los 4 primeros homólogos de la serie n-alkilos se han investigado.

Los estudios antimicrobianos indican que su actividad aumenta con un incremento en el número de átomos de carbono en el lado de la cadena de alkilo. Esto sugiere la posibilidad de que puede esperarse una mayor actividad de los homólogos superiores. En consideración de su acción antimicrobiana, farmacología y caracteres físicos se ha presentado que ellos pueden ser de valor no solamente como preservativos sino también como agentes quimioterápicos. Desde que se vió que su actividad aumentaba conforme crecía el lado de la cadena de alkilo de esta serie de ésteres, se estudió para determinar -- cuales miembros de esta serie ofrecían la mayor promesa como agentes terapéuticos. Se notó también que el crecimiento en la longitud de los radicales alquílicos era correspondiente a una insolubilidad de estos ésteres.

Se ha visto que la actividad antifúngica de los ésteres metil, etil, propil y butil del ácido para-hidroxi benzoico es menos efectiva que los siguientes tres miembros de la serie que son los ésteres pentil, hexil y heptil esto indica que en el caso de el éster octílico hay una insolubilidad mayor para obtener unas concentraciones efectivas, este éster no inhibe *C. albicans* pero inhibe *C. neoformans*.

Los resultados indican también que -- los parabenos mas activos son considerablemente más efectivos que algunos otros agentes antifúngicos conocidos, Esto es verdadero particularmente en medio neutro y ligeramente alcalino.

Los ésteres Hexil y Heptil han representado mayor inhibición en los casos humanos -- de hongos conocidos, esta particularidad es notable con estos hongos produciendose males sistémicos. Estos dos ésteres fueron los estudiados en este trabajo.

MÉTODOS Y MATERIALES.

Para el desarrollo de la presente tesis se usaron tres especies del género *Nocardia* *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. madurae* -- (dos cepas de cada una), las cuales se probaron contra las siguientes sustancias: parabenos -- Hexil y Heptil; antibióticos: Candicidina y Nistatina usando tanto los parabenos como los antibióticos en solución. En las pruebas llevadas a cabo se encontró que éstas dos sustancias eran insolubles en agua pero solubles en alcohol.

Para su mejor manipulación de los parabenos se escogió como solvente glicerina al 75 % en agua. Estos ésteres son poco solubles y por lo tanto su disolución se hizo en baño maría.

Las muestras obtenidas de las cepas en estudio se conservaron en el medio de Sabouraud maltosado, las cuales después se sembraron en un tubo inclinado con dicho medio y por estría, los hongos con micelio aéreo se siembran en punto. Se dejaron incubar a 28°C o a 37°C. cuando fué necesario procurando siempre tener por resiembras cultivos jóvenes.

Preparación del inóculo en medio líquido.- Cuando la cepa se desarrolló convenientemente se preparó el inóculo en medio líquido.

temente y sin ninguna contaminación se tomó una asada de ese cultivo y se sembró en 5 ml. de -- caldo-triptosa-fosfato o en Sabouraud líquido, -- para una dilución mayor se sembraron en 10 ml. -- de medio líquido.

Posteriormente, se llevó a incubar a la estufa por 12-24 horas para después pasar a un matraz chico conteniendo 100 ml. de medio líquido y tomando para la siembra 0.1 ml. con lo que queda la dilución 1:10000 he incubandose -- por 3 a 5 días.

Siembra en medio sólido (69).-- Para -- llevar a cabo esta siembra se prepararon cajas-Petri con una cantidad suficiente de medio sólido que en este caso fué Sabouraud glucosado, -- siendo el volumen de cada caja de mas o menos -- 10 ml., y mezclando el parabeno en distintas -- cantidades según las concentraciones deseadas; -- para que la mezcla resulte homogénea se usó el medio en su estado líquido agregando despues la solución de parabeno. Una vez hecho esto se dejó solidificar la mezcla para sembrar después -- por estria usando un isopo estéril embebido en el inóculo. La caja se dividió en tres secciones aprovechando así una placa para tres cepas diferentes a la vez, y teniendo siempre una como testigo en la cual no existía el parabeno. -- Después de incubar a la estufa se hizo la interpretación de los resultados en comparación con el crecimiento del testigo.

Método de las diluciones en tubo (64)
Se hizo el inóculo en medio líquido como se ha dicho ya teniendo la dilución de 1 es a 10 000. Se pusieron 0.5 ml. de la dilución del inóculo-agregando posteriormente 0.5 ml. del parabeno o antibiótico de una solución de doble concentración que la requerida en el tubo, puesto que se diluye al doble; se llevó a incubar una noche -- en la estufa poniendo siempre testigos de cada-

una de las cepas usadas conteniendo solamente - 0.5 ml. de caldo estéril para después observar se una ojalencia comparada con los testigos.

Método de la inhibición en placas inclinadas.- (59) Este método es usado para probar el sinergismo y antagonismo entre dos antibióticos y entre parabeno y antibiótico.

El método en placas inclinadas es el siguiente: Se puso primeramente un medio basal en la caja petri, consistente en gelosa-simple (caldo simple más 2% de agar), poniendo 10 ml. de dicho medio y estando en estado líquido se inclinaron las cajas de tal manera que al solidificarse quedó una capa de medio siendo delgada en un extremo y gruesa en el otro, posteriormente se le añadió mediodo Sabouraud conteniendo el parabeno o el antibiótico usado y ya en solución.

Se dejó solidificar perfectamente marcando con una flecha en el lado inferior de la caja la dirección del declive.

Una vez solidificados los medios se procedió a la siembra proveniente de un cultivo joven mediante un isopo estéril procurando impregnar toda la superficie para que el inóculo quede uniformemente distribuido. Sobre esa superficie se colocó una tira de papel filtro especial y previamente estéril de las siguientes dimensiones:
0.2 cm. de ancho por 8 cm. de largo.

Para hacer los cálculos se tomó en cuenta que la tira de papel filtro absorbe 0.1 ml. de solución, obteniendo así las concentraciones requeridas de parabenos o de antibióticos probados en la caja. Dicha tira se colocó en el sentido que lleva la flecha del declive pues ella nos indica la concentración en cada -

extremo de la caja. Posteriormente se llevó a -
incubar a la estufa por 24-36 Horas, al cabo de
los cuales se observó el crecimiento.

Método de los discos en placas (8).--
Este método también sirve para probar las combi
naciones de parabenos con antibióticos.

Las cajas se preparan en forma simi--
lar que para las usadas en el método de las ti-
ras pero en éste caso las placas no llevaron in
clinación, poniendo 10 ml. del medio y agregan-
do el parabeno en solución. Una vez solidifica-
dos se sembraron en igual forma usando un isopo
embebido en el inóculo procurándose impregnar -
toda la superficie uniformemente. Sobre esa su-
perficie se colocaron los discos de papel fil--
tro previamente esterilizados que también absor-
ben 0.1 ml. de solución de la siguiente manera:
Dos de ellos cerca en uno de los extremos y los
otros dos separados en el otro extremo, incuban-
dose después en la estufa por 24-36 horas al ca-
bo de las cuales se observó el desarrollo demos-
trando los resultados por la formación de un há-
lo de inhibición al rededor del disco.

Prueba de sensibilidad de las cepas -
contra cada parabeno individualmente.- Se prepa-
raron varias cajas petri con el medio menciona-
do conteniendo cada una el parabeno a distintas
concentraciones; así lo mismo se hizo para los-
antibióticos con el objeto de probar individual-
mente la acción de éstos contra las distintas -
cepas en estudio las pruebas se desarrollaron -
de la siguiente manera:

- 1.- El hexil parabeno a distintas con-
centraciones y contra cada una de
las cepas.
- 2.- El heptil parabeno a distintas --
concentraciones y contra cada una
de las cepas.

3.- Los antibióticos Nistatina y Candicidina se probaron también contra cada una de las cepas y a distintas concentraciones.

Concentraciones usadas de los parabenos.

Para hacer los cálculos de las concentraciones de los parabenos hexil y heptil se tomaron en cuenta sus pesos moleculares que son respectivamente 228 y 242.

		Soluciones. mg. disueltos. cant. en γ /ml.	
Hexil parabeno.	0.25 mM.	5.5 mg/100 ml.	55.50
	0.15 mM.	3.3 mg/100 ml.	33.30
	0.06 mM.	2.6 mg/100 ml.	13.32
Heptil parabeno.	0.25 mM.	5.9 mg/100 ml.	59.00
	0.15 mM.	3.5 mg/100 ml.	35.40
	0.06 mM.	3.54 "/250 ml.	14.16

Concentraciones usadas de antibióticos.-

		Concentración en γ /ml.
NISTATINA.		33.3
		15.1
		7.6
		3.8
		1.7
CANDICIDINA.		100.0
		50.0
		25.0
		12.5
		6.2
	3.1	

Las anteriores concentraciones se usaron en cada uno de los métodos seguidos en esta investigación.

RESULTADOS Y DISCUSION.-

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados del método de las diluciones en tubo, se observa la acción de los parabenos Hexil y Heptil sobre las cepas de Nocardia estudiadas.

Como puede verse el primer compuesto resultó más activo que el segundo por lo tanto fué el que se seleccionó para los estudios posteriores de la acción combinada con antibióticos a distintas concentraciones.

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados de este mismo estudio pero empleando el método de la inhibición en placas. Como puede verse ambos métodos dieron resultados semejantes.

Al estudiar la acción de los antibióticos Nistatina y Candicidina sobre las mismas cepas ya señaladas pudo apreciarse que el primero dió los mejores resultados, lograndose una inhibición total a la concentración de 33 mg/ml.

En tal virtud se seleccionaron los compuestos Hexil y Nistatina para estudiar su acción cuando se probaron a la concentración mínima inhibitoria de cada uno frente a 3 especies de Nocardia.

Los resultados obtenidos con los métodos de las tiras en placas inclinadas y el de los discos fueron concordantes, demostrando ambos que el efecto de las dos sustancias combinadas (Nistatina y Hexil) es de tipo aditivo para las especies de *N. asteroides*, *N. madurae* y neutro para *N. brasiliensis*.

Se considera que el efecto es aditivo y no sinérgico porque la acción reforzante fué muy ligera.

La terapia antibiótica combinada recibe cada vez más atención y por lo tanto se requieren métodos más adecuados para su estudio in vitro de diversa manera según las cepas, especies y aún gérmenes microbianos (7,27,28) al probarse los antibióticos u otra sustancias antimicrobianas por combinaciones (15,33,49,52) debiendo satisfacer ciertos requisitos (56); la prueba debe indicar los efectos relativos a las distintas concentraciones probadas, es decir si son antagonistas, sinergistas (32) o indiferentes dependiendo de las concentraciones absolutas en que se emplean y sus proporciones entre sí. Han sugerido varios autores (31) que los efectos de los antibióticos en combinaciones puede resultar: más efectivo o bien menos efectivos que separados. Siguiendo experimentos con *Streptomyces* yielded dieron los resultados siguientes: la penicilina sola dió una cierta acción óptima bactericida, pero añadiendo estreptomycin (11) en su concentración óptima resultó un sinergismo o sea una acción reforzante, en cambio al añadir clo-ranfenicol resultó un efecto antagónico el cual nunca resulta con un sólo antibiótico (35).

Los procedimientos más empleados para el estudio de estas relaciones son: el de las diluciones en tubo, el de los discos en placa y el de las tiras de papel filtro en placas ordinarias o en placas-inclinadas (59) y aún el de las

placas inclinadas sin adición de tiras de papel filtro (60,61)

En la presente tesis se probaron estos tres métodos comparativamente y se estableció la superioridad de los métodos de las diluciones en tubo y el de las tiras en placas inclinadas.

TABLA No. 1

EFFECTO DEL HEXIL-PARABENO SOBRE LAS NOCARDIAS.

METODO DE LAS DILUCIONES EN TUBO.

CEPAS.	Concentración en microgramos por ml.					
	150	100	50	25	12.5	6.2
<i>N. Asteroides.</i>						
A	-	-	-	-	-	+
B	-	+	+	+	+	+
<i>N. Madu- rae.</i>						
A	-	-	-	-	-	+
B	-	-	-	-	-	+
<i>N. Brasi- liensis.</i>						
A	-	+	+	+	+	+
B	-	-	+	+	+	+

(-) Inhibición completa. (+) No inhibición.

TABLA No. 2

EFFECTO DEL HEPTIL-PARABENO SOBRE LAS NOCARDIAS.

METODO DE LAS DILUCIONES EN TUBO

CEPAS.	Concentración en microgramos por ml.					
	150	100	50	25	12.5	6.2
N. asteroides.						
A	-	-	-	+	+	+
B	-	-	+	+	+	+
N. madurae.						
A	-	-	-	+	+	+
B	-	-	-	+	+	+
N. brasiliensis.						
A	-	+	+	+	+	+
B	-	-	+	+	+	+

(-) Inhibición completa. (+) No inhibición.

TABLA No. 3

ACCION ANTI-NOCARDIA DEL HEXIL-PARABENO.

METODO DE LA INHIBICION EN PLACAS.

CEPAS.	Concentración en microgramos por ml.					
	100	50	25	12.5	6.2	3.1
N. asteroides.						
A	-	-	-	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+
N. madurae.						
A	-	-	-	+	+	+
B	-	-	-	+	+	+
N. brasiliensis.						
A	-	+	+	+	+	+
B	-	+	+	+	+	+

(-) Inhibición completa. (+) No inhibición.

TABLA No. 4

ACCION ANTI-NOCARDIA DEL HEPTIL-PARABENO.

METODO DE LA INHIBICION EN PLACAS.

CEPAS.	Concentración en microgramos por ml.					
	100	50	25	12.5	6.2	3.1
N. asteroides.						
A	-	+	+	+	+	+
B	-	+	+	+	+	+
N. madurae.						
A	-	+	+	+	+	+
B	-	-	+	+	+	+
N. brasiliensis.						
A	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+

(-) Inhibición completa. (+) No inhibición.

TABLA No. 5

EFFECTO DE LA NISTATINA SOBRE NOCARDIAS.

METODO DE LA INHIBICION EN PLACAS.

CEPAS.	Concentración en microgramos por ml.					
	100	33.3	15.1	7.6	3.8	1.7
N. asteroides. A	-	-	+	+	+	+
N. madurae. A	-	-	-	+	+	+
N. brasiliensis. A	-	-	+	+	+	+

(-) Inhibición completa. (+) No inhibición.

TABLA No. 6

EFFECTO DE LA CANDICIDINA SOBRE NOCARDIAS.

CEPAS.	Concentración en microgramos por ml.					
	100	50	25	12.5	6.2	3.1
N. asteroi- roides. A	+	+	+	+	+	+
N. madu- rae. A	+	+	+	+	+	+
N. brasili- ensis. A	+	+	+	+	+	+

(-) Inhibición completa. (+) No inhibición.

TABLA No. 7

ACCION COMBINADA ANTI-NOCARDIA DE LOS COMPUESTOS
NISTATINA Y HEXIL.

METODO DE LAS TIRAS EN PLACAS INCLINADAS

CEIAS	Concentración en microgramos por ml.		EFECTO.
	NISTATINA 33	HEXIL-PARABENO 12.5	
N. asteroides. A	A	A	ADITIVO.
N. madurae. A	A	A	ADITIVO.
N. brasiliensis. A	A	O	NEUTRO.

TABLA No. 8

ACCION COMBINADA ANTI-NOCARDIA DE LOS COMPUESTOS

NISTATINA Y HEXIL.

METODO DE LOS DISCOS EN PLACAS

CEPAS.	Concentración en microgramos por ml.			EFECTO.
	NISTATINA	+	HEXIL-PARABENO	
	33		12.5	
N. asteroides. A	A		A	ADITIVO.
N. madurae. A	A		A	ADITIVO.
N. brasiliensis. A	A		O	NEUTRO.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.-

- 1.- Se presenta un estudio de la actividad anti microbiana de los siguientes compuestos: -- los parabenos Hexil y Heptil y los antibióticos Nistatina y Candicidina por diversos métodos.
- 2.- De los métodos ensayados el de las diluciones en tubo y el de la inhibición en placas, dieron resultados semejantes y, en general, los mejores y más claros correspondieron a los métodos de las diluciones en tubo y a las tiras en placas inclinadas.
- 3.- De los compuestos estudiados el Hexil parabeno fué el que presentó mejor acción antimicrobiana contra las cepas del género No--cardia. De los antibióticos la máxima acción correspondió a la Nistatina.
- 4.- Al estudiarse el efecto de las combinaciones se vió que la de Nistatina y Hexil parabeno presentó un efecto aditivo para las especies N. asteroides y N. madurae. Este efecto fué de carácter neutro para la N. --brasiliensis.
- 5.- Se concluye que el Hexil parabeno resultó -- ser más activo que la Nistatina especialmente para las especies N. asteroides y N. madurae.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- AALTO T. R.: FIRMAN M. C. and RIGLER, N. E. p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives. 1. Uses antibacterial and antifungal - studies, properties and determination J.Am. Pharm. A. (Scienc. Ed.) 42:449-456, 1953.
- 2.- 'ANTIBIOTIC SUBSTANCES. Their biological and chemical properties. 1948. Publ. by: Anti--biotics and Study Section of the Natl.Inst. of Health. Washington, D. C.
- 3.- BAILEY J. H. and C. J. CAVALLITO, 1948. An--tibiotics. Ann. Rev. Microbiol., 2:143.
- 4.- BANG. H.: Eine neue Behandlung der Trichoph--tie der Haarboden mit Mykikten Dermat. - -- Wehnschr. 105:1096-1099, 1937.
- 5.- BARON A. L., 1950. Handbook of Antibiotics. Reinhold Pub. Co., New York.
- 6.- BENEDICT R. G. and A. F. LANGLYKE, 1947. An--tibiotics. Ann. Rev. Microbiol., 1:193.
- 7.- BLISS, E. A.; WARTH, P.T., and Long, P.H.:-- Studies of combinations of antibiotics in - vitro and in experimental infections in mi-

- ce, Bull. John Hospkins Hosp. 90: 149.
- 8.- BONDI, A., Jr.; Spaulding, E.H.; Smith, D. E., and Dietz, C. C.: A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and another antibiotics, A.-M. J. 213: 1, 1947.
 - 9.- BROWN et. al. Science, Antibiotic Annual.- 117, 609, 1953. Citado por Osol et, al - - (48)
 - 10.- BURKHOLDER P. R., 1946. Studies on the antibiotic activity of Actinomycetes. Jour.-Bact., 5: 503.
 - 11.- CATES, J. E.; CHRISTLE, R.V., and GARROD,-D.F.: Penicillin resistant subacute-bacterial endocarditis treated by a combination of Penicillin and streptomycin, Brit. M.J. 1:653, 1951
 - 12.- CONANT, N.F.: Manuel of Clinical Mycology, W. B. Saunders Co. Filadelfia, 1944.
 - 13.- CUTCHER et. al., Antibiotics Annual 191, - 1953-54.
 - 14.- Editorial, 1949. Antibiotic agents. Jour.-Amer. Vet. Med. Assoc., 114, 194.
 - 15.- ELEK, S.D., and HILSON, R.F.: and JEWEL, - F.: Laboratory aspects of combined antibiotic treatment, Brit. M.J.: 198, 1953.
 - 16.- ELEK, S.D., and HILSON, G.R.F.: Combined - agar diffusion and replica plating techniques in the study of antibacterial substances, J. Clin. Path. 7:37, 1954.
 - 17.- ENGELS W. H., 1948, The industrial development of antibiotics. Chem. Eng. News., 26: 184.

- 18.- FLOREY H.W., E.B. CHAIN, N.G. HEATLEY, M.-
A. JENNINGS A.G. SANDERS, E.P. ABRAHM and-
M.E. FLOREY, 1949. Antibiotics. Oxford --
Univ. Press.
- 19.- GERSHENFELD L. and PERLSTEIN, D.: Preserva-
tives for preparations containing gelatin-
am. j. pharm. 111:227-287, 1939.
- 20.- GOLD et. al. Antibiotics Annual 195, 1953.
Citado por Osol et, al (48)
- 21.- GUNNISON, J.B.; SHEVSKY, M.C.; BRUF, J.A.;
COLEMAN, V.F., and JAWETZ, E.: Studies on-
antibiotic synergism and antagonism: The -
effect in vitro of combinations of antibio-
tics on bacteria of varying resistance to-
single antibiotics, J. Bact. 66:150, 1953.
- 22.- HERRELL W.E., 1950 Newer Antibiotics. Ann.
Rev. a Microbiol 4:101.
- 23.- HORSFALL J. G. and A.E. DIMOND Plant Chemo-
therapy Ann. Rev. of Microbiology 5: 209--
222, 1951.
- 24.- HUPPERT, M.: CAZIN J., Jr., and SMITH H.,-
Jr.: Pathogenesis of Candida albicans in--
fection following antibiotic Therapy. 11.-
The effects of antibiotics on the inciden-
ce of Candida albicans in the intestinal -
tract of mice, J. Bact. 70:440-447, 1955.
- 25.- HUPPERT M; The antifungal activity of a ho-
mologos series of parabens. Antib. and -
Chemth. 7: 9-36, 1957.
- 26.- IRVING G.W. and H.T. HERRICK, 1949: Anti-
biotics. Chem. Pub. Co., New York.
- 27.- IKEDA Y. T. HIRAI and T.NISHIMAKI studies-
on the antifungal antibiotics from actino-
mycetes. Jour. Antibiotics 3, 726-79,1950.

- 28.- JACKSON, G.G. and FINLAND, M.: Comparison methods for determining sensitivity of -- bacteria to the antibiotics in vitro, A.-M.A.M.A.RCH. Int. Med. 88:446, 1951.
- 29.- JAWETZ, E., and GUNNISON, J.B.: Antibio-- tic synergism and antagonism: An assess~~st~~ment of the problem, Pharm. Rev. 5: 175,- 1953.
- 30.- JAWETZ, E.: Antibiotic synergism and anta-- gonism: Review of experimental evidence,- A.M.Arch. Int. Med. 90: 301, 1952.
- 31.- JAWESTZ, E.: Antibiotic synergism and an-- tagonism: Review of experimental evidence A.M.A.A.RCH Int. Med. 90:301, 1952.
- 32.- JAWETZ, E.; GUNNISON, J.B.; BRUFF, J.B. - and COLLEMAN, V.R.: Studies on antibiotic synergism and antagonism: Synergism among seven antibiotics against various bacte-- ria in vitro, J. Bact. 64: 9, 1952.
- 33.- JAWETZ E., and GUNNISON, J.B.: An experi-- mental basis of combined antibiotic ac--- tion J.A.M.A. 150:693.1952.
- 34.- J. CONNAISS Med. Prat et Pharmacol, 7, -- 321. Citado por Osol et. al (48)
- 35.- JOHNSON, B.A., y FOLENEY, F.L. Studies on the synergism between bacitracin and peni-- cillin.- Correlation of in vivo with in - vitro results, Ann, New York Acad. Sc. -- 53:42, 1950.
- 36.- KLEIN, M., and SCHORR, S.E.- The role of-- bacterial resistance in antibiotic syner-- gism and antagonism, J Bact. 65: 454, 1953.
- 37.- KLIGMAN, A.M. and LEWIS, F.S.- In vitro -

and in vivo activity of Candicidin of pathogenic fungi.- Proc. Soc. Expt Biol. -- Med. 82 : 399-404, 1953.

- 38.- LECHEVALIER, H and ACKER, R., CORKE, - - HAENSELER, M. And WAKSMAN, S.A.- Mycolo--
gic 45 : 155-171, 1953.
- 39.- LEDENBERG, J., and LEDENGERB, E.M.- Replica plating and indirect selection of bacterial mutants, J. Bact. 63: 399, 1952.
- 40.- LOMBOLT, S.- Uber die Fussmykosen in Kopenhagen und ihre Behandlung mit Mykikten Med. Klin. 34: 118.119, 1938.
- 41.- LOOS, H.O.- Sur Bekämpfung der Epidermophytie der Füße und Hände mit Ben oisäurepräparaten. Arch. f. Dermat. u. Syph. - 173: 109-116, 1935.
- 42.- LUTERAN, I.H. J., 1947.-Remarques sur less antibiotiques principalment d'origine fungique. Ann. Parasit. 22:110
- 43.- McVAY, L.V. Jr., and SPRUNT, D.H.- Study of moniliasis in aureomycin therapy, - - Proc. Soc. Expt. Biol. & Med 78:759 761, 1951
- 44.- METZGER, W.I.- WRIGTH, L.T., and DI LORENZO, J.C.- Effect of esters of parahydroxy benzoic acid on candida an yeast-like fungi, J.Z.M.A. 155:35-358, 1954.
- 45.- MEIDING, C.F., and BURRELL, H., The esters of parahydroxybenzoic acid as preservatives, Drug & Cosmetic I Ind, 54:408- - 415, 1944.
- 46.- NEWCOMER et. al. Antibiotic Annual 1954-- 55. Citado por Osol et. al (48)

- 47.- NEWCOMER et. al., J. Invest. Dermat, 22,--
431. 1954.
- 48.- OSOL ARTHUR.- FARRAR GEORGE E. Jr. The dis-
pensatory of the united states of America--
25th. edition pag. 1675 1567-68-69. Jb. Li-
ppincott Co., Philadelphia, Montreal.1955
- 49.- POMERANTZ, H.Z., Combined antibiotic thera-
py, Canada M.A.J. 66:424, 1952.
- 50.- PRATT R. and J. DUFRENOY, 1949: Antibio---
tics. Lippincott Co., New York.
- 51.- IRESCOTT S. C. Y C. G. DUNN, 1949. Micro--
biologia Industrial Ediciones Aguilar S. -
A., Madrid.
- 52.- PRICE, C.W.; RANDALLY, W.A.; WELCH, H., --
and CHANDLER, V.L.: Studies of the combi---
ned action of antibiotics and sulfonamides
Am. J. Pub. Health 39:340, 1949.
- 53.- SABALITSCHKA T. CHEMISCH konstitution und-
Konservierungs Vermogen Chem, Zentral, 48:
703, 194.
- 54.- SALIE A. J., 1948. Fundamental Principles-
of Bacteriology. McGraw-Hill Book Co., - -
New York.
- 55.- SOKOL T.R.: Recent developments en the pre-
servation of pharmaceuticals, Brug Stand.-
O:89-106, 1952.
- 56.- SPAULDING, E.H., and ANDERSON, T.G.: Selec-
tion of antimicrobial agents by labor tory
means, J. A. M. A. 147:1336,1951.
- 57.- SPECK, R.S., and JAWETZ, E.: Antibiotic sy-
nergism and antagonism in a subacute expe-
rimental streptococous infection in mice -
Am. M.J. Sc. 3: 80, 1952.

- 58.- STREITFELD, M., and GUANDANO, J.J.,: Replica strip plate, a method for testing bacteriostatic or bactericidal action of antibiotics paired in various concentration ratios, Bact. Proc., 1956.p. 30.
- 59.- STREITFELD, M.M.: The replica strip gradient plate technique for determination of synergism or antagonism of antibiotics paired in various concentration ratios: A bacteriostatic and bactericidal assay. Antibiotic Annual, 1956-57 N.Y. Medical Encyclopedia, - Inv. 1957 p.p. 906-917.
- 60.- SZIBALSKI, W: Gradient plates for the study of microbial resistance to antibiotics. - Bact. Proc., 1952, p. 36.
- 61.- SZIBALSKI, W.: Microbial selection. Part -- part 1. Gradient plate technique for study of bacterial resistance, Science 116:46, -- 1952.
- 62.- STEINBERG, et. al. Antibiotic Annual, pag. 199, 1953-54, citado por Osol (48).
- 63.- TILLET W. A., 1948: The antibiotic age. -- Ann. Jour, Med. 4:159.
- 64.- WAISBREN, B. A.; CARR, C., and DUNETTE, J. The tube dilution method of determining bacterial sensitivity to antibiotics, Am J. -- clin. Path. 1:884, 1951.
- 65.- WAKSMAN S. A., 1948. Antibiotics. Biol. Revs 3:452.-
- 66.- WAKSMAN S. A., 1947. Microbial antagonism and antibiotic substances. Commonwealth - Fund... New York.
- 67.- WAKSMAN S. A. E., KATZ and H. LECHEVALIER - Antimicrobial properties of neomycin. Jour. Lab. clin.Medicine 36:93-99, 1950.

- 68.- WAKSMAN S. A., 1949. Origen and nature of -
antibiotics Amer Jour. Med., 7 (1): 85.
- 69.- WAKSMAN S. A. and RELLY, Agar streat method
for assaying antibiotic substances. Ind. --
Engl. Chem. (anal. Ed), 17:556-558, 1945.
- 70.- WOODS J. W. I. K. Manning and C. N. Patter-
son, Monilial infections complicating the -
therapeutic use of antibiotics Jour. Amer.-
Med. Assoc. 145-1-14, 1951.