

11445

DONACION
27.03.0

71º 11445

Dr. ALFREDO PAREDES C.

refa 13742

\$3

EXPERIENCIAS
DE
EXTRACCION
DE
PENICILINA

QUITO - ECUADOR
Imp. de la Universidad
— 1947 —

Experiencias de extracción de Penicilina

Conferencia de ex-cultivos de la cultura

Conferencia sustentada en la Casa
de la Cultura Ecuatoriana, en el mes
de Abril de 1946.

Dr. ALFREDO PAREDES C.

11045

615

Experiencias de extracción de Penicilina

Consideraciones sobre su poder Antibiótico

Imp. de la Universidad

— — 1947 — —

QUITO - ECUADOR

Experiencias de extracción de Penicilina

Distínguidos concurrentes:

Pese a la escasa médula científica que pueda contener la labor experimental que a continuación pongo en tela de vuestro juicio, y aunque la altura técnica del objetivo escogido, esté desacorde con la calidad de trabajo realizado, creo que estas experiencias pueden incluirse entre las actividades de investigación científica universitaria.

Todo trabajo de investigación trae consigo, unas veces el sabroso presente del éxito y otras el gratuito castigo del fracaso. Pero éxito y fracaso son productos natos de la clarificación de un problema de laboratorio, y se determinan automática y correlativamente; llegando a constituir los vientres y nodos de la misma onda periódica, asociada a la gran espiral dialéctica por la que deambula el pensamiento científico, en su vana búsqueda de la verdad final.

La anterior consideración me depara la confianza suficiente, para exponer sin recelo alguno, las inciden-

cias de los últimos trabajos realizados en el Instituto Botánico, sobre la extracción de la penicilina y el cultivo de la especie que la produce.

Como todos ustedes conocen, la penicilina es un producto metabólico de la planta conocida por la ciencia con el nombre de *Penicillum notatum*, perteneciente al grupo de los hongos.

Nuestras labores se iniciaron hace dos años y medio, en tiempos en que los métodos de extracción y normas técnicas de cultivo, constituían secretos de guerra.

Trabajando durante unos cuantos meses logramos obtener filtrados de buena calidad, y aplicando un método ideado por nosotros, muy falto de técnica por cierto, extrajimos unos pocos miligramos de penicilina.

Hace un año, y debido a lo absorbente de las labores en cuanto a tiempo y medios económicos, tuvimos que suspender nuestras investigaciones, con la satisfacción de habernos iniciado por lo menos, en estos trabajos tan delicados.

Una relación completa de las labores realizadas, se encuentra publicada en el Boletín Oficial del Instituto Botánico, siendo su autor nuestro compañero de Cátedra Señor Plutarco Naranjo, quien intervino de manera decisiva y entusiasta, haciéndose cargo de la vigilancia del desarrollo, preparación y esterilización de los medios de cultivo y control bacteriológico de los filtrados.

A principios de este año llegó a nuestras manos un libro sobre penicilino-terapia, cuyo autor es el Profesor norteamericano John Kolmer. En esta obra se encuentran importantísimos estudios sobre la producción de penicilina, y los factores determinantes del mejor rendimiento de los cultivos. Además hay detallados métodos de extracción y purificación de la droga, y valiosos informes sobre la calidad de las diferentes razas, en cuanto a su potencia productora.

En uno de sus capítulos se lee lo siguiente:

«En un reciente estudio de 200 cultivos de *Penicillium notatum*, Raper y sus colegas encuentran que la raza número 1.249, serie B 21, es la mejor para la producción de penicilina en cultivos de superficie».

Nosotros conservamos cuidadosamente el tubo de ensayo en el cual nos enviaron del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la cepa de *Penicillium*, en cuya etiqueta había datos de fecha y numeraciones de serie y orden; entonces hicimos la inmediata comparación de las cifras, encontrando que coincidían absolutamente.

Sin conocerlo, habíamos estado pues en posesión de la cepa de mejor calidad entre 200 estudiadas por el profesor Raper, para cultivos de superficie. Este tipo de cultivo era precisamente el que nosotros habíamos adoptado en nuestros trabajos de hace dos años, y el que estábamos en capacidad de aplicarlo hoy.

Las circunstancias anotadas determinaron nuevamente un vívido entusiasmo para reiniciar nuestros trabajos, pero esta vez contábamos con datos técnicos completos para el efecto.

Comenzamos nuevamente a hacer los cultivos, usando una nueva fórmula de caldo nutritivo. Anteriormente habíamos usado la Czapeck-Dox modificada que contiene:

Nitrato de Sodio.....	3	grs.
Fosfato ácido de Potasio	1	»
Cloruro de Potasio	0,50	»
Sulfato de Magnesio.....	0,50	»
Sulfato ferroso.....	0,01	»
Glucosa anhidra	40	»
Agua destilada.....	1000	c.c.

La nueva fórmula usada era la de Hobby en la cual se cambia la glucosa anhidra, por sacarosa color café obscuro, en la cantidad de 20 gramos; quedando las mismas sales de la fórmula anterior pero modificadas en su proporción; así el Nitrato de Potasio se aumenta en un 100% y el fosfato ácido de Potasio en un 50%.

No disponiendo en el mercado de azúcar café obscuro, utilizamos panela, aumentando un poco la dosis en relación a su grande contenido de agua.

En los caldos estériles dispersamos las esporas que habíamos obtenido de un micelio cuidadosamente guardado en un desecador, durante el tiempo de un año, más o menos. Este micelio correspondía aproximadamente a una veinteava generación de la cepa recibida de los Estados Unidos.

En el nuevo caldo de cultivo las esporas comenzaron su desarrollo normal hasta el tercer día en que se formó la capa miceliana de color blanco. Al cuarto día se tornó azul verdosa y al quinto, azul gris. En los días subsiguientes no se notó ninguna modificación del color aparecido el día quinto, y el micelio formado en vez de presentar la característica consistencia coriácea, arrugada, era lisa, gelatinosa y se disgregaba al menor movimiento del recipiente. Además la primitiva pigmentación amarillenta que presentaba el caldo debido a la presencia de la panela, había desaparecido. El líquido filtrado era pues casi incoloro.

La curva de pH tan característica en el normal desarrollo del hongo, se había desvirtuado por completo. Comenzó por pH 6 al tiempo de verificada la siembra, pero en vez de presentar la caída normal a pH 4 o 3; prosiguió elevándose desde el tercer día hasta pH 7,5 que alcanzó en el cuarto día.

Efectuada la prueba del poder antibiótico sobre dispersiones de *Satafilococo* áureo en agar-agar, obtuvi-

mos una mínima clarificación en el borde de la cavidad circular que servía de depósito al filtrado. La amplitud de la zona clarificada no pasaba de dos milímetros.

El conjunto de observaciones anotadas nos indicaba claramente que la cepa de *Penicillium notatum* utilizada, había sufrido una completa degeneración, y que su capacidad de producción de penicilina era casi nula.

Teníamos así por delante un grave problema. Si la cepa de que disponíamos no producía penicilina, ¿cómo íbamos a proseguir nuestros trabajos? Ante tal emergencia intentamos una regeneración de la raza, conforme a métodos deducidos de los numerosos trabajos hechos al respecto por los investigadores norteamericanos, y en pequeña parte de nuestras propias observaciones.

Como antecedente indicaremos que desde hace tiempo habíamos observado que todo el ambiente de nuestro laboratorio se hallaba contaminado con esporas de *Penicillium notatum*, pues en los extractos y especialmente en los polvos vegetales, que sirvieron de materia prima para la extracción de alcaloides, desarrollaba vigorosamente. Luego de numerosas pruebas llegamos a la conclusión de que el polvo de raíces de plantas del género *Berberis*, constituía uno de los medios de desarrollo más apetecidos por el hongo. Los extractos de *Berberis* eran igualmente aptos para alimentarlo.

Hicimos entonces un extracto acuoso por lixiviación en frío, de polvo de raíz de *Berberis multiflora*, planta esta que crece abundantemente en las estrivaciones del volcán Pichincha, contiguo a la capital. Previa esterilización de este extracto, sembramos las esporas de la cepa degenerada y comenzamos el control de su desarrollo. Al mismo tiempo sembramos otra porción de esporas en extracto sin esterilizar, y ambas clases de cultivo dejamos de propósito a la temperatura ambiente. Al siguiente día tuvimos la grata sorpresa de

observar, que la velocidad de desarrollo era realmente sorprendente, pues en vez de aparecer la tenue película miceliana sobre la superficie del líquido, teníamos por delante un grueso micelio de color blanco, cuya consistencia y aspecto correspondía propiamente al que debía presentarse en el tercer día. En los tres días subsiguientes se formó un micelio coriáceo, grueso y muy resistente. El color pasó rápidamente de verde azul a azul gris. Observadas las hifas micelianas al microscopio eran mucho más gruesas que las normales, la cantidad de aparatos esporíferos o escobas, había aumentado intensamente.

El número de cultivos hechos sobre extracto de *Berberis* esterilizado, era de ocho. En los seis, el desarrollo tenía los caracteres anteriormente anotados, pero en los dos restantes se había limitado el crecimiento del hongo a pequeñas zonas aisladas, y el resto de la superficie del líquido se hallaba cubierto de una capa opaca de color amarillento. Examinado al microscopio el contenido de la mencionada capa se apreciaba que estaba formado por una densa colonia de bacterias del género *Bacillus*. Un frotis de tales bacterias fue examinado por el señor doctor Benjamín Wandemberg, quien las indentificó como *Bacillus subtilis*.

Los cultivos hechos sobre extractos sin esterilizar presentaban un desarrollo aún más intenso del hongo, pues el cuerpo vegetativo o micelio, era coriáceo, grueso y muy arrugado. Examinado el caldo de cultivo al microscopio, se notaba también una intensa contaminación con *Bacillus subtilis*.

El poder antibiótico de los filtrados no intentamos siquiera probarlo, por cuanto, habiendo hecho los cultivos sobre extractos de *Berberis*, que contenían una apreciable cantidad de berberina, y siendo este alcaloide un maravilloso desinfectante, mal podíamos discriminar cual de las dos substancias efectuaba la acción

inhibitoria del estafilococo áureo, si la penicilina o la berberina. Además, nuestro objeto era ante todo tratar de regenerar la cepa del hongo, mediante una rotación de medios de cultivo. De esta suerte, tomamos las esporas de los frascos no contaminados con *Bacillus subtilis*, y las sembramos en líquido estéril de Hobby.

Hasta aquí obtuvimos una regeneración anatómica del *Penicillium notatum*, ya que el cuerpo vegetativo de la planta se había robustecido considerablemente, adquiriendo de nuevo su típica estructura coriácea, y su resistencia normal. Faltaba conocer si habíamos logrado la regeneración fisiológica, en cuanto a la capacidad de elaboración de penicilina.

Examinando cuidadosamente el desarrollo de la siembra de primera generación, proveniente de los cultivos sobre *Berberis*, anotamos las siguientes observaciones: desarrollo miceliano normal, curva de pH alterada, no se efectuó la caída a 4 o 3, sino que de 6 prosiguió subiendo a 7,5; pigmentación del filtrado casi nula; poder antibiótico incipientemente aumentado con una zona de clarificación de tres milímetros de amplitud.

Los resultados indicados nos demostraban claramente que no conseguimos la regeneración fisiológica en lo que se refiere a la capacidad de producción de penicilina, es decir, en fin de cuentas, no habíamos conseguido NADA. Las experiencias de regeneración por rotación de medios de cultivo duraron un mes. Un mes de gastar impunemente tiempo y paciencia.

Naturalmente, mi respetado auditorio sabe perfectamente que en términos cronológicos de investigación científica, un mes es un minuto. Pero mediaba la circunstancia de que yo necesitaba con suma urgencia disponer de filtrados de penicilina, lo suficientemente ricos para poder efectuar la extracción de la droga; ya que uno de los puntos del temario que remití a la Sección de Ciencias de la Casa de la Cultura, gentil

auspiciadora de esta conferencia, versaba precisamente sobre la extracción de penicilina. Pero si las cepas de *Penicillum notatum* disponibles habían perdido su poder de producción, ¿qué quedaba por hacer ante tal emergencia?

Había que poner en práctica las tres cualidades que aconseja el gran Pavlov en estos casos: primera, TENACIDAD, segunda, TENACIDAD y tercera TENACIDAD.

Hicimos una nueva revisión de la bibliografía disponible. Las publicaciones de Kolmer, Sokoloff, Chain, Duth, y varios artículos de la revista «Nature» nos iban proporcionando nuevos datos importantes sobre los factores de influencia en la producción de penicilina.

Entre éstos se señalaban la calidad del medio de cultivo, la cuidadosa esterilización de líquidos y recipientes, la constante aireación de los cultivos, etc.

Al fin llegamos a conocer los trabajos de Foster, que comenzaron a darnos la apetecida luz sobre este asunto. Foster dice lo siguiente:

«El factor decisivo para la producción de penicilina es LA POTENCIA DE LA RAZA de *Penicillum* que se use. Las influencias del medio de cultivo, aireación y robustez del hongo, son secundarias. Por causas hasta hoy desconocidas las razas de alta calidad pueden perder parcial o totalmente su capacidad de producción de penicilina, dependiendo esto, del número de transferencias de cultivo que se efectúen. Una buena raza conserva su potencia máximum hasta la tercera generación. Por consiguiente es necesario disponer de un stock o tronco genético permanente; para lo cual se debe guardar las cepas potentes en tierra vegetal a 0 grados. De este tronco genético se obtiene una segunda generación para verificar las siembras en gran escala, de las cuales se obtendrá a su vez, los filtrados aptos para la extracción de la droga». (Hasta aquí el Profesor Foster).

Tardíamente conocimos estas decisivas experiencias, pues, su aplicación a nuestros estudios sobre *Penicillium notatum*, nos habría evitado la pérdida de tres meses de labores infructuosas.

Afortunadamente conservábamos el tubo de ensayo, en el que nos mandaron la cepa B21-1249, desde los Estados Unidos. Para nuestra felicidad en las paredes del tubo se conservaba un resto del hongo del tamaño de una lenteja. En este resto había una veintena de esporas enquistadas, cubiertas de una recia membrana celular.

Con el máximo cuidado sembramos estas esporas en pequeñas porciones de caldo Hobby y Czapeck-Dox. Como era de esperarse germinaron normalmente, y lo que es más, todas las constantes de desarrollo, tanto químicas como morfológicas, correspondieron a su nobilísima estirpe, pues hay que tener en cuenta que la cepa B21-1249, es descendiente en línea directa del hongo de Fleming.

Al cabo de mucho tiempo tuvimos la suerte de constatar una correcta curva de pH, que comenzando en 6,5 bajó a 3,5 y siguió elevándose luego hasta 7,5; igualmente observamos sobre la superficie del hongo el áureo rocío formado por la exudación o gutación del micelio, el cual atestigua casi siempre una rica elaboración de penicilina. El filtrado tenía color áureo-rojizo intenso, y efectuada la prueba de capacidad inhibitoria, obtuvimos una clarificación de 16 milímetros de amplitud, en vez de los 2 o 3 milímetros observados anteriormente.

Indudablemente habíamos avanzado mucho en nuestro trabajo, pues ya disponíamos de una cepa de regular potencia, proveniente de esporas conservadas durante dos años.

Esta cepa vino a constituir el tronco genético o «master culture» que llama Foster a los cultivos madres

del hongo. De aquí teníamos que partir para efectuar los cultivos en grande escala que nos proporcionarían los filtrados extractivos de la droga.

A este nivel de nuestras investigaciones habíamos llegado a conocer, aunque en forma por demás ligera, los trabajos del Profesor Morey, conducentes a elevar la capacidad de producción de penicilina, desde dos o tres unidades Oxford por centímetro cúbico de filtrado, a 200 unidades; es decir un aumento de cien veces.

Según Morley este rendimiento puede obtenerse, tratando los cultivos de ciertas razas de *Penicillium notatum*, con determinadas cantidades de jugo de maíz.

Sin pérdida de tiempo hicimos los cultivos de segunda generación de nuestra «master culture», y en uno de los frascos añadimos un jugo de maíz sin esterilizar, elaborado conforme a una técnica personal, ya que no disponíamos de ninguna referencia al respecto.

Efectuadas las siembras en caldo Czapeck-Dox y colocando los cultivos en una estufa a 23 grados centígrados, proseguimos en los días subsiguientes el estricto control del desarrollo.

El pH del caldo era de 6,5 y en los días subsiguientes iba bajando aproximadamente media unidad, hasta que al séptimo día llegó a 3. El octavo día comenzó el retorno, llegando a 3,5.

El desarrollo de los micelios fué lento, pues sólo al tercer día se formó la capa blanca sobre la superficie del líquido. En los días siguientes iba aumentando en grosor y consistencia y el séptimo día comenzó a arrugarse y a colorearse de amarillo en los bordes.

Hasta aquí no se notaba mayor diferencia entre el cultivo hecho con jugo de maíz y los testigos sobre caldo Czapeck-Dox puro. El octavo día aparecieron tenues manchas de azul claro en el cultivo primeramente nombrado, en tanto que los testigos permanecían de color blanco cremoso. En realidad no se había dife-

renciado mayormente el aspecto de los micelios, pero el líquido tratado con jugo de maíz tenía más pigmentación amarilla que los testigos.

Nuestras labores de control tuvieron que suspenderse bruscamente, con motivo de la huelga estudiantil efectuada a comienzos del presente mes.

Sólo el día 8 de abril pudimos reiniciar nuestras actividades. La desesperante expectativa provocada por tantos días de abandono de nuestro trabajo, nos había colocado al borde del despecho. ¿En qué estado íbamos a encontrar nuestros cultivos que nos había costado tantas preocupaciones y esfuerzos?

Apenas ingresé al laboratorio me dirigí apresurado a la estufa, y al abrirla sentí un cálido estremecimiento a lo largo y ancho de mi pícnica humanidad, expresión emotiva de satisfacción plena e indescriptible regocijo.

Es que tenía por delante un fenómeno teratológico, en vez de un ejemplar normal de *Penicillium notatum*. El cultivo tratado con jugo de maíz, presentaba tales características de vigor, que estaba realmente inconocible.

El desarrollo de la planta era tan grande que por falta de espacio vital pugnaba por salirse por el cuello del frasco. La cantidad de exudado sobrepasaba los límites de todo lo previsto, pues en vez de las gotas de rocío crisogénico, aparecía sobre el micelio una nueva capa de líquido áureo, acumulada entre los valles de las enormes arrugas. El medio de cultivo había tomado una coloración amarillo-rojiza intensa, y presentaba un aspecto límpido. El envez del micelio tenía una intensa pigmentación amarillo-naranja, liso y resbaladizo como barriga de sapo.

El pH del medio de cultivo había llegado a 6, lo cual indicaba un aumento de media unidad diaria.

Al día siguiente verificamos la prueba definitiva, esto es, el control del poder antibiológico. Para el efecto, colocamos un centímetro cúbico de filtrado en la ca-

vidad circular del agar-agar con stafilococo áureo, y pusimos la caja de Petri en la estufa a 37 grados.

Ningún momento dudamos de la calidad de nuestro filtrado, pero cuando hicimos la constatación del poder antibiótico, nos encontramos con un resultado francamente insospechado. Usando un modismo vernáculo, diríamos que la potencia inhibitoria SE PASÓ CON FIGURA. La clarificación del agar-agar era total, en toda la capa, y sólo una pequeña porción que casualmente se había aislado del resto, y que por lo mismo no recibió la corriente de difusión del filtrado, aparecía la típica opalescencia determinada por la normal proliferación del stafilococo.

Hubiera sido deseable constatar el número de unidades Oxford, y correlativamente la concentración en penicilina del filtrado, pero esto era imposible, por cuanto no disponíamos de las copitas de vidrio estandarizadas que deben poseer dimensiones estrictamente fijas.

Caso de haber contado con los elementos necesarios, habríamos tenido que diluir el filtrado para que la zona de clarificación no salga de los límites de la capa de agar-agar, y entonces calcular, conforme al principio de que el cuadrado del diámetro de clarificación, crece en relación directa con el logaritmo de la concentración en penicilina. Luego con un segundo cálculo de las alicuotas establecidas en la dilución, podía deducirse la cantidad de unidades Oxford del filtrado, sobre la base de que una unidad equivale a 24 milímetros de diámetro de clarificación.

Los cultivos testigos que no habían recibido el jugo de maíz, presentaban constantes químicas y morfológicas completamente diferentes. La cifra de pH se había elevado tan sólo hasta 4, y de aquí no varió en absoluto. Este inexplicable estancamiento contrastaba con la paulatina elevación observada en el cultivo con jugo de maíz, el cual al 16avo día, tenía un pH cercano a 7.

El color del micelio en el cultivo problema, era azul verdoso, en cambio en los testigos permanecía blanco cremoso, con una mínima cantidad de exudado crisogénico en la superficie. El filtrado tenía fuerte pigmentación amarilla y era perfectamente transparente.

Controlado el poder antibiótico, se notaba una apreciable disminución en relación al de su tronco progenitor, pues la zona de clarificación tenía solamente 10 milímetros de amplitud.

No cabía duda que la clave del mejoramiento de la potencia productora, residía en el tantas veces nombrado jugo de maíz, el cual hacía verdaderos milagros.

También quedaba comprobado que en la tercera generación del tronco genético, se perdía la potencialidad de producción de penicilina, en no pequeña cantidad.

Damos aquí por terminado el relato descriptivo del primer punto del temario de nuestra conferencia, relativo al cultivo del *Penicillum notatum*.

Sin hacer alarde de capacidad técnica que no la poseemos y lejos, muy lejos de una exhibición pretenciosa de autosuficiencia, me atrevo a decir que la constancia nos condujo a la culminación de nuestras aspiraciones investigatorias, hoy poseemos las normas operatorias indispensables, para obtener filtrados de gran rendimiento. Disponemos asimismo de una raza de *Penicillum notatum* de alta calidad, proveniente de la primera generación de la cepa B21-1249, cultivada como la mejor entre 200 razas estudiadas por el profesor Raper.

Antes de proseguir adelante, y bajo el mandato de elementales principios de corrección, tenemos que consignar nuestro fervoroso agradecimiento para el señor doctor Muggia, prestante técnico de los Laboratorios «LIFE», quien nos hizo el gentil obsequio de los cultivos de estafilococo áureo, sin los cuales no habríamos podido controlar la potencia de producción de nuestros hongos. Este proceder ejemplar, da la medida del ele-

vado espíritu de comprensión humana, que informa la conducta de los verdaderos hombres de Ciencia.

Acabamos de hacer una escueta y quizá pesada relación de observaciones de orden morfológico químico bacteriológico del desarrollo de *Penicillum notatum*, pero no hemos establecido ninguna conexión entre los fenómenos constatados. Es pues, necesario tratar de buscar sus relaciones lógicas, por limitadas que fueren, para dar base científica a los resultados obtenidos.

Al respecto podrían plantearse las siguientes cuestiones:

¿Por qué degeneran las cepas con la sucesiva transferencia de cultivos? ¿Por qué se aumenta el rendimiento de penicilina con la simple adición de un poco de jugo de maíz?

Para contestar a la primera pregunta es necesario establecer primeramente el estricto significado del concepto DEGENERACIÓN. Conforme a una acepción biológica pura, la degeneración consistiría en una pérdida de potencialidad vital, por falta de crecimiento normal del soma o por disminución del poder germinativo de los elementos reproductores.

De acuerdo con una acepción antropocéntrica y por tanto utilitaria, la degeneración consistiría en la pérdida de la capacidad de producción de penicilina.

Relacionando estos principios con nuestras experiencias, podríamos afirmar que las cepas improductivas no habían degenerado biológicamente, casi todas crecieron rápidamente y produjeron abundante cantidad de esporas. Además, el poder germinativo de éstas era grande, pues desarrollaban en diferentes substratos orgánicos, tales como polvos y estratos vegetales de varias clases. En resumidas cuentas, para cumplir su ciclo ontogénico normal, es probable que a *Penicillum notatum* no le interese elaborar o no penicilina.

Pero entonces debería preguntarse, ¿qué significado biológico tiene la penicilina en el metabolismo de los hongos que la producen?

Si nos atenemos al criterio teleológico o finalista que domina en las escuelas biológicas clásicas, nos sería fácil contestar a la pregunta; pues simplemente diríamos que la penicilina es un elemento de defensa de los organismos que la producen. A este respecto transcribimos a continuación un acápite, de un artículo publicado en la Revista «Investigaciones de hoy», que expresa lo siguiente:

«Los organismos vivos se protegen de sus enemigos de varias maneras. Ellos pueden apropiarse del espacio vital o de la reserva alimenticia, más pronto que sus vecinos; el consumo metabólico puede hacer variar las condiciones de pH, presión osmótica y tensión superficial en el medio ambiente, de modo que los organismos MENOS TOLERANTES no pueden crecer; o también pueden excretar sustancias que interfieran el proceso metabólico, en forma tal, que su crecimiento sea retardado, completamente suprimido, o por fin mueran. Esta última forma de actividad es la que conocemos con el nombre de actividad antibiótica».

El anterior razonamiento aparentemente lógico, puede ser discutido en varios puntos. En primer lugar se expresa que el consumo metabólico hace variar las condiciones de presión osmótica, tensión superficial, etc., de modo que los organismos MENOS TOLERANTES no puedan crecer, en cuyo caso solo éstos serían afectados por la actitud defensiva del organismo. Pero en realidad de verdad los organismos MENOS TOLERANTES devienen simplemente en víctimas de un medio creado, SIN MALA INTENCIÓN, diríamos, por parte del organismo a quien por nuestra propia cuenta le asignamos una actividad defensiva; y sólo con sujeción, eso sí, rígida e

ineludible, al establecimiento de determinados niveles energéticos.

Por otra parte, los organismos TOLERANTES del medio, que siguen disputando el espacio vital y la reserva alimenticia, y que, por lo mismo, siguen siendo enemigos, conviven en perfecta paz y mantienen sus fronteras biológicas con el organismo que trata de defenderse, formando una ASOCIACIÓN DE ESPECIES UNIDAS, algo así como una ONU biológica.

La penicilina comparte naturalmente, de este limitadísimo poder defensivo, y solo destruye los organismos MENOS TOLERANTES. Aún más, un mismo organismo puede a veces tolerar la presencia de penicilina, en otras ocasiones no, y lo que es más grave todavía, en ciertas condiciones NO TOLERA LA VIDA del hongo que la produce.

El bacillus subtilis, por ejemplo, se comporta en la forma últimamente indicada. En nuestras experiencias de rotación de medios de cultivo hemos observado todos los casos. En el mismo medio de cultivo contaminado con bacillus subtilis sembramos la misma cepa de penicillum notatum, repartida en varios frascos. En unos desapareció la bacteria contaminadora, en otros casi desapareció el hongo, en algunos crecieron los dos organismos con asombrosa vitalidad.

Es suficiente que una bacteria elabore una determinada cantidad de ácido para-amino-benzoico, para que la acción antibiótica de la penicilina quede totalmente bloqueada. Pero la misma clase de bacteria puede o no elaborar el mencionado amino-ácido, y si lo hace, pueden variar las cantidades; dependiendo todo esto de circunstancias químicas y energéticas presentes, que a nuestro juicio, no tienen mayor conexión con actitudes ofensivas o defensivas de los organismos productores.

Además, de acuerdo con datos que pueden deducirse de la estructura química de la penicilina, y su pro-

bable proceso de formación, es posible afirmar que la adquisición de la estructura molecular activa, se haga sin intervención del metabolismo del hongo, sino en forma independiente.

Sintetizado el ácido penicilloico que es inactivo, sobreviene una autoesterificación de su molécula, por saturación de un oxhidrilo proveniente del grupo carboxílico, con un hidrógeno del grupo amínico, eliminándose así una molécula de agua. Pero este proceso de esterificación se verifica espontáneamente en muchos ácidos aminados. Según veremos más adelante, al tratar de la parte química, la estructura molecular antibiótica adquiere la penicilina por su propia cuenta, mediante el gasto de su reserva energética disponible.

A esta altura de nuestro razonamiento, debemos aclarar, que no negamos que ciertas sustancias ACTUEN como medio defensivo de los organismos que la producen. Lo que si discutimos, es que exista una APTITUD PREESTABLECIDA en los organismos vivos, para elaborar armas químicas ofensivas o defensivas, durante su PROCESO METABÓLICO.

Podemos concluir pues que con la transferencia de cultivos, no sobreviene una degeneración biológica, sino simplemente una pérdida de la capacidad de producción de penicilina. Pero ahora cabría preguntar, ¿por qué se pierde esta capacidad?

Como antecedente debemos indicar que el proceso metabólico de los organismos heterótrofos, esto es de los que no tienen posibilidad de verificar síntesis orgánicas, se reduce en gran parte a un mecanismo de DEGRADACIÓN de los grandes edificios moleculares (glúcidos, lípidos y proteínas) que constituyen el substracto nutritivo sobre el cual vegetan.

Esta degradación se hace mediante clivajes, hidrólisis o dismutaciones, provocados por la presencia y actividad de ese par de «tigres sueltos», que así podrían

llamarse los iones H y OH, que devoran los más sólidos edificios moleculares.

En el curso de la degradación se establece una cadena de reacciones, o lo que también se llama «una cascada de reacciones». Los eslabones de la cadena son sendas especies químicas de variadísimas clases, que como términos de una serie progresiva, sólo pueden formarse a condición de la preexistencia de sus predecesores químicos inmediatos. Por lo tanto, el último término de la cadena no puede existir sin que se haya formado el primero.

Naturalmente, dado el sinnúmero de sustancias nutritivas disponibles, no se formará una sola cadena sino varias. Estas se tienden, diríamos, entre el organismo y el substracto nutritivo que va degradándose paulatinamente. Un cambio que sobrevenga en la estructura molecular del substracto nutritivo, repercute necesariamente en los eslabones o especies químicas más inestables. Ahora bien, siendo la penicilina un simple eslabón de la cadena, y muy inestable por cierto, es lógico que un continuado cambio del medio nutritivo, vaya interliriendo paulatinamente su formación, hasta suprimirla por completo. Los caldos artificiales usados como medio de cultivo del *Penicillum notatum*, llegan pues a desnaturalizar la cadena de reacciones, establecida en el proceso metabólico general.

Quizá la esterilización de los caldos usados como medio de cultivo, tenida hasta hoy como factor positivo del rendimiento, sea una de las causas determinantes de la pérdida de capacidad de producción, más adelante insistiremos sobre ésto.

Ahora pasaremos a la otra pregunta: ¿por qué se aumenta el rendimiento de penicilina, con la simple adición de un poco de jugo de maíz?

Con relación a este punto, vale la pena exponer los detalles de un fenómeno observado en el curso de

una experiencia, hecha con el objeto de mejorar las razas de *Penicillum notatum*.

Basándonos en el principio de que toda semilla o espora necesita pasar una etapa de desarrollo al aire libre y bajo la influencia de los cambios meteorológicos determinados por las estaciones, habíamos dejado un poco de caldo de Hobby, en un recipiente destapado, para que se contamine con las esporas que flotan en la atmósfera de nuestro laboratorio. En efecto, a los pocos días comenzó a formarse una capa fungosa en la superficie del líquido. Pasado el tiempo pudimos reconocer que en el caldo había dos especies de hongos: *MUCOR MUCEDO* y *Penicillum notatum*. La mayor parte del espacio vital había sido ocupado por el segundo de los nombrados, en tanto que *Mucor mucedo* ocupaba sólo una pequeña porción en la parte central de la superficie líquida.

En su respectiva zona de ocupación, ambas especies crecieron vigorosamente, y lo más curioso e interesante fué, que casi toda la masa del líquido presentaba una tenue coloración amarillenta, en la zona circular de separación de las dos especies, había una intensa pigmentación aureo-rojiza, signo inequívoco de la formación de penicilina.

De acuerdo con esta experiencia, es probable que uno de los estímulos decisivos para la elaboración de penicilina, sea la convivencia con determinadas especies de hongos, siempre que no llegue a alterarse el desarrollo normal del *Penicillum*.

El jugo de maíz en la forma que nosotros lo preparamos, debía estar constituido por glúcidos, proteínas y grasas, la mayor parte en estado coloidal; más las sales minerales, vitaminas y otros compuestos que sería largo enumerar.

El hecho de mantenerse en estado coloidal los principales compuestos alimenticios, lo conceptuamos de de-

cisiva importancia, por cuanto ésta es la forma en que deben ceder los substractos naturales, su aporte alimenticio al hongo que vegeta sobre ellos.

Los hongos crecen sobre restos alimenticios, o vegetales descompuestos, siempre que haya la suficiente humedad. Esta humedad es la que verifica la hidrólisis, junto con los fermentos coexistentes. Y a su vez la hidrólisis debe verificar una degradación molecular limitada, que mantenga a los compuestos en estado coloidal. Esto no lo decimos por simple suposición, sino porque al preparar un extracto acuoso de materias vegetales, lo que se obtiene en realidad es un sistema coloidal mezclado con soluciones verdaderas. Cuando se hierve un extracto acuoso, se obtiene gran cantidad de coacervados y geles.

De lo expresado podemos deducir que el metabolismo de *Penicillium notatum* frente a sistemas coloidales, tiene que ser muy distinto del que se verifica frente a soluciones verdaderas. Los caldos artificiales, tales como el de Zapek-Dox, Hobby, etc., son simples soluciones de glucosa o sacarosa junto con sales minerales. El único caldo que contiene proteínas al estado coloidal es el de Fisher, que se lo prepara con CASEINA HIDROLIZADA. Este caldo es, desde luego uno de los mejores para obtener alto rendimiento en penicilina.

Como conclusión podemos expresar, que la cadena metabólica de *Penicillium notatum*, portadora del eslabón PENICILINA, se establece probablemente con seguridad y estabilidad, cuando el medio de desarrollo contiene glúcidos, proteínas y grasas en estado coloidal.

Hay otro dato importantísimo de consignarse, y es el siguiente:

En el jugo de maíz sobrante luego del tratamiento, que lo mantuvimos de propósito perfectamente protegido de contaminaciones externas, apareció después de algunos días, una tenue capa algodonosa, blanca azulina, la

cual examinada al microscopio reveló estar constituida por una colonia de hongos, de difícil identificación. Después de insistentes observaciones llegamos a suponer, con las reservas del caso, que la colonia estaba formada por dos especies del grupo conocido con la nominación de HONGOS IMPERFECTOS u HONGOS BACTERIAS.

Hay que anticipar que el caldo de maíz usado por nosotros, no fué esterilizado en autoclave, por cuanto en las referencias obtenidas a este respecto, no se indicaba tomar tal precaución. Entonces, en nuestro cultivo tenía que crecer el *Penicillium notatum* junto con estos hongos imperfectos. No pudimos hacer una constatación definitiva de este hecho, pues al tiempo que examinamos el micelio de *Penicillium notatum*, no encontramos ninguna huella de otros hongos. Pero teniendo en cuenta que la mayor parte de los hongos imperfectos, no pueden resistir vivos en un pH, inferior a 4, y recordando, asimismo, que durante el desarrollo normal del *Penicillium notatum*, se verifica una caída de pH hasta 3, es dable suponer que los hongos imperfectos tenían que morir y desaparecer del cultivo, inmediatamente después de establecida esta cifra. Como este pH aparecía al séptimo día, se puede afirmar que durante todo este tiempo convivieron los hongos imperfectos con *Penicillium notatum*, disputándose el medio nutritivo, y degradando los edificios moleculares en comunidad de esfuerzos, tal como sucede o debe suceder en el orden natural.

Para concluir este punto expresaremos, que la adición de jugo de maíz a un cultivo de *Penicillium notatum*, significa conformar un medio de desarrollo con características similares al que brinda la Naturaleza, y esto puede ser la causa del insospechado aumento de potencia productora de penicilina.

EXTRACCION DE LA PENICILINA

Según gráfica expresión del Dr. Coghill, prominente especialista norteamericano en micología, «la obtención de Penicilina es muy parecida a la búsqueda de una aguja en un pajar».

No es difícil concordar con esta afirmación, si tenemos en cuenta que un filtrado de buena calidad, contiene en solución apenas 6 miligramos por cada 100 c.c., lo que equivale a 1 gramo por 16 litros.

Sin embargo, la extracción no demanda operaciones de alta técnica científica, ni mucho menos, sino mucha paciencia, y eso sí, una extremada atención en el curso de las manipulaciones químicas.

Nosotros hemos adoptado el método de los especialistas doctores Abraham y Chain, inglés y ruso respectivamente, cuyo fundamento relatamos a continuación:

Se agota la solución acuosa del filtrado con acetato de amilo, cuidando previamente de bajar el pH de la mencionada solución a 2, mediante la adición de ácido fosfórico. Luego, de la solución amilica se reextrae la penicilina con agua, cuyo pH debe mantenerse entre 6 o 7, mediante la adición de agua de barita muy diluida. Después se vuelve a pasar la penicilina a otro solvente orgánico, tal como éter, por ejemplo, pero bajando primeramente a pH 2 la solución acuosa. Esta solución etérea se le hace pasar por una columna de adsorción, constituida por óxido de aluminio. En la columna se efectúa una adsorción, selectiva y se forma por tanto un cromatograma de varios colores. Se separa luego mecánicamente la porción de la columna correspondiente al amarillo claro, recibéndole en fosfato amortiguador, que tenga un pH 7. Luego se leviga el óxido de aluminio con algunas porciones de amortiguador, hasta que quede completamente incoloro. Los levigados amarillos de la solución fosfatada se les tra-

ta con ácido fosfórico hasta obtener pH 2, y se les agota nuevamente con éter.

Las traslaciones de la penicilina de las soluciones acuosas a los solventes orgánicos, y de éstos a la columna de adsorción, se repiten dos veces.

Después se trata la solución acuosa con amalgama de aluminio, con el objeto de reducir las subsistencias pirogénicas.

Luego se repite los pasos del agua al solvente orgánico, pero ya no a éter sino a acetato de amilo. La solución amilica es pasada nuevamente por la columna de absorción, tantas veces cuantas sean necesarias para obtener un color homogéneo, tenuemente amarillo.

Por fin la solución acuosa llevada a pH 5 mediante la adición de agua de barita, se le deseca a alto vacío, y se le guarda en refrigeradora.

En esta forma queda preparada la sal bárica de Penicilina.

Si en vez de agua de barita utilizamos solución diluida de sosa, se forma la sal sódica. Y si evaporamos directamente la solución amilica, tendremos la penicilina en forma de ácido libre.

Como se ve el método es en sí sencillo, pero su aplicación práctica nos ha significado grandes dificultades, especialmente por no disponer de substancias perfectamente puras.

Me permitiré exponer las incidencias de la extracción verificada por nosotros, con los escasos medios que nos ha sido dable disponer. En lo posible iremos explicando la razón de cada tratamiento químico, por lo cual ruego a mis respetados oyentes, el favor de su paciencia.

Antes de filtrar el líquido de cultivo, sacudimos el frasco insistentemente, con el objeto de que el exudado de la superficie del hongo, se incluya en la masa líquida en forma completa.

Verificada la filtración es necesario refrigerar al líquido, hasta llevarlo rápidamente a una temperatura de 4 grados centígrados. Esto lo conseguimos fácilmente añadiendo al hielo cloruro de amonio en polvo. Luego seguimos añadiendo lentamente, gota por gota, una solución de ácido fosfórico siruposo al 10⁰/₀, controlando el pH en cada adición. Este control lo hacíamos con un pequeño colorímetro de papel, que tiene una gama de pH del uno al once.

Después de añadir cerca de 1¹/₂ c.c. de ácido fosfórico se llega a obtener el pH 2, que en la tabla colorimétrica corresponde a un color rojo intenso. Esta cantidad de ácido fosfórico es suficiente para hacer bajar desde pH 7 a pH 2, a medio litro de filtrado que estábamos utilizando en la extracción.

La razón para hacer descender al pH, de 7 a 2, nos imaginamos que se deba a que, teniendo la penicilina un coeficiente de disociación o pK, igual a 2,8; el mismo coeficiente de sus sales debe ser más bajo. Ahora bien, en el filtrado debe encontrarse la penicilina en forma de sal, entonces para desalojarle, tenemos necesariamente que establecer un pH inferior al coeficiente de disociación de la sal, es decir, inferior a 2,8.

En este estado se añade igual volumen de acetato de amilo, es decir 500 c.c., y se traslada la mezcla a un embudo de separación. Inmediatamente la capa de acetato de amilo se tiñe de amarillo de oro, en tanto que la capa acuosa va tomando una coloración pardo rojiza, turbia. Se mantiene la mezcla en contacto durante media hora, en la cual se invierte repetidas veces el embudo de separación, volviendo a situarle alternativamente en su posición normal. No se debe sacudir el embudo porque se forma una emulsión demasiado estable, que impide la separación de los dos líquidos conforme a su densidad.

Después de la última inversión del embudo, se deja en reposo durante 15 minutos, y se efectúa la separación de la capa amílica, la cual es recibida en otro embudo de separación.

Luego se toma 100 c.c. de agua destilada y por adición agua de barita TREINTA NORMAL se le lleva a pH 6.

Quizá por la cloronización nuestras aguas destiladas acusan un pH de 4,5 a 5.

El agua así tratada se le añade a la solución de acetato de amilo, e inmediatamente se colorea de amarillo rojizo. Después pierde el tono rojizo quedando solamente amarillo claro.

En este estado hay que efectuar una delicadísima manipulación, que consiste en ir añadiendo el agua de barita, en cantidades de una décima de c.c. cada vez. Después de una adición se invierte el embudo y luego de volverlo a su posición normal, se le deja en reposo. La capa acuosa se colorea al principio de pardo rojizo y luego va transformándose lentamente en amarillo naranja.

Conforme se siguen haciendo las sucesivas adiciones se va decolorando la capa de acetato de amilo, y a su vez coloreándose más intensamente la capa acuosa. Las últimas adiciones de agua de barita hay que hacerlas por gotas, y además hay que suspender la operación antes de que la capa amílica esté completamente decolorada; existe el peligro de que si se añade una gota de agua de barita y no hay penicilina disuelta en la capa amílica, sobrevenga una tumultuosa precipitación, acompañada de la completa decoloración de la mezcla, lo cual revela indudablemente una completa alteración o más bien destrucción de la penicilina. Esto nos sucedió una vez, dañándose en un momento lo que nos costó quince días de trabajo.

Cuando ya la capa amilica está casi incolora, se deja la mezcla en reposo durante quince minutos.

Entonces se separa la capa acuosa que tiene un color pardo con intensa fluorescencia roja, se le filtra y se le trata con medio gramo de carbón animal.

La decoloración sobreviene instantáneamente y el líquido acuoso conserva solamente un tono amarillo limón.

En este momento puede apreciarse con relativa certidumbre, si las operaciones verificadas anteriormente son correctas; pues caso de no haberse establecido con precisión las cifras de pH, o de haber incurrido en cualquier otro error, la decoloración por medio del carbón animal es completa, lo cual revela la ausencia de penicilina.

La solución amarillo limón, previamente filtrada se le lleva luego a 4 grados centígrados y se añade la cantidad de ácido fosfórico suficiente para establecer un pH 1,9.

Como se notará, cada vez que se debe poner a la solución de penicilina en pH bajo, hay necesidad de refrigerarla. Esta precaución es indispensable por cuanto la estabilidad está en razón inversa del pH y de la temperatura.

Establecida la cifra de acidez iónica correspondiente, se pone la solución problema en un embudo de separación y se le extrae con 33 c.c. de éter previamente enfriado.

Apenas mezclado el éter con la solución acuosa, hay que sacudir fuertemente el embudo de separación, y entonces comienza a colorearse la capa etérea en un tono amarillo ligeramente rosado. Caso de no aparecer esta coloración, es señal de que no se ha establecido bien la cifra de pH.

Si con la adición de una gota de ácido fosfórico comienza a tomar calor el éter, quiere decir que recién

se ha llegado a poner la solución en pH 2; pero si al añadirle la gota no aparece ningún color, es signo de que se ha sobrepasado la acidez iónica, y entonces puede tenerse el trabajo por perdido, ya que a pesar de que con la adición de agua de barita se puede hacer subir el pH, la penicilina se ha destruido en un cincuenta por ciento.

Se hacen tres extracciones con éter, de modo que sumadas las cantidades utilizadas, igualen el volumen del líquido acuoso, es decir 100 c.c.

Esta solución etérea hay que pasarla a través de la columna de adsorción constituida por óxido de aluminio.

Aquí hemos llegado a la operación más interesante de todo el proceso extractivo.

La aplicación de la adsorción selectiva como medio de purificación de especies químicas, es uno de los más importantes e ingeniosos procedimientos con que cuenta la técnica contemporánea.

Es por todos conocido que por determinados factores de polaridad eléctrica y de masa, la fase dispersa de una solución iónica o molecular puede adherirse fuertemente a las amplias superficies que presentan los cuerpos porosos y pulverulentos, siempre que éstos tengan la inercia química suficiente para no efectuar combinaciones estables con la substancia absorbida.

El óxido de aluminio participa de esta cualidad, y lo que hace es captar temporalmente la penicilina y los otros colorantes que le acompañan, pero en forma selectiva.

Ocupada una zona de superficie por tal colorante, los demás son repelidos hacia la parte inferior de la columna y se absorben ordenadamente conforme a sus características específicas de polaridad y masa. Entonces llega a constituirse una gama de colores en sucesión vertical, es decir un CROMATOGRAMA.

De acuerdo con las referencias del método seguido, el cromatograma debe estar constituido por cuatro zonas diferentemente coloreadas. La primera en café obscuro, que contiene poca cantidad de penicilina; la segunda en amarillo claro, que contiene la totalidad de la droga; la tercera en amarillo limón, con mínima cantidad, y la cuarta en púrpura, sin penicilina.

En ninguna de las cuatro operaciones de extracción que hemos verificado nosotros, hemos obtenido las cuatro zonas indicadas en el método de Abraham y Chain. En un paso de la columna obtuvimos tres, y en los tres restantes solamente dos. En el que obtuvimos tres, las características del cromatograma eran las siguientes:

Primera zona de color café claro; segunda amarillo claro, y tercera, amarillo limón. En los que obtuvimos dos colores solamente, estos eran amarillo claro en la primera zona y amarillo limón en la segunda.

La solución etérea después de atravesar la columna de óxido de aluminio presentaba coloración amarillo rosado, prueba inequívoca de que la adsorción no era completa, y razón suficiente para que el cromatograma no se haya formado correctamente.

Esta grave anomalía la inculpamos a la falta de pureza del óxido de aluminio usado; pues examinando los cristales al microscopio, constatamos una película blanquecina, amorfa, debido probablemente a un proceso de hidratación.

Con el objeto de purificar la substancia, le sujetamos a una calcinación, dentro de la misma columna, y así logramos obtener el cromatograma de tres colores.

Otra de las causas de la anomalía anotada pudo ser la falta de presión del líquido etéreo y también la falta de refrigeración de la columna; como es sabido, la adsorción está en razón directa de la presión, e inversa de la temperatura.

Para separar la zona amarillo claro, que es la que contiene la mayor cantidad de penicilina, empujamos por su parte inferior, todo el contenido de la columna de adsorción, recibiendo solamente la zona que nos interesaba en fosfato amortiguador a pH 7.

El amortiguador lo preparamos según la fórmula de Sorensen, mezclando soluciones de fosfato monosódico y de fosfato dipotásico, en la concentración que indican las tablas de amortiguadores.

El fosfato amortiguador actúa como tal, debido a que los tres hidrógenos del ácido fosfórico tienen diferente coeficiente de disociación iónica, en cuyo caso la neutralización del segundo hidrógeno del fosfato monosódico se hace en condiciones específicas de pK. Aun más, cuando el pK o coeficiente de disociación se iguala al pH de la solución, se suspende momentáneamente la neutralización, es decir que en la curva de saturación se establece una meseta. En estas condiciones la solución SE RESISTE a cambiar de pH, y sólo con gran cantidad de neutralizante, es decir, en el caso presente, de fosfato dipotásico, se satura completamente.

Ahora bien, la penicilina permanece en la columna en pH 2, y al llevarle bruscamente a pH 7, se destruiría. Pero recibéndole en el amortiguador, si cabe la expresión, SE LE PROPORCIONA GRADAS, para que suba con la requerida lentitud a la cifra de neutralidad.

Nosotros recibimos la parte amarilla de la columna de adsorción, en 10 c. c. de amortiguador. Nuestra columna tenía 20 cms. de largo por 8 milímetros de diámetro, y la zona de penicilina tenía apenas cuatro centímetros de largo.

En contacto con la solución amortiguadora se decolora el polvo de óxido de aluminio, a su vez aquella se colorea de amarillo inmediatamente. Dejando en reposo unos quince minutos se separa por decantación el líquido amarillo y se añade una nueva porción de

fosfato amortiguador. Tres levigaciones fueron suficientes para extraer toda la penicilina absorbida.

Los levigados amarillos cuyo volumen llegaba, una vez reunidos, a 50 c. c., tratamos con ácido fosfórico hasta establecer pH 2 y extrajimos con éter. Luego del éter trasladamos la penicilina al agua llevada a pH 6 por adición de agua de barita. De aquí nuevamente pasamos a éter, y la solución etérea hicimos atravesar nuevamente por la columna de adsorción. En esta vez el cromatograma presentaba sólo dos colores: amarillo claro y amarillo limón. La zona amarillo limón tenía solamente dos centímetros y medio de largo, y el líquido etéreo después de atravesar la columna conservaba color amarillo claro.

Claramente se podía apreciar que en cada paso de columna se iba perdiendo penicilina, por cuanto la adsorción no era cuantitativa.

Recibido el polvo de alúmina en fosfato amortiguador, se decoloró sólo con una adición de la solución fosfatada, lo que también indicaba pérdida de substancia. Ante esta circunstancia, no nos quedó otra cosa que suspender el proceso extractivo, pues aún nos faltaban tres pasos de columna; y por tanto en el último paso, era probable que la penicilina nos dé con la ausencia.

Con el anhelo de ver a la penicilina, aunque sea algo impura, en estado seco, extrajimos de la solución amortiguadora con éter y dejamos a la solución etérea a evaporación espontánea. Como era natural el residuo de evaporación no quedó seco, pues el éter debía hidratarse por haber permanecido en contacto con el aire y la solución fosfatada. En el fondo del baloncito que contenía la solución etérea quedó un residuo acuoso, de color fuertemente amarillo, en forma de gotas transparentes.

Este pequeñísimo residuo sujetamos a la acción de una bomba eléctrica aspirante, para obtener la deseca-

ción completa. Después de tres horas de permanencia a baja presión, no se secó el residuo. Se redujo eso sí muchísimo, pero conservaba agua, presentando una consistencia semisólida.

Este resultado era ya esperado por nosotros, por cuanto la penicilina en solución acuosa pierde fácilmente el 98 % de agua, pero el 2 % restante es sólo posible extraerle al alto vacío, y con mecanismo de captación química del agua. Esto se consigue en el aparato llamado LIOFILIZADOR, que es el que se usa en todos los laboratorios y plantas de extracción industrial.

Como el baloncito estaba tarado, controlamos el peso por diferencia, obteniendo la cantidad de doce miligramos.

Como nosotros partimos para la extracción, de medio litro de filtrado, debíamos obtener aproximadamente 30 miligramos de penicilina pura, pero en los dos pasos por la columna de adsorción habíamos perdido más de un 50 % de la droga.

En las extracciones de laboratorio se obtiene generalmente un gramo por cada 16 litros de filtrado, y como en los cultivos de superficie se usan recipientes de 200 c. c. de capacidad, se necesitarían 80 frascos para obtener un gramo de penicilina.

El tamaño de la columna de adsorción preconizado en el método seguido por nosotros, es de 50 centímetros de largo por 1 y medio de diámetro. Nosotros utilizamos columnas de 20 centímetros de largo por 8 milímetros de diámetro, teniendo en cuenta la cantidad de filtrado extractivo, que era sólo de 500 c. c. El volumen del cual debe partirse para usar columnas de 50 centímetros de largo, debe ser de 2.000 c. c.

En vía de información indicaremos que en la actualidad se extraen en 21 plantas industriales norteamericanas, 130 kilogramos de penicilina por mes, equivalentes a 200.000 millones de unidades Oxford.

Para alcanzar estas cifras astronómicas, no se usan cultivos de superficie, (pues se necesitarían cientos de miles de recipientes); sino cultivos de profundidad. La raza de *penicillum notatum* N°. 832, se desarrolla muy bien en el fondo de los recipientes, bajo grandes capas de caldo nutritivo.

En las grandes plantas industriales, los tanques de cultivo tienen capacidad para 45.000 litros de caldo; y las columnas de adsorción son de seis a ocho metros de alto por uno de diámetro.

Esto sólo puede hacerse en los Estados Unidos, el pueblo de los grandes éxitos y de los grandes errores. Ponemos término aquí, al segundo punto del temario.

QUIMICA DE LA PENICILINA

Antes de continuar adelante, debo hacer presente mi sincera gratitud para los señores doctores Javier Bustos, Director del Laboratorio Municipal; Eduardo Goeschel, Profesor del Colegio Mejía; Luis Andrade, propietario de los Laboratorios «Helio»; y Sres. César Carrillo, Profesor del Colegio Mejía y Armando Villalva, Ayudante del mismo Colegio; quienes me han prestado decidida cooperación en los trabajos que acabo de presentar; proporcionándome substancias, aparatos, líquidos valorados, etc., sin los cuales me hubiera sido imposible efectuar mis experiencias.

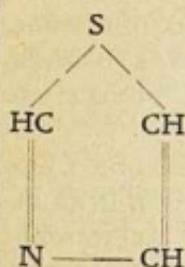
La penicilina es un ácido monobásico que tiene un pK igual a 2,8. Su constitución química es muy semejante a la de los colorantes TIAZOICOS del grupo de las POLICROMINAS.

Con el objeto de describir las características funcionales, me voy a permitir hacer un esquema de la posible formación de la penicilina, partiendo del TIAZOL.

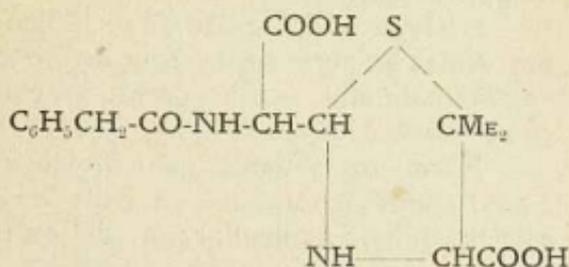
El TIAZOL combinado con un ácido aminado del grupo de la fenilalanina, forma una TIAZOLIDINA, la cual posee además dos grupos metílicos y un carboxilo. Esta

PENICILINA

THIAZOL

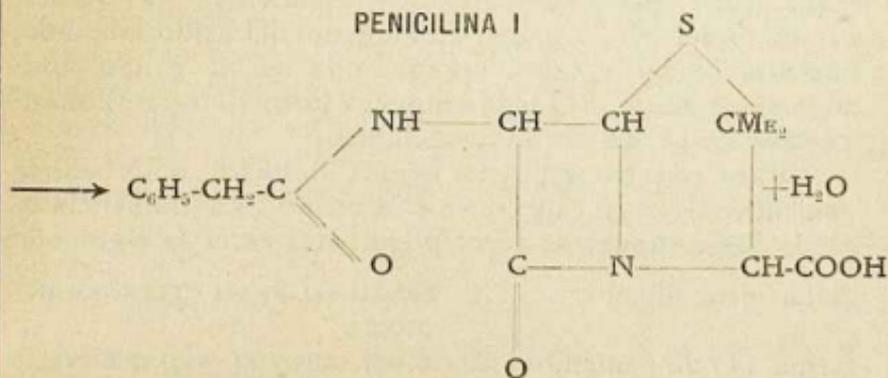


ACIDO PENICILLOICO



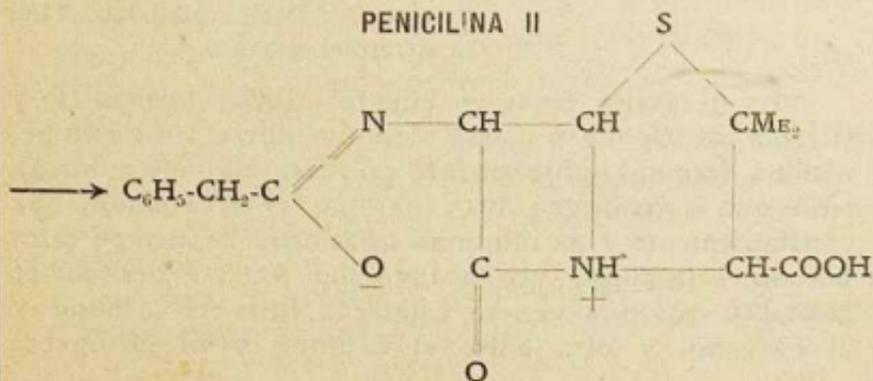
LACTAMA DEL ACIDO BENCIL-DIMETIL-THIAZOLIDINDIOICO

PENICILINA I



AZOLACTON-LACTAMA DEL ACIDO BENCIL-DIMETIL-THIAZOLIDINDIOICO

PENICILINA II



THIAZOLIDINA no es otra cosa que el ácido PENICILLOICO, que se forma por hidrólisis de la penicilina, al ser tratada por álcalis.

Derivados del ácido penicilloico han sido obtenidos por síntesis, pero hasta hoy no se conoce si la fórmula del mencionado ácido corresponde a la que consta en el esquema («Nature» pág. 766).

Formado el ácido penicilloico sobreviene una LACTAMIZACIÓN (fenómeno corriente en las THIAZOLIDINAS de este tipo), por neutralización del oxhidrilo del ácido aminado (proveniente de su carboxilo), con el H del grupo amidógeno del THIAZOL. Posteriormente la LACTAMA formada, sufre una LACTONIZACIÓN incipiente, por desplazamiento del H del grupo amidógeno del ácido aminado, hacia el N del THIAZOL, regenerando así el grupo amidógeno de aquél. Queda entonces formada una AZOLACTONLACTAMA del ácido penicilloico.

Para nuestro esquema hemos tomado como base la penicilina G, cuyo radical es el BENZIL. La nomenclatura de los compuestos correspondientes sería la siguiente:

Ácido penicilloico BENZIL - DIMETIL - THIAZOLIDIN -
DIOICO
forma (I) de penicilina G ... LACTAMA DEL ÁCIDO BENZIL -
DIMETIL - THIAZOLIDIN DIOICO
forma (II) de penicilina G ... AZOLACTONTACTAMA DEL
ÁCIDO BENZIL - DIMETIL - THIAZOLIDIN - DIOICO.

Es necesario tener en cuenta que las formas (I) y (II) no corresponden a dos fórmulas diferentes de la penicilina (como impropriadamente expresan algunos autores), sino que constituyen UNA PAREJA TAUTÓMERICA, que constantemente y en mínimas fracciones de tiempo cambia su estructura, provocando un SALTO del enlace ENOLICO, que una vez se establece entre el carbono y el oxígeno, y otra entre el carbono y el nitrógeno.

Como es sabido, la ENOLIZACIÓN alternativa provoca UNA GRAN CAÍDA ENERGÉTICA, en cada formación del doble enlace.

Además en la forma (II) puede notarse su estructura de ION HERMAFRODITA, apto para hidrolizarse y transformarse en la forma estable e inactiva, es decir en ÁCIDO PENICILLOICO. (Es de advertir que la fórmula del ácido penicilloico tal como aparece en el esquema, no corresponde a la realidad, pues, es propiamente un ESTEREOISOMERO del mencionado ácido, es decir SU IMAGEN DE ESPEJO, cambiada de propósito para facilitar la demostración).

Para terminar la parte química debemos indicar que existen varias penicilinas, según el radical que acompaña a las formas tautoméricas (I) y (II). Nuestro modelo corresponde a la penicilina G, que tiene el radical BENZILO. La penicilina F tiene radical PENTENILO; la X tiene radical HIDROXIBENZILO; la K tiene HEPTILO, y la DEHIDROXIPENICILLINA tiene radical AMILO.

Todas las penicilinas pueden formar sales con calcio, sodio, bario y otros metales, por esterificación de su carboxilo.

MECANISMO ANTIBIÓTICO DE LA PENICILINA

Este interesantísimo problema bioquímico, hemos escogido como tema de discusión, por cuanto tiene la amplitud suficiente, para ser apreciado desde varios puntos de vista, como pueden ser, el bacteriológico, terapéutico y químico.

Además, hasta hoy no se ha dicho la última palabra al respecto, y existen por lo tanto varias teorías de la acción antibiótica, cada una con diferente fundamento científico.

Para proceder a la discusión del tema creo necesario exponer primeramente algunos datos informativos,

sobre el antibiotismo en general, y sobre la acción específica de la penicilina en particular.

Comenzaremos transcribiendo lo que dice sobre el tema el Profesor John Kolmer.

«El término ANTIBIÓTICOS se emplea para designar sustancias producidas por las células vivientes, que tienen capacidad para destruir otras células vivientes. En un sentido estricto por consiguiente, todos los agentes antimicrobianos producidos por células vivas animales o vegetales, son antibióticos, incluyendo no solamente la penicilina, gramicidina, tirocidina, clavacina, quinina y clorofila, y otras sustancias de origen vegetal; sino también la lysozima, lactenina, bacteriófago, y otras sustancias de origen animal, incluyendo los anticuerpos, desde que aquellos son agentes químicos específicos, producidos por las células animales vivas.

Desde este punto de vista los antibióticos pueden definirse como: «agentes antimicrobianos producidos por células vivas» aunque el término es ahora usado en un sentido más restringido, definiéndolo de esta otra manera: «agentes microbianos producidos por células vivas de bacterias, levaduras, hongos y otras plantas».

Hasta aquí el profesor Kolmer.

En nuestra desautorizada opinión, la definición peca por demasiada generalización de los conceptos. Creemos que para llamar antibiótica a una sustancia, no sólo es necesario que sea antimicrobiana, sino que lo sea de cierto modo. Hay muchas sustancias de origen vegetal que obran como antimicrobianos, ya sea coagulando las proteínas de las bacterias, como los tanoídes, o adsorviéndose en la membrana, como la berberina; pero estas formas de actividad no se incluyen en el antibiotismo.

Además al decir: «agentes microbianos producidos por hongos, bacterias y OTRAS PLANTAS; no se limita el grupo vegetal que produce los antibióticos, el cual

está realmente circunscrito a los vegetales HETEROTROFOS, es decir, a los que carecen de los pigmentos detectores de la energía solar, y por lo tanto no pueden verificar síntesis orgánica.

Parece que la acción antibiótica en un sentido estricto, significa una interferencia en el metabolismo celular, bloqueando en una u otra forma, las reacciones EN CADENA, características de aquel proceso bioquímico.

En cuanto a la acción específica de la penicilina, me voy a permitir exponer, opiniones de varios autores, añadiendo un ligero comentario personal.

En un artículo de la Revista NATURE se lee lo siguiente:

«Desde tiempos de Fleming ya se conservó un poder bactericida en la Penicilina, y no sólo bacteriostático como antes se creía.

«El efecto bactericida parece estar restringido a las bacterias jóvenes, o a las que se están alimentando intensamente; es decir este efecto está regulado por determinados factores del desarrollo bacteriano.

«Fleming en su referencia original sobre penicilina, recordaba haber encontrado un bajo poder bactericida sobre el *Stafilococo* áureo, y un poder citolítico en determinadas condiciones.

«Chain y Duth explicaban que la original observación de los trabajadores de Oxford, de que la penicilina es intensamente bacteriostática, estaba basada en el hecho de que ella no afectaba la obtención de oxígeno de los *estafilococos* en estado de reposo. Ellos pusieron a desarrollar en solución Ringer, un cultivo de *Stafilococo* áureo, y después de someter a incubación con Penicilina durante 24 horas, encontraron un gran número de colonias viables».

Hasta aquí la Revista.

Esta fué una de las primeras experiencias que revelaron, que la penicilina no es bacteriostática, sino

bactericida. Parece pues que se atribuyó la suspensión de la proliferación bacteriana, a la penicilina; cuando en realidad se debía al normal estado de reposo, o fase de descanso, que tienen las bacterias después de su fase logarítmica de multiplicación.

Quizá la sugerencia de Chain y Duth, de que durante la fase de reposo no es afectada la obtención de oxígeno, pueda tener esta otra explicación, cual es, de que en estado de reposo las bacterias necesitan una mínima cantidad de oxígeno, por cuanto en la mencionada fase todas las funciones metabólicas están normalmente disminuidas, diríamos en estado latente.

Continúa la Revista.

«Chain y Duth entonces revisaron los trabajos hechos en los Estados Unidos, los cuales demostraban que la penicilina es bactericida, pero NO cuando las condiciones de desarrollo del Stafilococo eran desfavorables (por ejemplo baja temperatura y exigüidad del medio nutritivo) y que el efecto bactericida puede crecer, mediante sustancias que eleven el ritmo del crecimiento bacteriano y decrecer mediante sustancias que interfieran ese crecimiento.

«Partiendo de los resultados de sus propios trabajos, Chain y Duth concluyen que durante la fase de reposo del Stafilococo, aun grandes cantidades de penicilina no afectan la obtención de oxígeno. Pero durante la primitiva fase retardada (es decir cuando se inicia la fisiparidad) y especialmente durante la fase logarítmica (esto es, cuando se establece un intervalo mínimo y fijo de tiempo entre cada división) la penicilina tiene un fuerte poder inhibitorio, y puede obturar completamente la obtención de oxígeno, aun en concentraciones de CUATRO CENTÉSIMAS de unidad Oxford por c. c.».

Aquí termina la transcripción de la Revista NATURE.

Según el contenido de la exposición que antecede, se puede afirmar que la penicilina interfiere directamente la función respiratoria de las bacterias.

Se ha expresado que la obtención de oxígeno se ve afectada, especialmente durante la fase logarítmica de la proliferación bacteriana, en la cual puede obturarse por completo la entrada de oxígeno. En resumen, se ha afirmado que las bacterias mueren por asfixia.

Pero ¿cómo podría explicarse la acción bactericida en las bacterias anaerobias?

Para apreciar la forma concreta como actúa la penicilina, es pues necesario conocer con algún detalle el proceso químico de la respiración vegetal.

En general se cree que la función respiratoria se reduce a una combustión del carbono de los carbohidratos, por combinación con el oxígeno atmosférico con la correspondiente eliminación de anhídrido carbónico. Por esto se ha dicho que «la vida es una LLAMA».

Sin embargo, esto está fuera de la realidad, pues en ningún momento se acercan siquiera el oxígeno y el carbono, mucho menos se combinan para formar anhídrido carbónico.

El proceso respiratorio consiste en una compleja degradación de los glúcidos, mediante clivajes, hidrólisis y dismutaciones, provocadas por fermentos específicos.

El oxígeno no es, de ningún modo el primer actor de la comedia, sino un característico de segundo orden. Actúa como deshidrogenante y forma el agua que se elimina junto con el anhídrido carbónico; pero su propia cosecha energética es mínima, en relación a la que recoge por trabajo ajeno. Aun en la respiración aerobia, el oxígeno cumple sólo una pequeña parte del proceso. Esto lo demostraremos en la explicación de gráficos.

Por lo dicho anteriormente, no se puede afirmar que la penicilina afecta solamente a la obtención de oxígeno. Hablando con más propiedad debería expre-

sarse, que bloquea la cadena de reacciones, verificadas en la degradación de los glúcidos. El bloqueo puede verificarse de dos maneras, ya sea por combinación de la penicilina con los cofermentos, a los cuales inactivaría; o porque aquella se apropia de los iones H y OH, que son los OBREROS del proceso respiratorio, pues ellos efectúan los clivajes, hidrólisis y dismutaciones, actuando como capataces, los fermentos.

Podría preguntarse, por qué se inhibe la fisiparidad o multiplicación de las bacterias?

Para contestar la pregunta, hay que tener en cuenta que mientras los glúcidos contenidos en el jugo celular, conservan su integridad molecular, la presión osmótica es pequeña; pero apenas se completa la degradación por la función respiratoria, la presión aumenta intensamente, y correlativamente a este aumento, se inicia una corriente endosmótica provocando una turgescencia celular; pero esta turgescencia tiene límites precisos, alcanzados los cuales, se efectúa inmediatamente una división celular.

En el metabolismo bacteriano, la degradación de los glúcidos (o respiración en otros términos) la absorción de alimentos, y la fisiparidad, son funciones de inmediata concomitancia; por lo tanto la suspensión de la proliferación bacteriana, es consecuencia del bloqueo de la función respiratoria.

Según el Dr. Weishimer de la Universidad de Iowa, la penicilina impide la carboxilación del ácido pirúvico, penúltimo término de la cadena respiratoria, impidiendo de este modo la terminación del proceso.

El hecho de que las bacterias jóvenes sean las más afectadas, se explica por la mayor intensidad de su función respiratoria, y correlativamente por su necesidad de absorber substancias alimenticias en mayor cantidad que las bacterias envejecidas.

La acción antibiótica de la penicilina depende pues, de su estructura química. Siendo como es un ión hermafrodita en su forma tautomérica II, tiene capacidad para combinarse con los compuestos anfóteros, cuales son las albúminas de los fermentos.

Además la energía radiante liberada por los sucesivos pasos de enolización puede ser también causa de su acción antibiótica.

Pero sobre todo, en nuestra desautorizada opinión, la acción específica reside en su avidez química por los iones H y OH, los cuales son los factores activos para establecer las reacciones en cadena, propias del metabolismo celular.

La falta de toxicidad de la penicilina puede deducirse de una de sus cualidades específicas, cual es, LA DE ACTUAR SELECTIVAMENTE SOBRE CÉLULAS EN FASE LOGARÍTMICA DE MULTIPLICACIÓN. Por lo tanto, dado que en la multiplicación celular, los tejidos del organismo humano, NO SE ESTABLECE JAMÁS UNA FASE LOGARÍTMICA, la penicilina tiene que ser inocua.

POSIBLE MECANISMO DEL BLOQUEO DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA POR LA PENICILINA

Es por hoy aceptado que todas las reacciones químicas del metabolismo de los seres vivos, pueden reducirse a tres tipos, que son los siguientes:

CONDENSACIÓN, o sea soldadura de especies químicas por intermedio de sus átomos de carbono, con su antagónica CLIVAJE, es decir partición por átomos de carbono; POLIMERIZACIÓN o soldadura por átomos de nitrógeno con eliminación de agua, y su contraria HIDROLISIS o sea ruptura por átomos de nitrógeno con inclusión de agua, y por último, DISMUTACIÓN, esto es,

oxireducción simultánea de dos especies químicas o de dos moléculas de la misma especie, frente a los iones del agua.

En los dos últimos tipos hay intervención directa de los iones H y OH, en tanto que en el primero hay sólo una transposición de los elementos del agua dentro de la molécula condensada o clivada. (En algunos clivajes hay sin embargo, eliminación de agua).

Portadores de los iones del agua son los fermentos o enzimas, cuyo carácter anfótero añadido a la facilidad con que se desplazan sus puntos isoeléctricos, les permite ceder o captar los mencionados iones, bajo débiles influencias energéticas. Además intervienen portadores de electrones, tales como la FEOHEMINA, el GLUTATION y en general todos los citocromos; que DESPRENDEN, si cabe la expresión, los iones H y OH y les impulsan a saltar de una especie química o radical funcional a otros.

En la función respiratoria intervienen naturalmente todos los tipos indicados, y la cadena de reacciones es la siguiente:

Comienza por la hidrolisis de los termogenéticos, tales como el almidón, azúcar, etc., los cuales mediante la acción enzimática de la diástasa y la invertasa se transforman en las hexosas normales, glucosa y fructosa. Esta reacción es reversible.

Luego intervienen las fosfatasas y determinan la esterificación fosfatada de los monosacáridos; cuyo núcleo cíclico PIRANICO se transforma en FURANICO por enolización, quedando así constituidas las fructosas GAMA. Esta reacción es también reversible.

Las fructosas GAMA sufren un clivaje mediante la intervención de la GLICOLASA y pueden transformarse ya sea en aldehído pirúvico o en aldehído glicérico, según se trate de organismos aerobios o anaerobios.

Quedan así constituidos los substractos respiratorios: el aldehído pirúvico para la respiración anaerobia y el glicérico para la aerobia.

RESPIRACION

Carbohidratos
Almidón
Azúcar

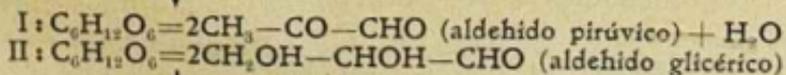
Hidrolisis por
Diastasa, invertasa

Hexosas normales
Glucosa
Fructosa

Activación por esterificación fosfatada
Piranosa }
Furanosa } Isomerización enólica
γ Fructosa }

Heterohexosas
Furanosa
γ Fructosa

Glicolisis por
Glicolasa (Clivaje)



Substractos respiratorios
Aldehído pirúvico
Aldehído glicérico

una molécula de aldehído acético y a otra de ANHIDRIDO CARBÓNICO.

Por último (en las levaduras) una molécula del substracto aldehído pirúvico junto con otra de aldehído acético, sufren una dismutación frente a una molécula de agua, formando una molécula de alcohol y otra de ácido pirúvico.

RESPIRACIÓN AEROBIA

En este proceso la cadena de reacciones es más compleja, y partiendo del substracto aldehído glicérico, se establece en la forma siguiente:

Por acción de la dehidrogenasa el aldehído glicérico que es realmente una TRIOSA, pierde dos hidrógenos y se transforma en aldehído pirúvico. Estos dos átomos de hidrógeno se combinan luego con los PIGMENTOS RESPIRATORIOS, los cuales no son otra cosa que QUINONAS, cuya presencia en las células vegetales es constante.

Las quinonas se combinan con el hidrógeno proveniente de la TRIOSA y se transforman en polifenoles, substancias éstas que también abundan en el reino vegetal; esta reacción es reversible.

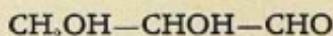
Después por acción de la oxidasa, y desde luego, con intervención directa del OXÍGENO, se oxidan los polifenoles, regenerándose así las quinonas y formándose agua oxigenada.

Posteriormente, por acción de la peroxidasa se forma monóxido de hidrógeno y oxígeno libre, el cual oxida a otra molécula de polifenol, regenerándose la quinona y eliminando una molécula de agua.

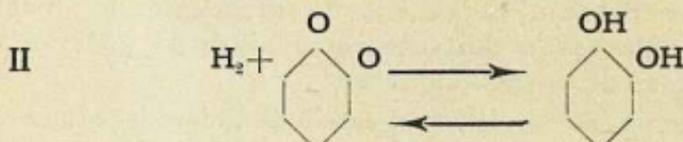
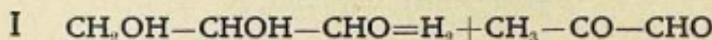
De otra parte, el aldehído pirúvico formado por deshidrogenación de la triosa, prosigue una transformación semejante a la que se efectúa en la respiración

anaerobia, y así, mediante una dismutación de dos moléculas, frente a otras dos de agua, se transforma en una molécula de ácido pirúvico y en otra de glicerina.

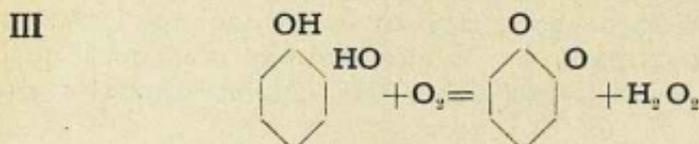
AEROBIA



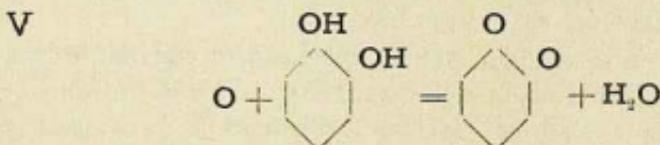
Por acción de dehidrogenasa



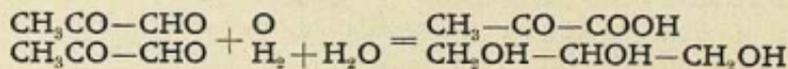
Por acción de la oxidasa



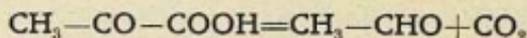
Por acción de la peroxidasa



Por dismutación de CANNIZARO



Por acción de la carboxilasa



Por último, el ácido pirúvico por acción de la carboxilasa, se transforma mediante clivaje, en aldehído acético y anhídrido carbónico.

Es importante observar, en el curso de la cadena de reacciones, que el anhídrido carbónico se forma por CARBOXILACIÓN del ácido pirúvico, tanto en la respiración aerobia como en la anaerobia. Es falso pues, que el anhídrido carbónico se forma por acción del OXIGENO DEL AIRE frente al carbono de los termogenéticos, como se expresa en las obras elementales de biología o botánica. Como expresamos anteriormente al tratar del bloqueo de la función respiratoria efectuado por la penicilina. EN NINGÚN MOMENTO SE ACERCA EL OXÍGENO ATMOSFÉRICO AL CARBONO DE LOS TERMOGENÉTICOS, mucho menos se combina con aquél, para formar el anhídrido carbónico.

Además, nótese que en la respiración aerobia, se efectúan propiamente dos cadenas de reacción. En una de ellas interviene el oxígeno, pero exclusivamente como DESHIDROGENANTE DE LOS POLIFENOLES, dando peróxido o monóxido de hidrógeno. La otra es similar a la que se efectúa en la anaerobia. La respiración aerobia es, pues, propiamente MIXTA.

Relacionando la función respiratoria (en lo referente a la intervención de los iones H y OH) con la acción posible de la penicilina en el bloqueo de la función respiratoria, cabe hacer el siguiente razonamiento.

Todo el proceso respiratorio se verifica por intervención de los iones H y OH. A su vez, la forma (II) de la pareja tautomérica que constituye la penicilina, está AVIDA de iones H y OH para conquistar su forma estable e inactiva que es el ácido penicilloico. Entonces, no es lógico suponer que entre la penicilina y las sustancias que establecen la cadena respiratoria, existe

una verdadera DISPUTA por captar los tantas veces mencionados iones? ¿Y que aquí puede residir el secreto de su acción terapéutica?

Pero cabría esta otra pregunta, ¿por que la penicilina sólo mata a las bacterias en fase logarítmica de multiplicación?

Quizá podría contestarse diciendo que en la fase logarítmica, la velocidad con que se establece la cadena respiratoria, es muy superior a aquella con que se efectúa en la fase de reposo; y por lo mismo, la necesidad de disponer iones H y OH , ES MÁS IMPERIOSA en el primer caso. Tan imperiosa que, si en una UNIDAD DE TIEMPO no están presentes tantos iones, TODO EL PROCESO QUEDA BLOQUEADO.

Para terminar indicaremos que según últimas concepciones al respecto, la parte más afectada de la cadena, es la DISMUTACIÓN PREVIA A LA FORMACIÓN DE ACIDO PIRÚVICO, tanto en la respiración aerobia como en la anaerobia.

INDICE:

	<u>Págs.</u>
Preliminares	7
Extracción de la Penicilina	28
Química de la Penicilina.....	38
Mecanismo Antibiótico de la Penicilina.....	41
Posible Mecanismo del Bloqueo de la Función Respiratoria por la Penicilina	47

Se acabó de imprimir, el
día VIII de Julio de
MCMXLVII en los Talleres
Tipográficos de la Univer-
sidad Central, siendo Rec-
tor de ella el Sr. Dr. Julio
Enrique Paredes C. y Re-
gente de la Imprenta el
Sr. Dn. Alberto Araujo Z