UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

"METODOS DE PRODUCCION DE TIROTRICINA"

Trabajo de Tesis
para optar al grado
de
Doctor en Bioquímica y Farmacia
por

NELLY M.I.MERCERE

1950

"AÑO DEL LIBERTADOR GENERAL SAN MARTIN"

Padrino de Tesis

Prof. Dr. Zenón Mariano Lugones

El presente trabajo se realizó en los laboratorios O.C.E.F.A.(Buenos Aires) y en el laboratorio Tecnológico de esta Facultad.

Métodos de producción de Tirotricina

I) Introducción

II) Generalidades sobre antibióticos. Monografía sobre el estado actual del tema.

III) Parte experimental.

A) Cultivo de Bacilo brevis

Origen de la cepa

Estudio del medio de conservación de la cepa

Estudio del medio de desarrollo de la cepa

B) Producción de Tirotricina

1) Producción por cultivo en superficie

a) Ingluencia de la fuente nitrogenada

b) Influencia del pH del medio

c) Influencia de factores accesorios

2) Producción por cultivo en profundidad

a) Planeo del aparato de fermentación

b) Puesta a punto del fermentador

1) Análisis de las operaciones de carga

2) Estudio de la esterilización de la carga

3) Control de la marcha de la operación tipo

c) Estudio de la producción de tirotricina con modificaciones del medio

IV) Métodos de control de la producción de tirotricina

Método bacteriológico

Método químico

V) Conclusiones.

VI) Bibliografía

I

INTRODUCTION

INTRODUCCION

El Doctorado en Bioquímica y Farmacia requiere, como coronación del plan de estudios, la presentación de una tesis a través de la cual el alumno pueda reflejar, en un trabajo de investigación, los conocimientos asimilados en el transcurso de su carrera.

Esta labor, modesta, muy modesta en todos sus aspectos, encierra los mejores afanes puestos al servicio de una finalidad útil y práctica. De ella, justo es decirlo, no cabía esperar un descubrimiento o un hallazgo sensacional en el campo científico; menos aún, no se pretendía agotar un tema múltiple en sus posibilidades. Sin renunciamientos se han sobrellevado todas las dificultades y al final, como saldo favorable, se ha gustado de la pequeña, pero reconfortante, satisfacción del deber cumplido. Si el camino recorrido sirve de referencia para otros que andan por la misma senda y si los propósitos y los deseos de quienes confiaron en mi tarea no han sido defraudados, se habrá recompensado, sobradamente, todo el esfuerzo realizado.

La elección del tema y la dirección de la tesis pertenecen al Profesor Dr. Zenón Lugones que supo, con inigualable empeño, guiarme en todos los momentos de mi labor,

Sean estas palabras testimonio de reconocimiento a su valiosa colaboración, a su saber y a su caballerosidad de hombre de bien. Quiero expresar mi agradecimiento a los Laboratorios O.C.E.F.A., de Buenos Aires, que, gentilmente, estuvieron a mi disposición y en los cuales realicé, en gran parte, mis investigaciones con la inestimable guía del Dr. Oscar Mündel, a cargo de la Sección Bacteriología, de quién recibí oportunos consejos y enseñanzas. Allí también colaboró, eficazmente, en las determinaciones químicas, el Dr. Mario Moglia, de la Sección Control. En esta Facultad, la doctora Alice Manini facilitó, amablemente, la búsqueda bibliográfica.

A ellos y a todos los que de una u otra manera han participado de mis inquietudes les hago llegar, nuevamente, mi agradecimiento sincero por todo cuanto han hecho, moral y materialmente, para que se realizaran mis aspiraciones. Este trabajo les pertenece tanto como a quién tuvo el honor de concretarlo. Tal es el pensamiento y el sentir, sin alardes de falsa modestia, de quién siempre puso sus anhelos al servicio del bien común.

II

MONOGRAFIA SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ANTIBIOTICOS CON ESPECIAL DESARROLLO DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE TIROTRICINA

A N T I B I O T I C O S

I. ANTECEDENTES

Los efectos antagónicos de un organismo sobre otro fueron ya observados por varios investigadores en los comienzos de la microbiología y en tal sentido se recuerdan tres ejemplos notables mencionados por Waksman (1):

Tyndall, en 1876, observando bacterias y hongos que crecían en cultivos naturales, en medios orgánicos, pudo hablar de la lucha por la existencia entre la "Bacteria" y el "Penicillium", comprobando que en algunos tubos la "Bacteria" producía un pigmento verde que, generalmente, mataba al "Penicillium".

Un año después, en 1877, Pasteur comprobó que al adicionar "ciertas bacterias comunes" a un medio de cultivo que contenía Bacillus anthracis, se producían modificaciones en las propiedades patógenas del germen y hasta se inhibía su crecimiento. Pensó que este antagonismo podía ser útil para combatir enfermedades, pero fué necesario que transcurrieran muchos años para que se cumplieran las presunciones del gran sabio francés.

En 1879, De Bary recalcó el significado de las interrelaciones antagónicas entre microorganismos, cuando dos microorganismos crecen en el mismo substracto, tarde o tempra-

no uno triunfa sobre el otro y lo mata.

Por otra parte, Babes (2) en 1885 estudió este fenómeno y demostró que la acción antibacterial era debida a la formación de sustancias de composición química definida. Dos años más tarde, en 1887, Garré (3) introdujo el método de las diluciones seriadas para poner en evidencia la acción antagónica de un organismo sobre otro.

La primera aplicación práctica del antagonismo bacteriano fué la utilización, en los tanques sépticos, de gérmenes saprófitos de la putrefacción para destruir los gérmenes patógenos provenientes de las aguas cloacales, tratamiento que recibe el nombre de "depuración biológica".

Cuando Koch, en 1881, introdujo en la práctica microbiológica los medios de cultivo sólidos facilitó a los microbiólogos el aislamiento, el estudio morfológico, comportamiento, etc. de diferentes gérmenes pertenecientes a la flora bacteriana del suelo. Gran número de trabajos fueron realizados llegando a la conclusión de que, en general, no debe considerarse al suelo como reservorio de gérmenes patógenos, pues en su mayor parte, los microorganismos que caen a él son destruídos a corto plazo por la flora existente en el mismo Dichos gérmenes mueren, o pierden su virulencia, ya sea por que las condiciones del medio no les son favorables o por existir una flora antagónica, pudiendo citarse, como ejemplo,

el agente productor de la lepra, los bacilos tíficos, disentérico o coli, aborto epizoótico de los bovinos, virus patógenos, etc. Es necesario excluir, sin embargo, los bacilos esporulados como el B.tetánico, gangrena gaseosa, carbón y el B. botulínicus que conservan sus propiedades patógenas en esas condiciones.

Podemos considerar, también, como un ejemplo de antagonismo bacteriano al bacteriófago (4) descubierto por D'Herelle quién lo consideró un organismo vivo submicroscópico semejante a los virus. En cambio, Bordet consideraba a este agente como una enzima. El bacteriófago (5) ejercería su acción antagónica introduciéndose en el protoplasma de otro germen y lo destruiría por acción lítica.

Metchnikoff suponía que el organismo envejecía como consecuencia de la producción de sustancias tóxicas originadas por la flora normal del intestino. Basado en estas suposiciones se ocupó del estudio de los fermentos lácticos, e introdujo, en terapéutica, el lactobacillus bulgaricus. Colocado en leches modificadas actuaba no sólo por medio del ácido láctico que producía sino, también, por la formación de sustancias especiales. Años más tarde fué reemplazado dicho germen por el Bacillus acidophilus (fermento láctico) bajo forma de leche cuajada, o en cultivos, para que se implantara el microorganismo en el intestino y los ácidos producidos por es-

tos fermentos, originaran un medio desfavorable para el desarrollo y supervivencia de las salmonellas y de los bacilos disentéricos.

2. CONCEPTO MODERNO

Desde que el término (6) "bios" significa vida o materia viva, "antibiótico" es negación o destrucción de la vida o materia viva.

Waksman (7) (8) y otros sugirieron, en 1942, el término "antibiótico" y "efecto antibiótico" en conección con agentes antibacterianos de origen microbiano. Los antibióticos son definidos (9) en la siguiente forma: Son sustancias antimicrobianas producidas por microorganismos, a menudo el sentido de este término ha sido ampliado para incluir sustancias análogas producidas por seres superiores vegetales o animales.

Kolmer (6) dice: "Agentes antimicrobianos producidos por células vivas", ahora el término antibiótico se usa en un sentido mucho más estricto: "son agentes antimicrobianos producidos por bacterias, levaduras, hongos y otros vegetales vivos".

Fhilo (10) los define así: "Entendemos como sustancia antibiótica toda sustancia orgánica producida por microorganismos no patógenos, que ejerce su acción impidiendo el crecimiento o la actividad de un segundo microorganismo cuando se halle presente en un medio apropiado para elcrecimiento o para la actividad normal de ese segundo microorganismo".

3. ANTIBIOTICOS MAS IMPORTANTES

Consideraciones cronológicas

No obstante haberse aislado una gran cantidad de antibióticos sólo pocos se usan como agentes terapéuticos; como ejemplos merecen citarse la penicilina, estreptomicina, tirotricina, neomicina, cloromicetina y aureomicina.

Sin considerar su importancia práctica, sino, más bien, siguiendo un orden cronológico, se expondrán los descubrimientos más importantes.

Bouchard (11) en 1889 observó que la Pseudomonas pyocyanea era antagónica de otras especies bacterianas. La primera aplicación terapéutica fué hecha por Emmerich y Löw (12) en 1899, utilizando cultivos de Pseudomonas pyocyanea, que contenían piocianasa que, suponían de naturaleza enzimática y podía curar el antrax experimental.

En 1913, Alsberg y Black (13) describieron otra sustancia antibiótica que denominaron ácido penicílico y era producida por el Penicillium puberulum y Penicillium cyclopium (14). Dicho antibiótico tenía acción limitada contra gérmenes Gram positivos y negativos siendo, también, activo contra levaduras.

Wrede, F. y Strack, E. (15) en 1924, extrajeron piocianina, al estado cristalino, de cultivos de Pseudomonas pyocyanea. Fué activa contra ciertos gérmenes Gram (+) y (-).

Gratia y Dath (16), en 1924, describieron la actinomicetina producida por cepas de Actinomyces. Los organismos productores de actinomicetina han recibido muchas denominaciones, la adoptada recientemente es la de Streptomyces albus G en honor a Gratia (17). Este antibiótico es eficaz contra ciertos microorganismos Gram positivos y negativos.

Fleming (18), en 1929, descubrió en forma casual la penicilina importantísimo agente quimioterapéutico producida por una cepa de hongos, Penicillium, identificada más tarde como Penicillium notatum. Este antibiótico actúa sobre gérmenes Gram positivos y algunos Gram negativos.

Hetherington y Raistrick (19), en 1931, aislaron del Penicillium citrinum, la citrinina, eficaz sobre bacterias Gram positivas.

Weindling y Emerson (20), en 1936, aislaron del Trichoderma lignorum, la gliotoxina, en forma cristalina, que ejercía su acción sobre gérmenes Gram positivos y negativos. También actuaba sobre algunos hongos.

Anslow y Raistrick (21), en 1938, describieron

la fumigatina un producto metabólico elaborado por el Aspergillus fumigatus, sustancia que actuaba sobre ciertos gérmenes patógenos de especies Gram positivas.

Dubos (22), en 1939, después de pacientes investigaciones, describió un nuevo antibiótico eficaz contra gérmenes Gram positivos, agente denominado tirotricina y elaborado por el Bacilo brevis.

Waksman y Woodruff (23), en 1940, aislaron del suelo una especie de Actinomyces que pertenecía al tipo de Actinomycetes cromógenas. Poseía gran poder bacteriostático y bactericida y fué denominado Actinomyces antibioticus. Del cultivo de este hongo aislaron, una sustancia activa, que, luego al estado cristalino, fraccionaron en dos y las denominaron Actinomicina A y B. Ambas eran antagónicas de gérmenes Gram positivos y negativos, siendo también fungistáticas.

Los mismos investigadores, Waksman y Woodruff (24), en 1942, aislaron del Actinomyces lavendulae, la estreptothricina que es activa contra gérmenes Gram positivos y negativos.

También en 1942 se aisló la claviformina, agente eficaz contra gérmenes Gram positivos, Gram negativos y algunos hongos. La claviformina deriva del Penicillium claviforme y fué descripta por Chain, Florey y Jennings (25).

Al año siguiente, en 1943, de cultivos de una cepa de Aspergillus flavus, White y Hill (26), aislaron una sustancia cristalina, el ácido aspergíllico, activo contra ciertas bacterias Gram positivas y negativas. Bush y Goth (27), en el mismo año y del mismo hongo, obtuvieron una sustancia que denominaron flavicina, la cual ejercía una acción más marcada que la penicilina sobre determinados organismos Gram positivos.

Chain, Florey, Jennings y Williams (28), aislaron del Aspergillus fumigatus el ácido helvólico, bajo forma cristalina, eficaz contra gérmenes Gram positivos. Philpot (29), también en 1943, señaló la presencia del ácido gigántico antibiótico semejante a la penicilina, y producido por el Aspergillus giganteus.

Trascendental fué el descubrimiento de la estreptomicina hecho por Waksman y Schatz (30) (31), en 1944 obtenida de dos cepas de Streptomyces griseus. La estreptomicina posee actividad "in vitro" contra gérmenes Gram positivos y negativos. Ejerce sobre el Mycobacterium tuberculosis, especialmente de la cepa humana una potente acción bactericida y bacteriostática. También es activa contra Ps.aeruginosa, Serratia marcescens y Bacilo mycoides no ejerciendo en cambio acción contra hongos. Desde el punto de vista toxicológico diremos que la toxicidad de este antibiótico es extremadamente débil.

La estreptomicina, industrialmente (32) y (33) se obtiene en cultivos aereados-agitados y cristaliza como sal doble de estreptomicina.

Mac Kee, Rake y Houck (34), en 1944, aislaron n del Aspergillus flavus una sustancia con propiedades biológicas semejantes a la penicilina y que denominaron flavicidina. Esta poseía gran actividad contra organismos Gram positivos y relativa eficacia contra bacilos Gram negativos.

Jansen y Hirschmann (35), aislaron la subtilina una sustancia antibacterial producida por el bacilo subtilis, activa contra bacterias Gram positivas y ciertos hongos patógenos.

Gause y Brazhnikova (36), en 1944, aislaron de un gérmen del suelo, aerobio y esporulado un nuevo agente bactericida, al estado cristalino, y lo denominaron Gramicidina S. Más tarde Sharkova y Brazhnikova (37) identificaron al germen productor del antibiótico como perteneciente a una sub-especie del bacilo brevis y que denominaron variedad Gause-Brazhnikova. La gramicidina S ejerce su acción bactericida sobre especies Gram positivas y algunas Gram negativas con la particularidad de conservar esta propiedad aún en presencia de caldo nutricio, suero y sangre humana. Es eficaz sobre el bacilo disentérico pero, en general, no posee acción contra los bacilos del gru-

po tífico y para tífico.

De diferentes cepas pertenecientes al grupo B. subtilis en cultivos superficiales, además de la subtilina ha sido aislada la bacitracina por Johnson, Anker y Meleney (38) Esta ejerce su actividad contra microorganismos Gram positivos y algunos Gram negativos tales como el neumococo y el meningococo.

Carter, Gottlieb y Anderson (39), aislaron un nuevo antibiótico, Chloromicetina, de un Streptomyce estrechamente relacionado con el Streptomyces lavendulae, productor de la streptotricina. La chloromicetina (40) es elaborada por el Streptomyces sp. en cultivos aereados sumergidos y se obtiene bajo forma cristalina. Ejerce su acción contra bacterias Gram negativas y positivas y marcada actividad contra Rickettsia prowazeki y algunos virus. Posee además poca toxicidad para el animal. Varios investigadores (41) realizaron estudios para comprobar la estructura química de la chloromicetina y, conseguido esto, sintetizaron un producto que denominaron Chloramphenicol y que poseía todas las propiedades del antibiótico natural. Este ha sido el primer antibiótico importante obtenido por síntesis.

Del Streptomyces aureofaciens varios investigadores (42) aislaron la aureomicina en forma cristalina. Bacteriologicamente actúa con mayor intensidad contra los gérmenes Gram

positivos que sobre los Gram negativos. Actuó también contra Rickettsia y algunos virus. La aureomicina parece ser más bien bacteriostática que bactericida (43).

Waksman y Curtis en 1915, aislaron del suelo un germen que designaron como Actinomyces fradii, ahora clasificado en el manual Bergey como Streptomyces fradiae. Este germen produjo neomicina, un antibiótico descubierto en 1949 por Waksman y Lechevalier (44) que es activo contra gran número de bacterias.Gram positivas y negativas, pero cuya acción más notable se manifiesta contra varias formas de Mycobacterium tuberculosis y otras Mycobacterias. No posee acción contra hongos.

Waksman y otros colaboradores (45) aislaron del Streptomyces lavendulae nº 3516, extraído del suelo, una sustancia semejante a la estreptotricina en cuanto a sus propiedades antibacteriales y químicas, pero menos tóxica, y la designaron Streptotricina VI. Esta sustancia ejerce una poderosa acción tuberculicida y tuberculostática contra cepas de Mycobacterium buberculosis. También actúa contra ciertos hongos en forma intensa.

Entre los antibióticos podemos incluir sustancias antibacteriales producidas por animales y vegetales superiores. A los del primer grupo pertenece la lysozyme, un prin-

pio enzimático descubierto por Fleming (46) en la cla[illegible] evo y que también fué aislado de diversos humores: lágrima, liva, etc. y de varios tejidos animales y vegetales. Posee ción bactericida sobre ciertos microorganismos.

De vegetales superiores, del Allium sativum, vallito y Bailey (47) aislaron la allicina, un aceite esencial ado que ejerce acción contra bacterias Gram positivas y ne- tivas.

4. GERMENES PRODUCTORES DE ANTIBIOTICOS. CLASIFICACION [redacted] EL ORIGEN.

Los agentes antibióticos de origen microbiano pueden derivar de tres fuentes generales: Bacterias, hongos y actinomycetes (48).

1) Bacterias

Las bacterias pueden ser: esporuladas y no esporuladas. El grupo más importante es el formado por el amplio género Bacillus, esporulado, aerobio, del cual han sido extraídas, entre otras, las siguientes sustancias:

- Tirotricina
  - Gramicidina
  - Tirocidina

Gramicidina S	Bacillina
Subtilina	Eumicina
Endosubtilina	Licheniformina
Bacitracina	Colistatina

Solamente la tirotricina y sus dos componentes han sido estudiados extensivamente y son utilizados en preparaciones farmacéuticas. Los otros son de origen reciente y los conocimientos que se poseen sobre su composición química y actividad antibacteriana son muy incompletos.

CUADRO Nº 1

AGENTES ANTIBIOTICOS DE ORIGEN BACTERIANO

Nombre	Origen	Autor y año	Organismo sensible
Piocianasa	Pseudomonas pyocyanea	Emmerich y Löw 1899	Gram (+) y (-)
Piocianina	"	Wrede y Strack 1924	Principalmente Gram (+)
Tirotricina	Bacilo Brevis	Dubos, 1939	Gram (+)
Gramicidina	" "	Hotchkiss y Dubos 1940	Gram (+)
Tirocidina	" "	Hotchkiss y Dubos 1940	Gram (+) y algunos Gram (-)
Gramicidina S	" "	Gause y Brazhnikova 1944	Gram (+) y (-)
	var.Gause-Brazhnikose		

2) Hongos.

Este grupo incluye agentes antimicrobianos obtenidos de hongos. Pertenecen al mismo dos de las fuentes más importantes de agentes antibióticos de gran aplicación en el campo médico, las especies de Penicillia y Aspergilli.

CUADRO Nº 2

AGENTES DERIVADOS DE HONGOS

Nombre	Origen	Autor y año	Organismo sensible
Ac.penicílico	P.puberulum	Alsberg y Black 1913	Gram (+) y (-)
Penicilina	P. notatum	Fleming, 1929	Gram (+) y (-)
Citrinina	P.citrinum	Hetherington y Raistrick, 1931	Gram (+)
Gliotoxina	Trichoderma lignorum	Weindlig y Emerson, 1936	Gram (+) y (-)
Fumigatina	A.fumigatus	Anslow y Raistrick, 1938	Gram (+)
Claviformina	P.claviforme	Chain, Florey y Jennings, 1942	Gram (+) y (-)
Ac.aspergíllico	A.flavus	White y Hill 1943	Gram (+) y (-)
Flavicina	A.flavus	Bush y Goth 1943	Gram (+)
Ac.helvólico	A.fumigatus	Chain, Florey, Jennings y Williams 1943	Gram (+)
Ac.gigántico	A.giganteus	Philpot, 1943	Gram (+)
Flavicidina	A.flavus	Mc Kee, Rake y Houck, 1944	Gram (+)

3) Actinomycetes

A este grupo pertenecen agentes que son producidos por organismos del orden Actinomycetales (49) que ha sido dividido en tres familias: Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae y Streptomycetaceae, comprendiendo los géneros Mycobacterium, Actinomyces, Nocardia, Streptomyces y Micromonosporum.

Uno de los antibióticos más importantes correspondiente a los Actinomycetes es la estreptomicina.

CUADRO Nº 3

AGENTES DERIVADOS DE ACTINOMYCETES

Nombre	Origen	Autor y año	Organismo sensible
Actinomicetina	"Streptotrix"	Gratia y Dath 1924	Gram (+) y (-)
Actinomicina A	Actinomyces antibioticus	Waksman y Woodruff 1940	Gram (+)y (-)
Actinomicina B	Actinomyces antibioticus	Waksman y Woodruff 1940	Gram (+) y (-)
Streptotricina	Ac.lavendulae	Waksman y Woodruff 1942	Gram (+) y (-)
Streptomicina	St,griseus	Waksman, Schatz y Bugie, 1944	Gram (+) y (-) Mycobacterias
Chloromicetina	Streptomyces,sp.	Carter, Gottlieb y Anderson, 1948	Algunos Gram (+) y (-).Rickettsias y algunos virus
Aureomicina	St.aureofaciens	Bryer,Schoenbach, Chandler, Bliss y Long, 1948	Algunos Gram (+) y (-),Rickettsias y algunos virus.
Neomicina	Str.fradiae	Waksman y Hecheva lier, 1949.	Gram (+) y (-) Mycobacterium

C U A D R O Nº 4

Nombre	Origen	Autor y año	Organismo sensible
-----	Pseudomonas pyocyanea	Bouchard 1889	Gram (+) y (-)
Piocianasa	Pseudomonas pyocyanea	Emmerich y Löw 1899	Gram (+) y (-)
Acido penicílico	Penicillium puberulum	Alsberg y Black 1913	Gram (+) y (-)
Piocianina	Pseudomonas pyocyanea	Wrede y Strack 1924	Gram (+) y (-)
Actinomicetina	Streptomyces albus G	Gratia y Dath 1924	Gram (+) y (-)
Penicilina	Penicillium notatum	Fleming 1929	Gram (+) y (-)
Citrinina	Penicillium citrinum	Hetherington y Raistrick 1931	Gram (+)
Gliotoxina	Trichoderma lignorum	Weindling y Emerson 1936	Gram (+) y (-)
Fumigatina	Aspergillus fumigatus	Anslow y Raistrick 1938	Gram (+)
Tirotricina	Bacilo brevis	Dubos 1939	Gram (+) y algunos (-)
Gramicidina	Bacilo brevis	Dubos y Cattáneo 1940	Gram (+)
Tirocidina	Bacilo brevis	Dubos y Cattaneo 1940	Gram (+) y algunos (-)
Actinomicina A y B	Actinomyces antibioticus	Waksman y Woodruff 1940	Gram (+), (-) y hongos

Nombre	Origen	Autor y año	Organismo sensible
Estreptotricina	Actinomyces lavendulae	Waksman y Woodruff 1942	Gram (+) y (-)
Claviformina	Penicillium claviforme	Chain, Florey y Jennings 1942	Gram (+), (-) y algunos hongos
Acido Aspergílico	Aspergillus flavus	White y Hill 1942	Gram (+) y (-)
Flavicina	Aspergillus flavus	Bush y Goth 1943	Gram (+)
Acido helvólico	Aspergillus fumigatus	Chain, Florey, Jennings y Williams 1943	Gram (+)
Acido gigántico	Aspergillus giganteus	Philpot 1943	Gram (+)
Estreptomicina	Actinomyces griseus	Waksman y Schatz 1944	Gram (+), (-) y Mycobacteria
Flavicidina	Aspergillus flavus	Mac Kee, Rake y Houck 1944	Gram (+) y (-)
Subtilina	B.subtilis	Jansen y Hirschmann 1944	Gram (+) y algunos hongos
Gramicidina S	B.brevis var. Gause-Brazhnikova	Gause y Brazhnikova 1944	Gram (+) y (-)
Bacitracina	B.subtilis	Johnson, Anker y Meleney 1944	Gram (+) y (-)
Cloromicetina	Streptomyces sp.	Carter, Gottlieb y Anderson 1948	Gram (+), (-) y Rickettsia
Aureomicina	Streptomyces aureofaciens	Bryer, Schoenbach, Chandler, Bliss y Long 1948	Gram (+), (-) y Rickettsia
Neomicina	Streptomyces fradiae	Waksman y Lechevalier 1949	Gram (+), (-) y Mycobacterium

Nombre	Origen	Autor y año	Organismos sensibles
Estreptotricina VI	Streptomyces lavendulae Nº 3516	Woksman, Swart y Hutchison 1949	Gram (+), (-), hongos y Myobacterium
Lysozyme	Clara de huevo	Fleming 1922	Saprófitos
Alicina	Allium sativum	Cavallito y Bailey 1944	Gram (+) y (-)

a) ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS ANTIBIOTICOS

La composición química de los antibióticos es muy variada no solo para antibióticos diferentes sino también para las diversas formas de un mismo antibiótico, según que ellos sean producidos por cepas distintas de un mismo organismo o en condiciones diferentes de cultivo. Desde este punto de vista Waksman (50) clasifica los antibióticos en siete grupos:

1) Cuerpos lipoideos: piocianasa y clavacina.

2) Pigmentos: piocianina, prodigiocina, crisogenina, clorafina, toxoflavina y actinomicina.

3) Polipeptidos: gramicidina, tirocidina, lisozima y actinomicetina.

4) Compuestos conteniendo azufre: gliotoxina.

5) Compuestos de tipo quinona: citrinina, ácido penicílico, fumigatina y posiblemente penicilina.

6) Bases orgánicas: estreptotricina.

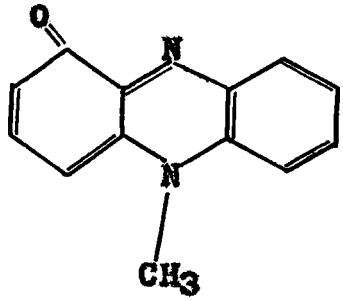
7) Otros agentes: fumigacina, etc.

La estructura química de numerosos antibióticos ha sido demostrada y varios han llegado a sintetizarse. Citaremos los siguientes:

Piocianina:

La naturaleza química fundamental fué establecida por Wrede y Strack (51) y más tarde la obtienen por sínta

sis Kuhn y Valko (52) establecen que la fórmula molecular $C_{13}H_{10}N_2O$ es la más correcta y se representa por la siguiente fórmula desarrollada:



o isómeros

Acido penicílico:

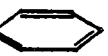
Birkinshaw, Oxford y Raistrick (53) determinaron la estructura química del ácido penicílico y la sintetizó (54) (55) Raphael.

Lactona

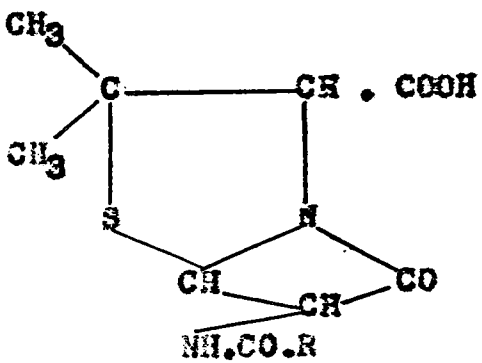
ácido. γ quetoβmetoxiδmetilenΔ$^{\alpha}$hexenoico en equilibrio tautomérico con la lactona.

Penicilina:

Las diferentes penicilinas (56) tienen la misma estructura general y varían solo en la naturaleza de la cadena lateral R. Referente a la nomenclatura existen diferencias entre los autores norteamericanos e ingleses.

Fórmula empírica	R	Nombre inglés	Nombre norteamericano
$C_{14}H_{20}O_4N_2S$	$-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_3$	Penicilina I	Penicilina F
$C_{16}H_{18}O_4N_2S$	CH_2  bencil	Penicilina II	Penicilina G
$C_{16}H_{18}O_5N_2S$	CH_2 OH p.hidroxi bencil	Penicilina III	Penicilina X
$C_{16}H_{26}O_4N_2S$	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	Penicilina K	Penicilina K

n - heptil



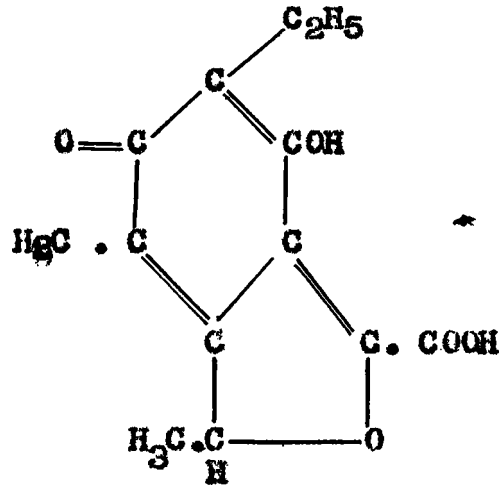
lactama

Fórmula empírica

$C_9H_{11}O_4N_2S$ R

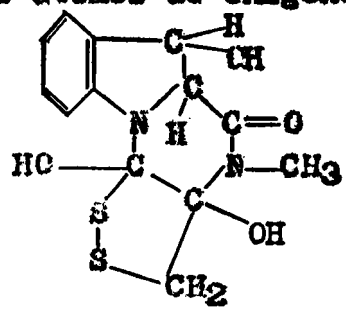
Citrinina:

Raistrick (19) y otros investigadores establecen que la fórmula de la citrinina es:



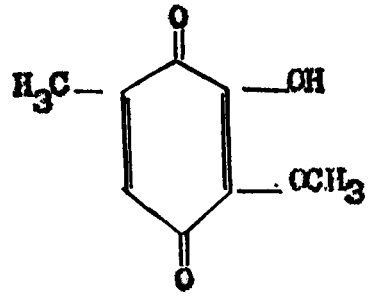
Gliotoxina

Johnson, Bruce y Dutcher comprobaron (57) que la fórmula molecular de la gliotoxina es $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$ y además, poco tiempo después, los mismos autores (58), presentaron con cierta reserva, particularmente con referencia a la disposición de los átomos de oxígeno, la fórmula siguiente:



Fumigatina :

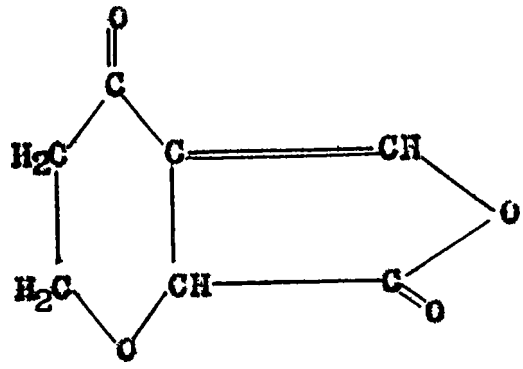
Raistrick y Baker (59) demostraron que la estructura de la fumigatina es similar a la 3-hidroxi-4-metoxi 2-5toluquinona y de fórmula empírica $C_8H_8O_4$ y la sintetizaron.



Expansina, patulina o claviformina:

La estructura de la patulina fué demostrada por Birkinshaw, Michael, Bracken y Raistrick (60).

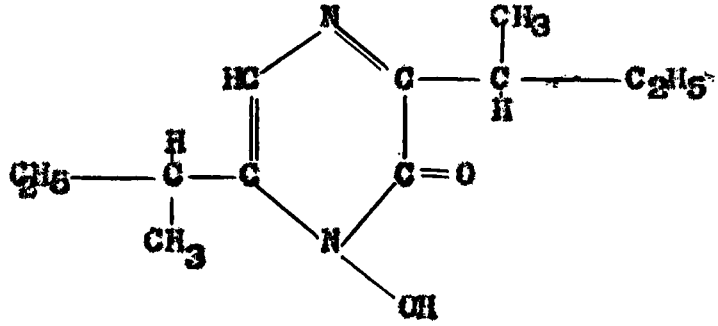
$C_7H_6O_4$



o por alguna forma tautómera.

Acido aspergílico:

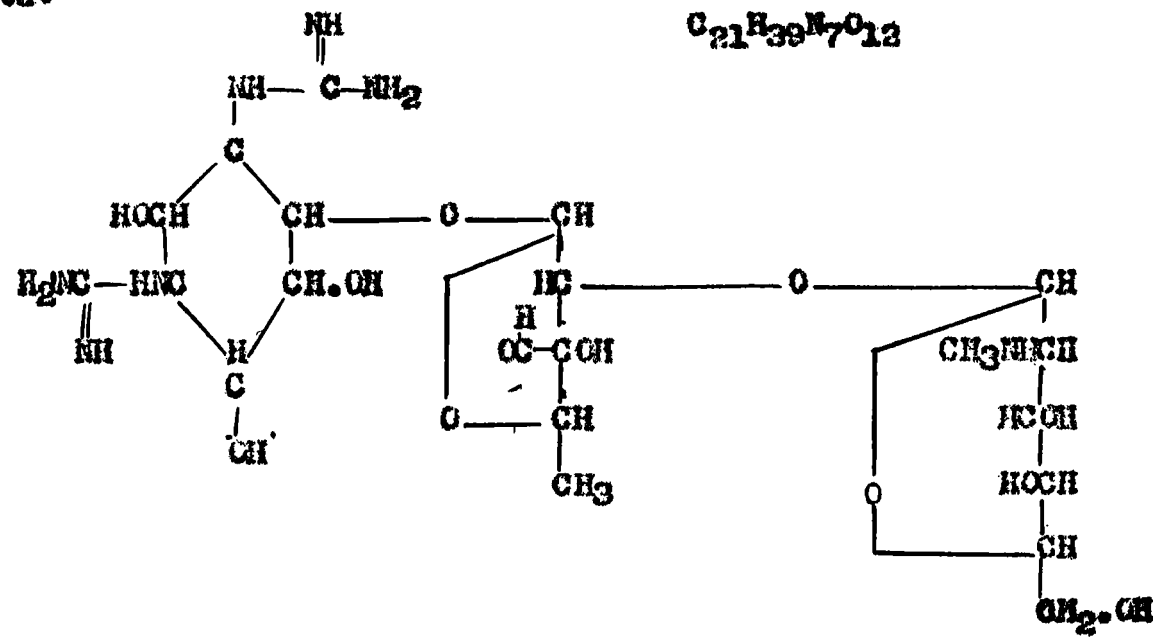
En 1947, Dutcher (61) llegó a la conclusión que la fórmula del ácido aspergílico es:



($C_{12}H_{20}O_2N_2$)

Streptomicina:

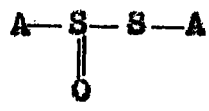
Kuehl (62) y otros investigadores sugieren para la estreptomicina la siguiente fórmula desarrollada y bruta:



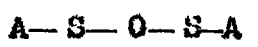
$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$

Allicina:

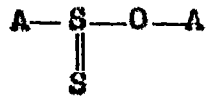
Cavallito, Buck y Suter (63) dicen que la estructura química de la allicina puede ser una de las cinco siguientes



I

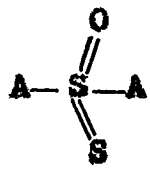


II



III

IV



V

A: representa el grupo alilo.

b) Naturaleza de la acción antibiótica. Clasificación según ese criterio.

Los antibióticos ejercen la acción antimicrobiana principalmente por inhibir el crecimiento del germen que le es antagónico (acción bacteriostática). Así, Robinson y Graessle (64), realizaron ensayos con la gramicidina y la tirocidina frente al Str.haemolyticus, en caldo, variando las proporciones del antibiótico.

La gramicidina en dosis tan pequeñas como 1 γg/ml alargaba el período de desarrollo del cultivo a diez horas, 16 γg/ml no producían efectos bactericidas en veinte y cuatro horas los que se obtenían recién con dosis de 64 γg/ml. A los antibióticos que actúan de esta manera se dice que son bacteriostáticos.

La acción de los antibióticos puede ser más intensa y producir efectos bactericidas y bacteriolíticos evidentes. La tirocidina con pequeñas variaciones de su concentración actúa sobre el mismo germen como bacteriostático o como bactericida. En concentración de ½ γg/ml aumenta la fase lenta de crecimiento de Streptococcus hemolitycus y en dosis de 2 γg/ml ejerce una potente acción bactericida.

El mayor o menor grado de intensidad de la ac-

ción depende del número y naturaleza de la bacteria sensible, del estado de su desarrollo, de la edad del cultivo, de la composición del medio de cultivo o del substracto, del pH, de la concentración del antibiótico, etc.

Así Strauss (65) demostró que la cantidad de estreptomicina requerida para matar una suspensión de Bact. coli de tres horas era veinte y cinco veces mayor que la requerida para matar un número similar de organismos en caldo de corazón.

Es importante el hecho que informan Curran y Evans (66) de que ciertos antibióticos cuando se usan en concentraciones menores de las que actúan como bacteriostáticos, ejercen acción estimulante. La penicilina y la estreptomicina en pequeñas concentraciones, estimulan el crecimiento en leche estéril del Staph, aureus, Str. agalactiae y muchos organismos esporulados.

Basándose en estas consideraciones han sido divididos (50) por la intensidad de la acción en:

1) Principalmente bacteriostáticos: actinomicina.

2) Bactericidas pero no bacteriolíticos: penicilina, piocianasa, piocianina, gliotoxina, fumigacina y clavacina.

3) Bacteriolíticos: gramicidina, actinomicetina y lisozima.

Si se los considera teniendo en cuenta la cla-

se de microorganismos, veremos que algunos antibióticos actúan indistintamente sobre bacterias Gram positivas o Gram negativas, ejemplo la estreptomicina, la estreptotricina y cloromicetina actúan sobre ciertas bacterias Gram (+) y (-), otros antibióticos, como la gramicidina actúa sobre algunas bacterias Gram (+), la tirocidina y gramicidina S sobre determinadas bacterias Gram (+) y algunos microorganismos Gram (-), otros por el contrario actúan selectivamente sobre determinados gérmenes pertenecientes a uno de los grupos o a ambos.

Algunos antibióticos son eficaces contra bacilos ácido-alcohol resistentes, pero otros no, ejemplo: estreptomicina, estreptotricina, subtilina, allicina. Algunos afectan en igual forma los gérmenes aerobios o anaerobios, mientras que otros actúan mejor sobre los primeros que sobre los segundos o recíprocamente. La penicilina es muy activa sobre los gérmenes Gram positivos, aerobios y anaerobios. Otros antibióticos son fungistáticos y aún fungicidas. Así la gliotoxina, la subtilina, la eumicina, actinomicina, estreptotricina, ácido aspergílico y expansina ejercen acción contra algunos hongos. La viridina ejerce gran actividad fungistática sobre ciertos hongos.

Además algunos antibióticos, como la cloromice-

tina y aureomicina actúan contra ciertos virus y rickettsias. Otros como la estreptotricina actúan contra levaduras.

Estas diferencias de acción pueden ser no solo cualitativas sino también cuantitativas,(9), pudiéndose hablar de un "efecto bacteriostático" o "espectro antibiótico" queriendo significar así la extensión de la acción antimicrobiana o antibacteriana selectiva de una sustancia determinada cuando se pone en presencia de una serie de bacterias u otros microorganismos típicos.

Para que la aplicación de un antibiótico se generalice en el campo médico es necesario que el mismo ejerza una acción selectiva, es decir, que mate la célula bacteriana pero que no dañe la célula animal. Así la pen cilina y estreptomicina, ambas altamente tóxicas para determinadas bacterias poseen poca toxicidad para la célula animal.

La tirocidina pertenece al tipo de antibiótico que se designa como "veneno protoplasmático" y actúa tanto sobre la célula bacteriana como sobre la animal. La acción tóxica sobre la celula animal es, además, selectiva así, la gramicidina hemoliza los glóbulos rojos, mientras que sobre otras células no ejerce mayores efectos perjudiciales. Se deduce además que esta acción distintiva es también evidente sobre los diferentes microorganismos.

Desde el punto de vista de su toxicidad (50) sobre el huesped los antibióticos pueden ser:

1) No tóxicos o poseyendo escasa toxicidad: Penicilina, eflurinina, piocianasa, piocianina, estreptomicina y actinomicetina.

2) Débilmente tóxicos: granicidina, tiroidina, estreptotricina, gliotoxina..

3) Altamente tóxicos: actinomicina.

5. MECANISMO DE ACCION:

Sin tener un mecanismo de acción determinado, los antibióticos parece que actúan afectando diferentes mecanismos básicos de la biología bacteriana. (9).

1) El antibiótico forma parte de un sistema enzimático y produce en el medio sustancias como las peroxidasas que oxidan a otras que en el proceso de la nutrición celular habían sido reducidas.
2) Por combinación con algunas sustancias integrantes del medio de cultivo donde se desarrolla el germen y que en esta forma impide que sea aprovechado por el microorganismo.
3) Por interferir ciertos mecanismos enzimáticos esenciales para que el germen lleve a cabo un proceso metabólico importante como el proceso respiratorio, con las hidrogenasas o con la asimilación de los fosfatos que acompañan la oxidación de la glucosa, ejemplo: gramicidina.
4) Por alterar la tensión superficial de la bacteria. Algunos antibióticos actúan como depresores de la tensión superficial, ejemplo: la tirocidina.
5) La interferencia que ejercen los antibióticos en el proceso de la división celular impidiendo la utilización de los grupos SH- indispensables para que se realice este proceso. Cuando un microorganismo crece en un medio inadecuado

puede adquirir formas diversas, aumentar de tamaño, no poder dividirse y finalmente morir. El 1900, Emmerich y Saida (67) adicionaron Ps.pyocyanea a un cultivo de B.anthracis y después de unos días observaron que el B.anthracis tenía la forma de un Bacilo hinchado y arrollado, pero al efectuar repiques en medio nutricio fresco el germen adquirió su morfología característica.

Gardner (68) comprobó que colocando penicilina en pequeñas concentraciones en contacto con cepas de B.antrax, S.typhi y B.Subtilis en agar, a la temperatura de 37ºC a las pocas horas los gérmenes mostraron cambios pregerminativos, alargándose un poco e hinchándose. Estas pequeñas células ovoideas entonces pierden más y más sus características morfológicas y en lugar de crecer como bastones, como ocurre en ausencia de dicho antibiótico, se vuelven anchas y esféricas semejándose cocos y hasta algunas explotaron y se desintegraron, dejando leves trazas; como consecuencia de la acción lítica, quedó una pequeña masa de gránulos.

6) Los antibióticos pueden afectar la utilización de las vitaminas por la célula, corrientemente a este mecanismo de neutralización de una vitamina por un antibiótico se lo designa bajo el nombre de "antagonismo".

6. ADAPTACION DE LAS BACTERIAS A LOS ANTIBIOTICOS

Algunos microorganismos que al ser tratados con antibióticos detienen su desarrollo pueden adquirir cierta resistencia y hasta crecer en presencia del agente bactericida. La penicilina, el ácido helvólico, la piocianina y otros antibióticos, pueden originar gérmenes resistentes (69).

Klein y colaboradores (70) relatan que cultivos de S. aureus en presencia de penicilina, detienen su desarrollo y mueren la mayoría de los gérmenes, pero los sobrevivientes se multiplican con gran rapidez y los subcultivos de los mismos muestran ser muy resistentes al antibiótico.

El S. aureus (71) en presencia de ácido micofenólico se adapta a crecer más y más rápidamente en presencia del antibiótico. Los organismos adaptados se multiplican rápidamente después de hacer subcultivos. Esta adaptación fué fácilmente reversible.

La resistencia adquirida por un microorganismo es, en general, específica para dicho antibiótico y por el contrario el germen puede haberse hecho más sensible para otro antibiótico (72). En el caso del S. aureus que adquiere resistencia para la penicilina aumenta su sensibilidad para la gliotoxina.

Los modos de acción de los antibióticos son

bien diferentes, ya que un germen puede hacerse resistente para uno de ellos o para varios y ser sensible a la acción de otro antibiótico o de otros.

7. NOMENCLATURA.

Generalmente los antibióticos reciben un nombre derivado del organismo productor, pero como algunos antibióticos han sido aislados, por diferentes investigadores, de especies distintas de microorganismos no existiendo una regla oficial para nombrarlos un mismo antibiótico ha recibido varias denominaciones lo que da lugar a confusiones. Así de varias cepas de Aspergillus clavatus Waksman (73) y colaboradores (1943) aislaron un antibiótico que denominaron clavacina, en el mismo año, Bergel y otros (74) aislaron, en forma cristalina , del Aspergillus clavatus un antibiótico que denominaron clavatina. En 1942, Chain,Florey y Jennings (25) aislaron, bajo forma cristalina, del Penicillium claviforme la claviformina. Atkinson (75) en el mismo año aisló de un Penicillium no identificado un antibiótico que denominó penicidina. Raistrick (76), en 1943 aisló la patulina del penicillium patulum. Oosterhuis y Luyken (77) de cultivos de Penicillium expansum aislaron, bajo forma cristalina, un antibiótico que denominaron expansina y que Duyvené de Wit, en 1944, demostraron es idéntica a la claviformina. Todos estos antibióticos resultaron ser idénticos y el nombre adoptado es el de expansina por haber sido descubierto con prioridad por Luyk en 1938.

8. NATURALEZA DE LOS SUBSTRACTOS EN QUE SE PRODUCEN LOS ANTIBIOTICOS DE GERMENES AEROBIOS-ESPORULADOS.

Gran número de trabajos relatan las propiedades antagónicas de numerosos gérmenes aerobios-esporulados que han sido aislados de una gran variedad de fuentes tales como: suelos, aguas de albañal y alcantarillas, quesos, estiercol, etc. Entre los gérmenes se citan el Bacilo subtilis, B.mesentéricus, B.mycoides y el B.brevis, entre los más importantes (78).

Así de queso de Cantal, Duclaux en 1898 (79), aisló bacterias esporuladas a las que denominó "Tirotrix". De polvo recogidd en Constantinopla, Nicolle, (80) en 1907 aisló una cepa de B. subtilis que poseía propiedades bacteriolíticas contra gérmenes pertenecientes a grupos de: neumococos, antrax, Shiga, estafilococo, B. suipestifer y tifoidea.

Pringsheim en 1920 (81), aisló una cepa de Bacillus mesentericus vulgatus que ejercía efectos inhibitorios sobre gran variedad de bacterias y particularmente sobre Corynebacterium diphtheriae que crecía en placas de agar.

En 1924, Much y otros colaboradores (82) aislaron varias cepas de B. mycoides las cuales en caldo originaban una sustancia con marcada acción lítica sobre numerosos cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos.

Un año después, en 1925, Rosenthal (83) aisló

del suelo y materias fecales una bacteria perteneciente al tipo B.mesentéricus y que poseía la propiedad de lisar bacterias vivas o muertas. Numerosas cepas del grupo subtilis-mesentéricus fueron aisladas y ensayadas contra las siguientes bacterias: siete especies Gram positivas - Staphylococcus aureus, Sarcina, Sarcina flava, Pneumococo tipo I, Streptococcus viridans, B. diphtheriae y siete especies Gram negativas - B.coli, B.typhi, B.paratyphi B, B.disenteriae Shiga, B.prodigiosus, B. proteus X19, B.pyocyaneus. Los organismos vivos, Gram positivos, ensayados, fueron más susceptibles a la acción antagónica de los bacilos aerobios esporulados que los gérmenes vivos Gram negativos. En cambio, todas las bacterias Gram (-) muertas fueron más sensibles a la acción de todas las cepas esporoformadoras, mientras que los microorganismos Gram positivos, muertos no fueron afectados.

Si bien los substractos originales han sido muy variados, actualmente al sistematizar el estudio de los antibióticos, los substractos se han tipificado y se pueden clasificar en: químicamente definidos y orgánicos complejos.

TIROTRICINA

ANTECEDENTES

Mientras Dubos (84) en el Instituto Rockefeller se dedicaba a estudiar la acción de una enzima aislada de un germen telúrico, esporo-formador, que digería el polisacárido capsular del Pneumococo tipo III, tanto "in vitro" como "in vivo", pensó en la posibilidad de aislar otras enzimas que no solo lisaran sustancias solubles y compuestos aislados sino también células intactas de especies no relacionadas.

El mismo autor (22) basándose en que las materias orgánicas añadidas a los suelos, en general, sufren transformaciones por acción de la flora microbiana existente en los mismos, supuso que agregándoles a muestras de suelos de reacción neutra, cultivos vivos de gérmenes Gram positivos, podría obtener una cepa selectiva antagónica de los gérmenes agregados. Combinó diferentes muestras de suelos, les adicionó fosfatos alcalinos, sulfato de amonio y un exceso de carbonato de calcio mantuvo en una humedad del 70% e incubó a 30° C varias semanas para provocar la descomposición de la materia orgánica original. Aparte resuspendió en pequeños volúmenes de agua destilada, los sedimentos obtenidos por centrifugación de cultivos en caldo de estafilococo, neumococo y estreptococo hemolítico grupo A y los añadió a las muestras de suelo. Estos procesos

fueron repetidos en el transcurso de dos años en períodos irregulares de tiempo, luego una pequeña porción de este preparado de suelo (2 g) fué agregado a 10 cm^3 del siguiente medio: H_2KPO_4 M/20, H_2NaPO_4 M/30, $SO_4(NH_4)_2$. M/100 y agua potable al que se le habían añadido las células vivas recuperadas de 150ml de cultivo de estafilococo, incubación a 30° C cuarenta y ocho horas, al final de este tiempo se observó la clarificación del cultivo, como consecuencia de la lisis del estafilococo y en la parte superior del medio de cultivo la presencia de una película membranosa característica del crecimiento de un germen aerobio. Estos repiques se efectuaron varias veces para eliminar la mayor parte de las especies microbianas primitivas. Finalmente por siembras sobre agar-peptonado se aisló un germen bacilar aerobio, esporo-formador y dotado de propiedades líticas para varias especies Gram positivas, este germen más tarde se lo clasificó en el Manual Bergeys (85) en la siguiente forma:

Clase : Schizomycetes Nägeli

Orden : Eubacteriales Buchanan

Sub-orden : Eubacterineae

Familia XIII : Bacillaceae Fischer

Género I : Bacillus Cohn

14.Especie : brevis

Bacillus brevis Migula

Sinominia: Bacillus centrosporus Ford. Primeramente fué designado Bacillus Flügge Nº I, luego se comprobó era idéntico al B.brevis de Migula.

DESCRIPCION DEL BACILO brevis.

Es un bacilo móvil, tamaño 4 x 0,5 µ que se presenta solo o agrupado en pares, con esporos centrales o subterminales, bacilos claramente hinchados durante el proceso de esporulación, los endosporos tienen forma elipsoidal y un tamaño de 1-1,3 por 1,5 a 2 micrones, resisten temperaturas de 80º C pero mueren a la temperatura de ebullición. El comportamiento de dicho germen frente al colorante de Gram es variable, así en cultivos jóvenes es Gram positivo luego se vuelve Gram negativo.

CRECIMIENTOS DE COLONIAS EN AGAR:

Se observan bajo formas de colonias circulares de 1-2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación a 37ºC, planas, lisas, bordes perfectos, al principio de color blanco y brillo perlado, frecuentemente con más incubación se tornan de color ligeramente pardo amarillento. Son mesofílicas y estrictamente aerobias. En este medio genera ácido sulfihídrico.

En Caldo simple:

Moderado enturbiamiento, ligera película en la parte superior y sedimento.

Glúcidos:

No produce fermentación.

Nitratos:

Reduce los nitratos

Gelatina:

Licúa la gelatina.

Catalasa:

Abundante producción de catalasa.

Observaciones derivadas:

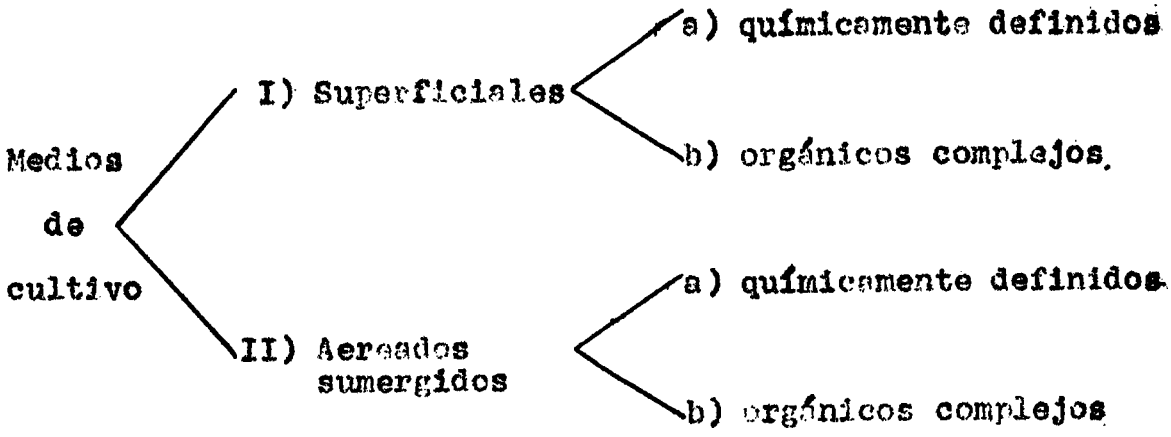
Medios conteniendo hidrolizado de caseína ácida al 1 %, a p H 7 e inoculados con B. brevis, incubados 3-4 días a 37ºC en cultivos superficiales producían la lisis de suspensiones de estafilococos y Dubos (22) comprobó que esa propiedad era inherente a una sustancia que se originaba en el transcurso de esa incubación y la encontró en solución de dichos autolizados y también en los cultivos jóvenes (12-18 horas) encontró el agente activo sobre los cuerpos bacterianos. El antibiótico era precipitable a pH 4,5 y ese precipitado poseía las propiedades del líquido original.

Este antibiótico primeramente recibió el nombre de gramicidina (86) por su actividad contra gérmenes Gram (+) pero más tarde Dubos y Hotchkiss (87) demostraron que estaba

formado por dos sustancias a las cuales denominaron: a una gramicidina en honor a Gram y a la otra tirocidina por su contenido en el amino-ácido tirosina. A la sustancia madre la renombraron Tirotricina, denominación que proviene de "Tirotrix" dado por Duclaux a los gérmenes aerobios esporo-formadores.

MEDIOS DE CULTIVO DEL BACILO BREVIS PARA LA PRODUCCION DE TIROTRICINA

Los medios de cultivo para la obtención de tirotricina se pueden dividir en la siguiente forma:



a) Medios químicamente definidos:

En los medios químicamente definidos se utilizan como fuente hidrocarbonada : glucosa, lactosa, manosa, etc. como base nitrogenada : sales amoniacales tales como lactato, succinato, $SO_4^{=}$, NO_3^{-}, amino - ácido y diferentes sales minerales, tales como: PO_4H_2K, PO_4HK_2, SO_4Cu, SO_4Mn, SO_4Mg, Cl_2Ca, etc.

b) Medios orgánicos complejos:

Bases nitrogenadas: peptonas a partir de dife-

rentes sustancias, como por ejemplo citaremos: de caseína, de hígado de porcino, de carne vacuna, de estómago porcino, etc.

Fuente hidrocarbonada:

Tales como dextrina, lactosa, glucosa, etc.

A pesar de que para los casos más simples ha sido posible ajustarse a una clasificación de este tipo, las sucesivas incorporaciones de factores a los medios de cultivo han hecho que se asocien a elementos químicamente definidos (amino-ácidos, vitaminas, sales minerales, etc.) y otras drogas de naturaleza compleja (peptona, "corn steep", jugo de prensado de espárragos, levaduras, etc.).

I) MEDIOS DE CULTIVO EN SUPERFICIE.

El medio de cultivo utilizado por Dubos (22) consistía en hidrolizado de caseína al 1% en agua potable y a pH 7. Incubación 3-4 días a 37ºC.

Lewis, Dimick y Feustel (88) utilizaron dos tipos de medio, uno a base de jugo de prensado de espárragos como componente principal y el otro a base de "Bapto Triptona" u otra fuente nitrogenada, más glucosa u otros hidratos de carbono fermentecibles y varias sales minerales. Luego de numerosos ensayos, en los cuales variaron los diversos componente del medio de cultivo: la cantidad de materia nitrogenada, hidrato de carbono y de las diferentes sales minerales, así como también tuvieron en cuenta la temperatura, pH, O_2, etc. llegaron a describir un medio de cultivo con el que obtuvieron un rendimiento de tirotricina de 2 g/litro.

La composición del medio de cultivo descripto por Lewis y sus colaboradores es el siguiente:

Triptona	1,5 %
Glucosa	3 %
PO_4H_2K	0,070 %
ClK	0,035 %
$SO_4Mg.\ 7H_2O$	0,050 %
Cl_2Ca	0,025 %
Fe (como SO_4)	2 p.p.m
Mn (como SO_4)	2 p.p.m

Temperatura óptima de incubación fué de 35ºC y el ajuste del pH a 7,5 fué considerado el más satisfactorio.

II) MEDIOS DE CULTIVO AIREADOS SUMERGIDOS

Para la producción en gran escala de tirotricina, Stokes (89) utilizó un fermentador de acero inoxidable de tipo especial y como medio de cultivo un medio sintético que poseía como fuente nitrogenada, ácidos aminados tales como: d-l ácido glutámico, β alanina, d-l fenil alanina, d-l ácido aspártico, glicina, d-l leucina, l-prolina, l-histidina. HCl y d-l isoleucina solos o en combinación más una mezcla de sales inorgánicas y como fuente hidrocarbonada glucosa.

La composición del medio de cultivo es la siguiente:

d-l ácido glutámico	0,25 %
glucosa	0,1 %
PO_4HK_2	0,05 %
PO_4H_2K	0,05 %
$SO_4Mg.\ 7\ H_2O$	0,02 %
ClNa	0,001 %
$SO_4Fe.\ 7\ H_2O$	0,001 %
$SO_4Mg.\ 4\ H_2O$	0,001 %
$(H_2PO_4)_2\ Ca.\ H_2O$	0,2 en sol.saturada
H_2O c.s.p.	1 litro

El pH se ajusta a 7, se esteriliza el medio de cultivo, se inocula con Bacilo brevis y se efectúa la aereación por pasaje de 1,5 litros de aire por minuto para cada 5 litros de medio. La incubación se realiza a 37°C, 36-60 horas.

Stokes (90) (91) en colaboración con Woodward dicen que la tirotricina es elaborada por el Bacilo brevis tanto en medios superficiales como en medios aereados sumergidos siempre que el medio sea de naturaleza sintética y consistiendo en asparragina u otro amino-ácido, glucosa y distintas sales minerales. Contrariamente la tirotricina no se formó en cultivos aereados sumergidos cuando el medio contenía compuestos nitrogenados complejos.

El medio descripto por estos autores es:

Asparragina	0,25 % o d-ácido glutámico 0,50%
Glucosa	10 g
PO_4HK_2	0,5 "
PO_4H_2K	0,5 "
$SO_4Mg.7\ H_2O$	0,2 "
ClNa	0,01 "
$SO_4Mn.4\ H_2O$	0,01 "
$SO_4Fe.7\ H_2O$	0,01 "
$(H_2PO_4)_2Ca.H_2O$	2 ml de una solución saturada
H_2O destilada	998 ml

La proporción de aire insuflado fué de 1,5 litros por minuto para 5 litros de medio. Ajuste del pH a 7. Observaron que la agitación y presión no influyen en el aumento del rendimiento de tirotricina. Con este medio obtuvieron un rendimiento de tirotricina comprendido entre 100-300 mg por litro de medio, luego de 30-40 horas de incubación.

Estos mismos autores informan que no obtuvieron resultados satisfactorios cuando utilizaron medios sintéticos aereados sumergidos conteniendo mezclas de 19 amino-ácidos.

Appleby, Knowles, Mc Allister, Pearson y White (92) comunican que en medio sintético conteniendo como base nitrogenada succinato de amonio obtuvieron muy buen crecimiento de Bacilo brevis y un rendimiento de tirotricina de 0,5 g por litro. También usaron úrea en medio conteniendo succinato de amonio pero el rendimiento de producción de tirotricina disminuyó a 0,2 g/litro. La adición de biotina en proporción de 0,005 mg/litro originó un marcado aumento en la proporción de tirotricina hasta de 0,9 g/litro.

Además comprobaron que la mayoría de las cepas crecían en medios de cultivo aereados sumergidos, conteniendo fuentes nitrogenadas complejas, pero no producían tirotricina aunque una cepa originó el antibiótico en una proporción de 0,2 g/litro, en un medio peptonado.

EXTRACCION DE LA TIROTRICINA DE LOS LIQUIDOS DE CULTIVO DEL BACILO BREVIS . SEPARACION DE SUS COMPONENTES.

La actividad bactericida del Bacilo brevis fué primero determinada en filtrados de cultivos autolizados. El primitivo método de extracción utilizado por Dubos (22) consistía en acidificar el líquido de fermentación con HCl concentrado hasta pH 4,5 y el precipitado obtenido, constituído por material celular y la sustancia bactericida, era redisuelto a p H 7. Esta fué la primer preparación concentrada del producto.

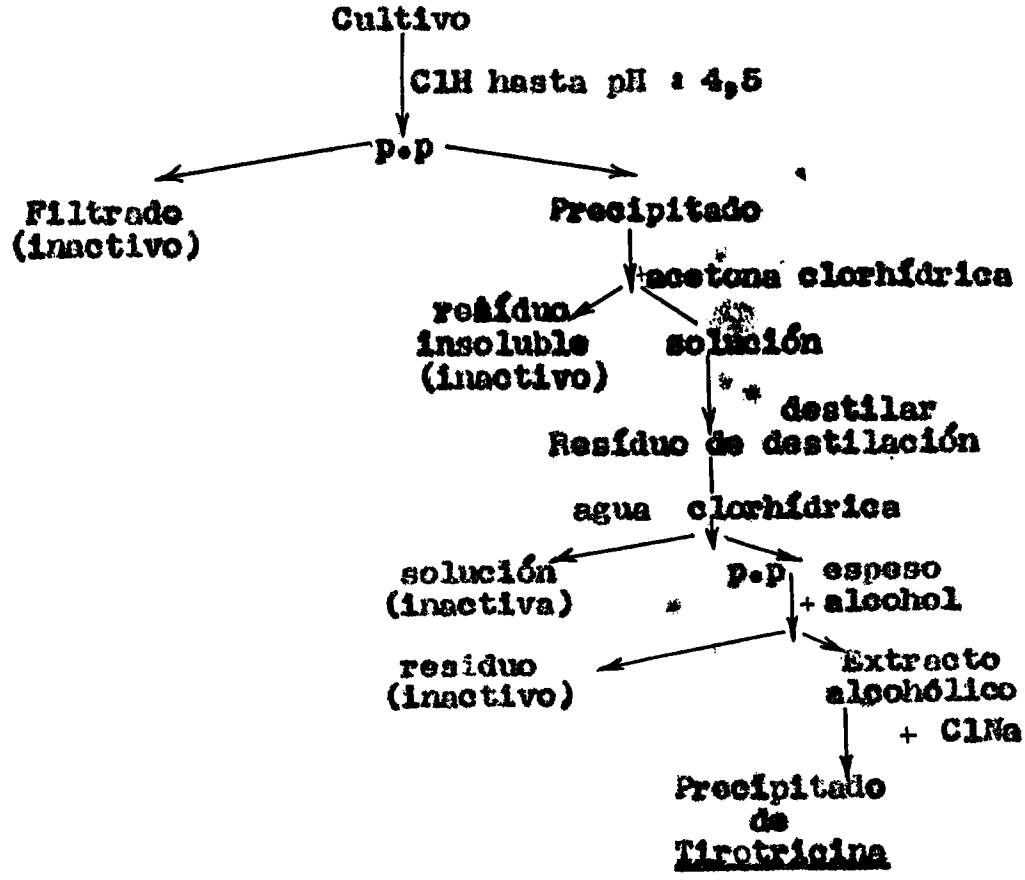
Posteriormente,Dubos en colaboración con Cattáneo (23), comprobaron que el agente activo está asociado con una proteína y que tratando el precipitado con acetona clorhídrica se solubilizaba la fracción antibiótica pero además se obtenía un precipitado que era de naturaleza proteica, soluble en agua, precipitable a pH 4,5 y nuevamente soluble en exceso de ácido. Esta sustancia de naturaleza proteica no posee actividad antibacterial, y la actividad bactericida de la fracción soluble en acetona es mucho mayor que la del cultivo bruto.

Cuando el extracto cetónico es destilado a presión reducida, en el balón de destilación queda un residuo marrón, insoluble en agua pero muy soluble en acetona y alcohol. Posee actividad bacteriolítica contra el neumococos y estafilococos y proteje las ratas contra infécciones experimentales.

Este preparado libre de proteína retiene la actividad del líquido original, tanto cualitativamente como cuantitativamente.

El material activo de la solución acetónica puede ser precipitado por adición de 10 volúmenes de una solución acuosa de ClNa al 0,5 %. El precipitado filtrado o centrifugado contiene la actividad bactericida de la solución original de acetona. Esta fracción activa es insoluble en éter sulfúrico, éter de petróleo, cloroformo, benzol, toluol, y también en agua. Por el contrario es muy soluble y conserva su actividad en acetona, dioxano, alcohol, piridina y ácido acético glacial.

Se puede resumir lo expuesto en el siguiente esquema:

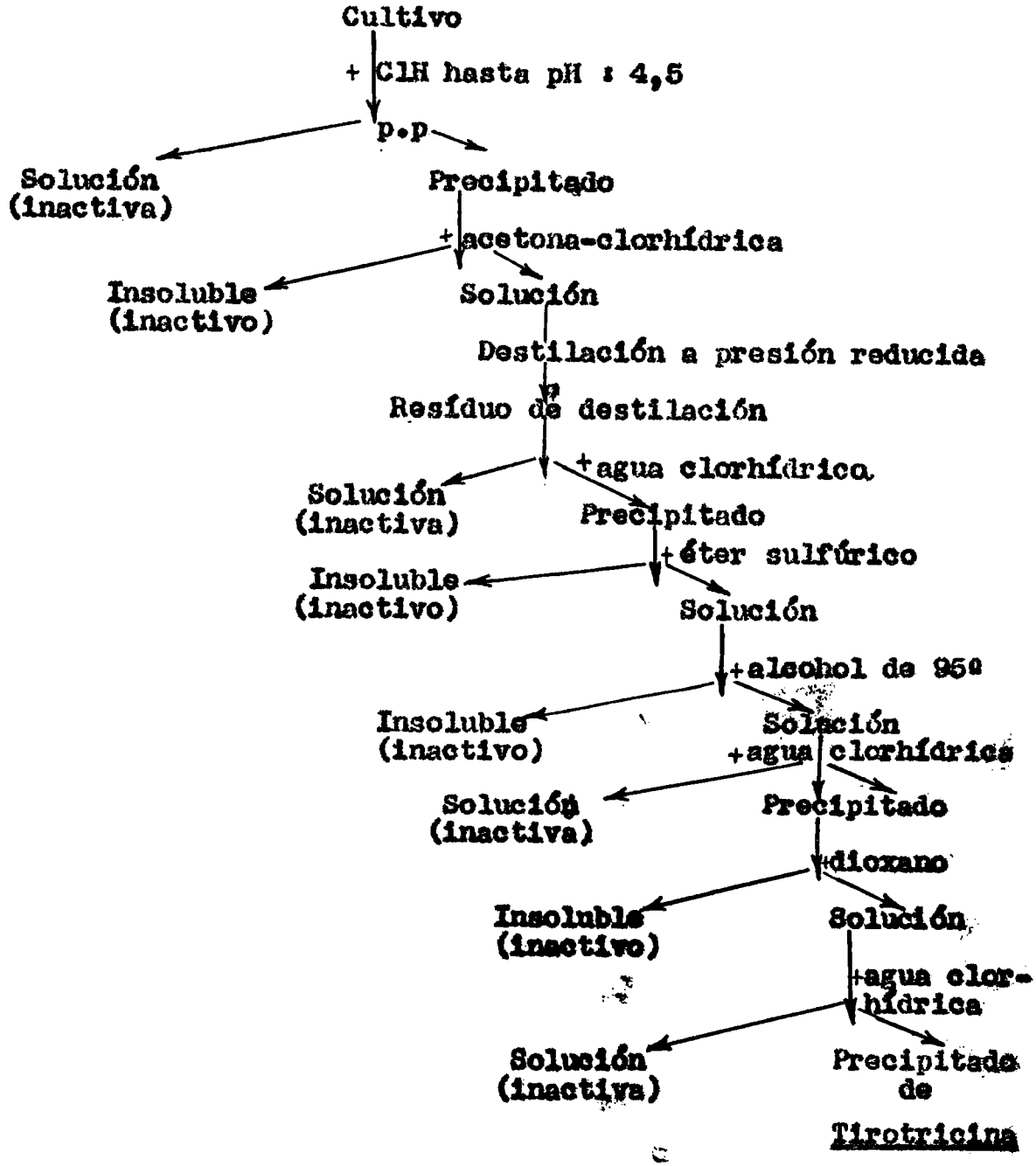


Otra técnica de separación de tirotricina de medios de cultivo, utilizada también por Dubos y Cattáneo es la siguiente:

El medio de cultivo a base de triptona al 1%, inoculado e incubado cuatro días a la temperatura de 37ºC, fué acidificado con ClH concentrado a pH 4,5 y se obtuvo un precipitado constituído por material celular y el antibiótico. El precipitado es separado por filtración y el material que queda en el filtro es tratado con acetona clorhídrica y dejado 24 horas en reposo, luego se filtra, el extracto cetónico es destilado a presión reducida y el resíduo que queda en el balón de destilación es tratado con agua clorhídrica formándose un precipitado el que se separa por filtración a través de un filtro de Büchner, el filtrado es descartado y el precipitado es desecado al vacío sobre P_2O_5. El material seco es extraído varias veces con éter sulfúrico y luego tratado con alcohol de 95º en el que quedan insolubles algunas impurezas. La fracción insoluble se descarta y el material soluble en alcohol fué precipitado por adición de agua clorhídrica filtrado por Büchner y secado al vacío. El precipitado seco tratado con dioxano deja un resíduo insoluble que es descartado y el material soluble nuevamente precipitado con agua clorhídrica. El precipitado fué secado al vacío sobre P_2O_5.

Se sintetiza lo dicho en el siguiente esque-

ma:



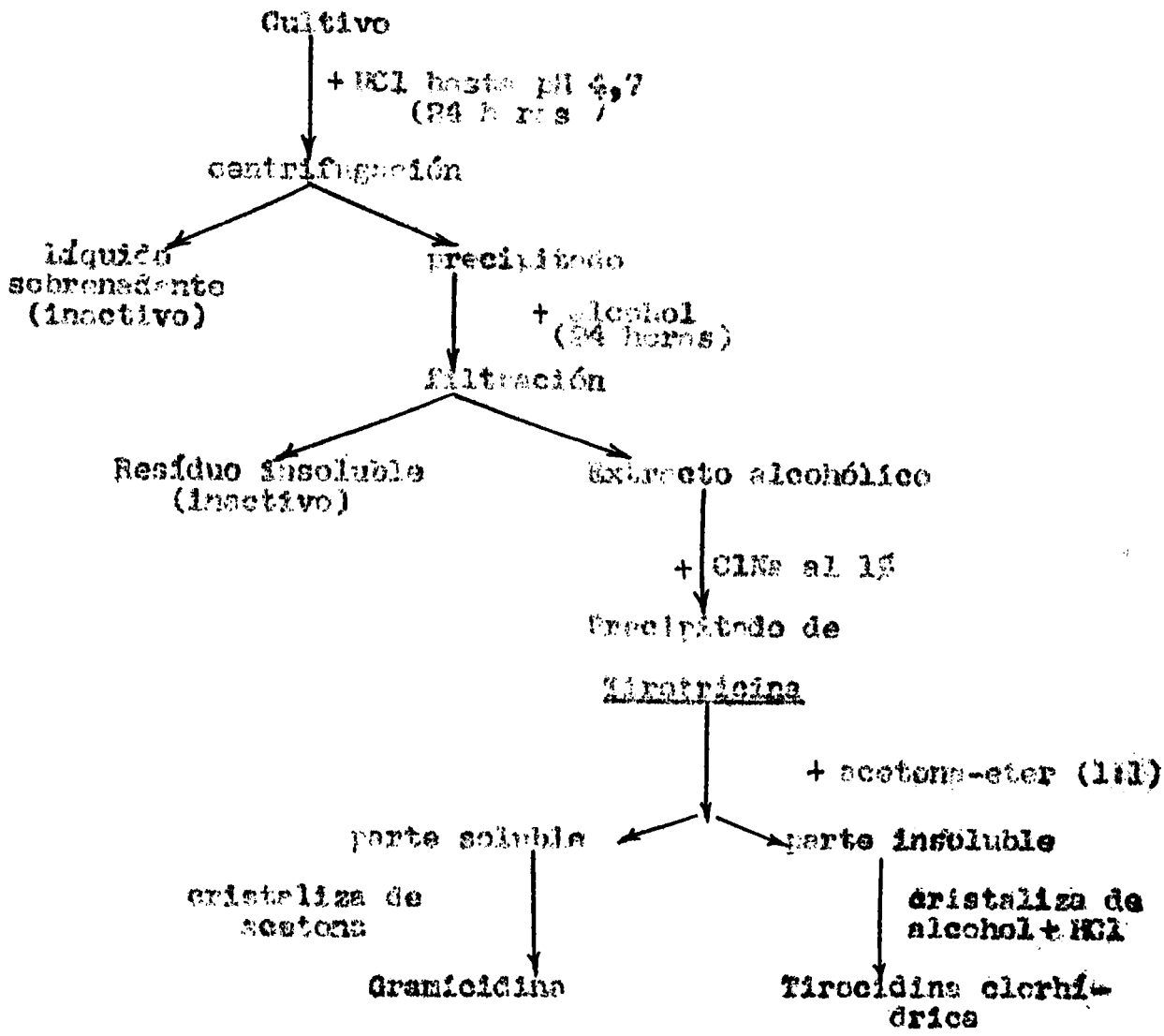
Hotchkiss y Dubos (78) separan tirotricina de los líquidos de fermentación, siguiendo el procedimiento de Dubos y Cattáneo pero habiendo introducido algunas modificaciones.

El medio de cultivo inoculado, fué incubado a 37º C, seis días y al final de este tiempo se le adicionó HCl concentrado hasta pH 4,7, se dejó 24 horas en reposo a temperatura ambiente, luego se centrifugó, el líquido sobrenadante fué descartado y el precipitado se tomó con 50 ml de alcohol de 95º, por litro de cultivo original, dejando en reposo y luego filtrado a través de papel de filtro, el extracto alcohólico se diluyó con 10 volúmenes de una solución acuosa de ClNa al 1 por ciento obteniéndose un precipitado que contiene el antibiótico; el precipitado es separado por filtración y desecado sobre P_2O_5 al vacío.

La tirotricina (94) fué fraccionada en dos componentes aprovechando la diferente solubilidad de los mismos en mezclas de acetona -éter (1:1).

Los rendimientos de los precipitados (78), variaron según la cepa que utilizaron para inocular el medio, así, los mayores rendimientos los obtuvieron con los siguientes cultivos: Bacilo brevis (BG), cultivo $T.C^3$ (aislado de un queso Turkish) y un cultivo IBa^3 (obtenido de aguas de albañal).

El esquema (95) de la separación es el siguiente:



SEPARACION DE LOS COMPONENTES

Se trata la tirotricina (94) con volúmenes iguales de acetona-éter (1:1) en un recipiente que contiene perlas de vidrio y se agita, se realizan así dos o tres extrac-

ciones con 10 ó 20 partes de solvente, se separa la mayor parte de la gramicidina. Se evapora el extracto hasta consistencia gomosa y es disuelto en cinco veces su peso de acetona caliente. La cristalización es total en pocas horas. La recristalización con acetona hirviente y lavado de los cristales con acetona fría y con éter da un producto de alta pureza.

Los cristales de gramicidina se presentan bajo formas de placas lanceoladas y de contorno parecido a una lente biconvexa. Cuando la cristalización se efectúa lentamente los bordes de los cristales se vuelven rectangulares. Después de varias cristalizaciones presentan como cristales débilmente coloreados.

Con este procedimiento se obtiene aproximadamente 10-20 % de gramicidina con respecto a la tirotricina bruta de que se parte.

El resíduo insoluble que queda cuando se extrae la gramicidina con la mezcla acetona-éter, se trata con cuatro veces su peso de alcohol absoluto caliente, la solución es enfriada y se le agrega, luego, alcohol clorhídrico. En esas condiciones, la tirocidina cristaliza bajo formas de agujas agrupadas, las cuales son recristalizadas con alcohol metílico.

Con esta técnica de extracción se obtiene un rendimiento de tirocidina clorhídrica que oscila entre 40-60% con respecto a la tirotricina bruta de que se parte.

PROPIEDADES Y NATURALEZA QUIMICA DE LA GRAMICIDINA

El punto de fusión (94) de la gramicidina oscila entre 230-231ºC (corregido) y 228-230ºC (no corregido).

Poder rotatorio: $[\alpha]_D^{25} = +5$ (c=0,4% en alcohol 95º)

Poder rotatorio: $[\alpha]_D^{25} = +2,5$ (c=1,5% en alcohol absoluto)

La gramicidina es soluble en alcoholes de baja graduación, acetona o dioxano diluídos, ácido acético y piridina. Moderadamente soluble en acetona y dioxano anhidros. Es insoluble en agua, éter, cloroformo e hidrocarburos.

Cuando a una solución alcohólica conteniendo de 20-50 mgr/ml de gramicidina se diluye a 1 mgr/ml, con agua destilada o solución de glucosa, se forma una solución opalescente, pero que no flocula. Por el contrario con solución de electrolito flocula rapidamente.

Tishler (96) y sus colaboradores cuando trataron la gramicidina con ácidos flaviánico y rufiánico en alcohol metílico, obtuvieron flavianato y rufianato de gramicidina al estado cristalino.

La gramicidina (94) (96) (97) contiene C, H, N, y O y el análisis elemental reveló: $C_{62,7}\ H_{7,59}\ N_{14,8}$.

Las determinaciones del peso molecular dieron resultados diferentes según la calidad del solvente orgánico y la concentración. Así el peso molecular (86) en alcanfor osciló alrededor de 1.400. Cuando se utilizó (96) como solvente el ciclo-hexanol y el peso molecular se determinó por crioscopía, los valores obtenidos oscilaron entre 899 y 1.220, que dependieron de la concentración de gramicidina utilizada. Cuando Tishler y colaboradores usaron fenol, como solvente, el P.M fué de 864-908.

Gordon, Martin y Synge (98) sugirieron que estas variaciones en los valores del P.M eran debidas a presencia de agua en la gramicidina que no había sido separada completamente en los procesos de desecación de la droga. Así, por destilación isotérmica (96) en metano-1, que separó el agua, dió valores del P.M mucho más altos que los indicados anteriormente, de 3.100.

La gramicidina (99) (100) no tiene grupos ácidos ni básicos libres y por hidrólisis se comprobó que es un polipeptido y el total de N es explicado por compuestos amino-ácidos y por un 1-2 amino alcohol, la presencia del mismo fué revelada por tratamiento con ácido periódico, liberó NH_3 y aldehido fórmico. El grupo hidroxilo del compuesto amino-alcohol se presume sea el responsable de obtener un derivado acetilado de la gramicidina. Synge (101) identificó al compuesto 1-2 a

mino-hidroxi como 2 amino 1 etanol, y que como mínimo, la gramicidina contiene dos resíduos del mismo.

Lipmann, Hotchkiss y Dubos (102) realizaron ensayos enzimáticos tratando hidrolizados de gramicidina con d-amino ácido oxidasa y comprobaron que el 45 % de los amino ácidos tienen la configuración d.

La presencia de d-amino ácidos fué confirmada por el aislamiento de d-leucina (99)(100) y de d-l valina (98).

Hotchkiss (99), Christensen y colaboradores (100) efectuaron valoraciones cuantitativas de algunos de los amino ácidos de la gramicidina, pero análisis más vastos fueron realizados por Gordon, Martin y Synge (98) por partición cromatográfica de acetil derivados de los amino-ácidos, preparados como indica Gordon (103).

Por hidrólisis profunda de la gramicidina se obtuvieron las siguientes sustancias que juntas responden al dato del N total obtenido en el análisis:

6 leucina (d)

6 triptofano (l)

5 valina (dl)

3 alanina (l)

2 glicina

2 etanol-amina

La estructura molecular (98) de la gramicidi

na podría considerarse como un gran ciclo-peptido formado por la unión de 24 resíduos, con pérdida de 22 moléculas de agua, 22 de los cuales serían α amino-ácidos y con un peso molecular aproximado de 2790. Hotchkiss (99) y Synge (104) dicen que la manera en la cual los resíduos nitrogenados están condensados para dar la gramicidina neutra es un problema que no ha sido dilucidado hasta el presente.

El método de partición cromatográfica fué utilizado por Gregory y Craig (105) con soluciones de gramicidina cristalina en diferentes solventes y obtuvieron por lo menos cuatro componentes: una fracción de gramicidina que cuando cristalizó en acetona dió cristales en forma de bastones y con un punto de fusión: 258-259ºC y que denominaron gramicidina B. Otra fracción que cristalizó en finas hojas y cuyo punto de fusión fué: 227-228ºC, y la llamaron gramicidina A. Ambas porciones revelaron por espectros de absorción triptofano pero la gramicidina A aparentemente reveló el más alto porcentaje. Las otras porciones que contenían mezclas, tenían menos triptofano.

Tiras de papel para análisis cromatográfico (106) revelaron que la gramicidina A y B contenían: glicina, alanina, valina, leucina y triptofano.

PROPIEDADES Y NATURALEZA QUIMICA DE LA TIROCIDINA.

La tirocidina clorhídrica (37) primeramente fué denominada ácido gramicídico.

El punto de fusión es (DK) de 240°C (con descomposición)

Poder rotatorio: $[\alpha]_D^{25} = -101^\circ$ (C1% en alcohol de 95°)

La tirocidina clorhídrica es soluble en alcoholes diluídos, ácido acético y piridina. Moderadamente soluble en alcoholes anhidros, acetona o agua. Insoluble en éter, cloroformo e hidrocarburos.

Cristaliza en soluciones clorhídricas de alcohol etílico y metílico.

Análisis elementales realizados por Hotchkiss y Dubos revelaron los siguientes valores:

$C_{59,6}$ $H_{6,7}$ $N_{14,3}$ $Cl_{2,8}$

Ogston (97) intentó determinar el P.M de la tirocidina en ácido acético diluído, usando la ultracentrífuga y los valores considerados como probables oscilaron entre 1000 y 3000.

La tirocidina (37) es un polipéptido básico conteniendo amino grupos libres y un pK^1 aproximado de 8,5.

Idpmann, Hotchkiss y Dubos (102) demostraron que el 20% de los amino ácidos tienen la configuración d.

Por hidrólisis (99) (100) ácido de la tirocidina se demostró la presencia de triptofano, tirosina, fenil alanina, leucina, un ácido dicarboxílico (en parte ácido aspártico), NH_3 y bases nitrogenadas precipitables con ácido fosfo-túngstico.

Gordon colaboradores (107) estudiaron los productos de hidrólisis ácida de la tirocidina, por partición cromatográfica sobre gel de sílice, separaron y caracterizaron los acetil derivados de: tirosina, fenil-alanina, leucina, prolina, valina, ornitina, ácido glutámico y también fracciones que parecían contener ácido aspártico y triptofano.

De estos amino-ácidos la fenil alanina pertenecía la d-configuración y los demás (excepción del triptofano cuya actividad no fué determinada) eran de la forma l.

Christensen, Uzman y Hegsted (108) comprobaron la existencia, en los hidrolizados de tirocidina, del l-ácido aspártico y que el triptofano tenía la configuración l.

La molécula de tirocidina (97) tiene cerca de 20 moléculas de amino-ácidos que se unen con pérdida de 22 moléculas de agua. La fórmula empírica es: $C_{127}H_{166}N_{26}O_{26}.2HCl$ y P.M : 2546.

2 triptofano	(l)	2 ornitina	(l)
2 tirosina	(l)	2 valina	(l)
3 fenil-alanina	(d)	2 prolina	(l)
2 leucina	(l)	2 ácido aspártico	(l)

2 ácido glutámico (1) 3 amoníaco

2 cloro

Hotchkiss sugirió que la tirocidina es un ci-
clo-peptido en el cual dos de los amino grupos δ de la ornitina, de la cadena lateral, están libres y son los que se combinan con el HCl y tres de los grupos carboxílicos de los amino-ácidos di-carboxílicos están combinados como ($-CO-NH_2$) amidas con el NH_3. Esta distribución deja un grupo carboxílico libre, pero no ha sido establecido con certeza. Sin embargo ha sido demostrado en forma evidente que los grupos fenólicos de los residuos de la tirosina y los δ amino grupos de los resíduos de ornitina están realmente libres.

La más probable unidad molecular (99) de la tirocidina sería la presencia de 2 amino grupos, 3 amido grupos, un débil grupo carboxílico y otro fenólico.

ACCION DE LAS ENZIMAS SOBRE LA TIROTRICINA. GRAMICIDINA. TIROCIDINA.

La tirotricina (22) resiste la acción enzimática de la tripsina: cristalina y cruda, pepsina y quimotripsina. Tratada con (97) tripsina, papaína, erepsina y proteasa de origen bacterial, precipita pero no es digerida.

Ensayos semejantes se hicieron sobre tirotricina, gramicidina y tirocidina a varios pH y con tripsina cruda, pepsina y papaína. También mostraron ser resistentes a la acción enzimática (99).

Este modo de comportarse frente a las enzimas se cree es una consecuencia del gran contenido en amino-ácidos de configuración d, también llamados "no naturales" (97).

MECANISMO DE ACCION. TOXICIDAD. APLICACIONES.

La tirotricina (22) al actuar sobre organismos sensibles a su acción produce lisis de los mismos, pero esta acción se la considera como un proceso secundario que concierne a las enzimas autolíticas de los gérmenes que son puestas en juego al recibir la acción primaria causada por el antibiótico.

La gramicidina y tirocidina poseen propiedades antibacteriales pero difieren en muchas propiedades no solo químicas sino también biológicas. La tirocidina (109) inactiva completamente los sistemas de óxido-reducción de las células sensibles. La gramicidina causa solo una limitada injuria a las células bacterianas y ya puede estimular o deprimir algunas de las funciones metabólicas según la composición del medio en el que actúa.

Hotchkiss y Dubos (94) dicen que la tirocidina es semejante a los detergentes catiónicos en sus efectos sobre la tensión superficial, y puesto que muchos detergentes catiónicos son bactericidas, esta similitud podría ser significativa.

Heilman y Herrel (110) al mismo tiempo demostraron que la gramicidina tiene una menor pero definida ac-

ción depresora sobre la tensión superficial, cuando este agente se encontraba en soluciones acuosas, solución Tyrode o solución de ClNa al 0,9% pero cuando se aumentaba la solubilidad de la gramicidina por adición de 10% o 2% de glicerina y 5% de alcohol los descensos de la tensión superficial se aproximan a los de la tirocidina.

Estos mismos investigadores también comprobaron que al calentar la gramicidina perdía sus propiedades bactericidas y hemolíticas pero no la actividad superficial y así, pensaron que las propiedades citadas en primer término son más específicas.

La gramicidina (111) es bactericida en pequeñas concentraciones, para bacterias Gram (+); en las mismas dosis es hemolítica pero no se observan efectos tóxicos para granulocitos, fibroblastos o células de la serie linfoidea. Estas cualidades: a) actividad bactericida, b) actividad hemolítica, c) pequeña toxicidad son características de algunas sustancias llamadas detergentes y la gramicidina procede como un detergente aniónico y es neutralizada por un detergente catiónico como el "Phemerol".

Blinnikova (112) dice que la tirotricina además de inhibir la enzima de-hidrogenasa de la glucosa, actúa sobre

el ácido glutámico, alcohol etílico, ácido láctico, fumárico y acético.

Macheboeuf (113) afirma que la acción antibiótica de la tirotricina no puede considerarse como una simple modificación de la tensión superficial y acción lítica, sino que es una acción mucho más compleja, comprendiendo una acción inhibidora del metabolismo de ciertas reacciones enzimáticas. Así por ejemplo: comprobaron que la tirotricina inhibía la acumulación del ácido adenosín-trifosfórico durante el proceso de glucolisis y también impedía la formación del piruvato (no actúa sobre la formación de otros ésteres fosfóricos derivados de glucidos). Por el contrario sobre el mecanismo de los mononucleotidos ejerce un efecto estimulante.

La gramicidina (110) presenta una especificidad de acción antibacterial. En general no afecta los gérmenes Gram (-) en cambio la tirocidina es eficaz contra bacterias Gram (+) y (-).

La tirocidina ejerce su acción bactericida aún en presencia de grandes cantidades de suero.

La tirotricina cruda parece ser mucho más activa que lo que podría esperarse de los componentes al estado cristalino.

Dubos (114) y Cattaneo (93) comprobaron que este agente protege ratas blancas infectadas experimentalmente con diferentes cepas de neumococos virulentos, tipo I y III, estreptococo hemolítico virulente del grupo A y C y a veces hasta se observan efectos curativos contra infecciones establecidas.

Herrel y Heilman (115), usando la técnica de cultivos de tejido, observaron los efectos bactericidas de la tirotricina, gramicidina y tirocidina. La gramicidina posee un efecto más marcado contra las bacterias Gram (+). La tirotricina "in vitro" es hemolítica y esta acción se debe a la gramicidina, la tirocidina no parece ser muy hemolítica. Por el contrario, Rammelkamp y Weinstein (116) dicen que la acción hemolítica, de la tirotricina, reside primordialmente en la fracción tirocidina, aunque la gramicidina también exhibe un definido efecto hemolítico. La adición de pequeñas cantidades de glucosa inhiben muy ligeramente el efecto hemolítico.

La gramicidina y tirocidina no parecen producir alteraciones importantes sobre los glóbulos blancos.

Henle y Zittle (117) comprobaron que la tirotricina detiene la respiración y destruye la motilidad del espermatozoide de los bovinos.

Varios investigadores se han dedicado a experimentar sobre la tirotricina tratando de disminuir o neutralizar la acción hemolítica. Así Lewis (118) y colaboradores en Estados Unidos, observaron que el formol disminuye la actividad hemolítica original en un 80-90% pero paralelamente decrece la actividad antibiótica en un 50%. Este hecho fué el índice para buscar agentes que se combinaran con la gramicidina y dieran un producto soluble en agua, menos tóxico y con alto poder antibacteriano.

Fué preparado un derivado succínico (119) de la metilol-gramicidina, que tiene una actividad antibacteriana mucho menor que la gramicidina pero posee propiedades hemolíticas y tóxicas mucho más débiles.

Skadhauge (120) combinó la tirotricina con el cloruro de cetil-piridinium y obtuvo un producto que tiene la ventaja de ser soluble en agua, aunque la actividad antibiótica "in vitro" es menor que la de la tirotricina nativa.

Lawrence y Thompson (121) han empleado glucosa pero la cantidad necesaria para proteger los glóbulos rojos son excesivas para ser introducidas por vía endovenosa.

Las aplicaciones terapéuticas (122) de la tirotricina están restringidas al uso local, en aplicaciones tó

picas e irrigaciones en cavidades cerradas que no estén en comunicación con el torrente sanguíneo y siempre que hayan sido atacadas por microorganismos Gram positivos, inclusive los neumococos, estafilococos, estreptococos, bacilos diftéricos y otros.

Dubos (123), Rammelkamp, Weinstein (124) y otros mostraron que la gramicidina es ineficaz por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea y que además es tóxica.

Wright (125) comunica que este antibiótico no ejerce acción bactericida cuando se administra por vía rectal.

Rammelkamp y Weinstein (126) encontraron que la tirotricina en pequeñas cantidades es bactericida contra el L.acidophilus "in vitro" pero no ejerce efectos sobre el mismo organismo cuando se administra por boca a animales. En las cantidades ensayadas la tirotricina no produjo lesiones en el tracto intestinal.

Es eficaz para el tratamiento de las osteomielitis (6). También en el empiema y los abcesos abiertos del pulmón causados por estreptococos y neumococos.

También se emplea en (127) (128) otorrinolaringología, oftalmología, lesiones de la piel y tejidos blandos.

Resultados satisfactorios fueron obtenidos por Rapallini (129) en odontología en el tratamiento de los conductos radiculares.

Piper (3) ha encontrado que en ciertas infecciones piógenas es muy activa.

Reilly (130) menciona el empleo de la tirotricina en la cistitis tuberculosa y comunica que los resultados fueron muy inconstantes.

Tratamientos efectuados en (131) la colitis ulcerosa crónica con tirotricina dieron resultados satisfactorios.

III

PARTE EXPERIMENTAL

A) CULTIVO DE BACILO BREVIS

1) Origen de la cepa:

Se realizaron siembras utilizando varias cepas de procedencia Argentina y de los EE.UU. Los ensayos definitivos se efectuaron con la cepa de Bacilo brevis (BG) del United States Department of Agriculture.

Dicho germen respondía a todas las características relatadas en el Manual Bergey, se presenta como un germen bacilar, tamaño 4 x 0,5 μ solo o agrupado en pares, con esporos centrales o subterminales, resiste temperaturas de 80º C pero muere a temperatura de ebullición. En cepas jóvenes es Gram positivo luego Gram negativo.

2) Estudio del medio de conservación de la cepa:

La cepa original se sembró en medio de agar al 2% a pH 7,5 y se conservó en heladera a 4º C, es indispensable mantenerla a baja temperatura y efectuar repiques periódicamente sobre placas frescas, una vez por mes, pues aunque se trata de un germen esporo formador, se observó que al mantenerlo a temperatura ambiente durante varios meses, término medio seis meses, al efectuar repiques el Bacilo brevis no se multiplicó.

En los cultivos de Bacilo brevis sobre agar se

observan dos tipos de colonias una de color blanco y otra con pigmentación amarilla.

3) Estudio del medio de desarrollo de la cepa:

Se realizaron los siguientes estudios fundamentales:

1) Siembra directa del cultivo stock, mantenido a una temperatura de 37º C.

2) Siembra previos repiques repetidos, mantenido a una temperatura de 37º C.

3) Siembra previos repiques repetidos, mantenido a una temperatura ambiente de 13-22ºC.

4) Influencia de la mutación del Bacilo brevis.

5) Influencia de la temperatura en la fisiología del Bacilo brevis.

Método operatorio

1) Siembra por repiques simples.

El medio del stock, agar alto, se repica sobre agar inclinado, se mantiene en estufa a 37ºC, 24 horas, transcurrido este tiempo se observan colonias del germen, redondas, de bordes lisos y brillo perlado. Se adicionó con pipeta estéril 2-3 ml de agua destilada estéril, se agitó el tubo por simple rotación entre las manos y así se consiguió la sus

pensión de los gérmenes, luego con pipeta estéril se aspiraron unos mls que se adicionaron al medio de cultivo que se usa para la obtención de tirotricina en superficie (Este medio en lo sucesivo se denominará A y su composición se indica en el capítulo B), se colocó el cultivo en estufa a la temperatura de 37ºC, 7 días, al cabo de los cuales se observó en la superficie del medio una película gruesa de color blanco y superficie lisa. El rendimiento de tirotricina fué de 1,243 gr% y 1,240 gr% controlada según los métodos de Kittemberg y gravimétrico respectivamente y actuaba en una dilución de 1/561 correspondiendo a una dilución real de tirotricina de 1: 1.122.000 (En el capítulo IV se indican las técnicas empleadas en el control de tirotricina).

2) Siembra previos repiques repetidos

Se partió de la cepa stock, se hicieron repiques cada 24 horas sobre agar inclinado, se incubó en estufa a 37ºC luego de efectuar veinte pasajes se suspendieron los gérmenes en agua estéril en la misma forma que se procedió en 1), se sembró el medio de cultivo A, se incubó a 37ºC, 7 días, al término de este período se observó en la superficie del cultivo la aparición de una película menos gruesa que la obtenida con el cultivo stock y menor rendimiento de tirotricina. Titulada

por el método de Rittenberg dió 0,518 gr%o, 0,516 gr%o por gravimetría y ejercía una acción antibiótica en la dilución 1/121 correspondiente a una dilución real de tirotricina de 1:242.000.

3) Siembra previos repiques repetidos pero la incubación se realizó a temperatura ambiente (18-22ºC)

Con la cepa stock se realizaron repiques sobre agar, incubación a temperatura ambiente (18-22ºC), cada 48 horas tiempo necesario para observar la aparición de las colonias. Se realizaron 10 pasajes, luego se sembró el medio A, se incubó a 37ºC, 7 días y se obtuvieron rendimientos semejantes a los de la técnica anterior. Por gravimetría 0,500 gr%o por el método de Rittenberg 0,505 gr%o y por el método de las diluciones seriadas fué activo en la dilución 1/121 correspondiente a una dilución real de tirotricina de 1:242.000.

4) Influencia de la mutación del Bacilo brevis.

Como ya se expresó, en los cultivos de Bacilo brevis sobre agar se observan dos tipos de colonias, una de color blanco y otra con pigmentación amarilla, cuando se hicieron siembras de las colonias aisladas sobre agar se repitieron las mismas variaciones. Se supuso que estas colonias con diferentes pigmentos podían tener influencia en el rendimien-

to de tirotricina, se realizaron varios ensayos de producción con esas cepas e inoculando el medio de cultivo A. El rendimiento del antibiótico fué similar al de la cepa stock.

5) Influencia de la temperatura sobre la fisiología del Bacilo brevis.

Se partió de cultivos de Bacilo brevis en el medio A, que habían sido incubados a 37º C, 24 horas, la película formada en la parte superior contenía numerosos esporos y formas vegetativas del Bacilo brevis, se sometió el cultivo a la temperatura de 80ºC, en B.M 30 minutos, en el transcurso de los cuales se realizaron repiques, sobre el mismo medio A, comenzando en 0 minuto, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 y 30 minutos, colocando en estufa 37ºC. Se pudo deducir, de la observación de los cultivos obtenidos con esos repiques, un aumento de la termorresistencia del germen en el sentido que la cepa original al calentarla más de 12 minutos necesitaba 48horas de incubación para desarrollarse. El tubo que había sido calentado 12 minutos y tenía crecimiento fué nuevamente calentado a 80ºC, 30 minutos y se volvieron a repetir las siembras desde 0 minuto hasta 30 minutos en los mismos intervalos anteriores, incubación a 37ºC y se repitió esta operación 10 veces, utilizando el tubo que tenía crecimiento y que había sido calentado menor tiempo. Se sembró sobre agar inclinado,

luego sobre el medio A y al cabo de 7 días á 37ºC se observó que el crecimiento era similar al de la cepa stock pero se notó una disminución apreciable del poder de producción. Así el método de Rittenberg reveló 0,101 gr%o y el gravimétrico 0,098 gr%o. La acción bactericida fué de 1/11 correspondiendo a una concentración real de tirotricina de 1/22.000. Al observar estos resultados hay que tener en cuenta que sobre la capacidad de producción del germen han influído dos factores: a) los repiques sistemáticos y b) la acción del calor. (Gráfico Nº 1).

Cepa stock

A-Repiques simples.
B*Repiques repetidos(37°C).
C-Repiques repetidos(18-22°C).
D-Repiques repetidos y acción del [illegible]

Formas de mutación de la cepa [illegible]
A'-Repiques simples.
B'-Repiques repetidos(37°C).
C'-Repiques repetidos(18-22°C).
D'-Repiques repetidos y acción del cal[illegible]

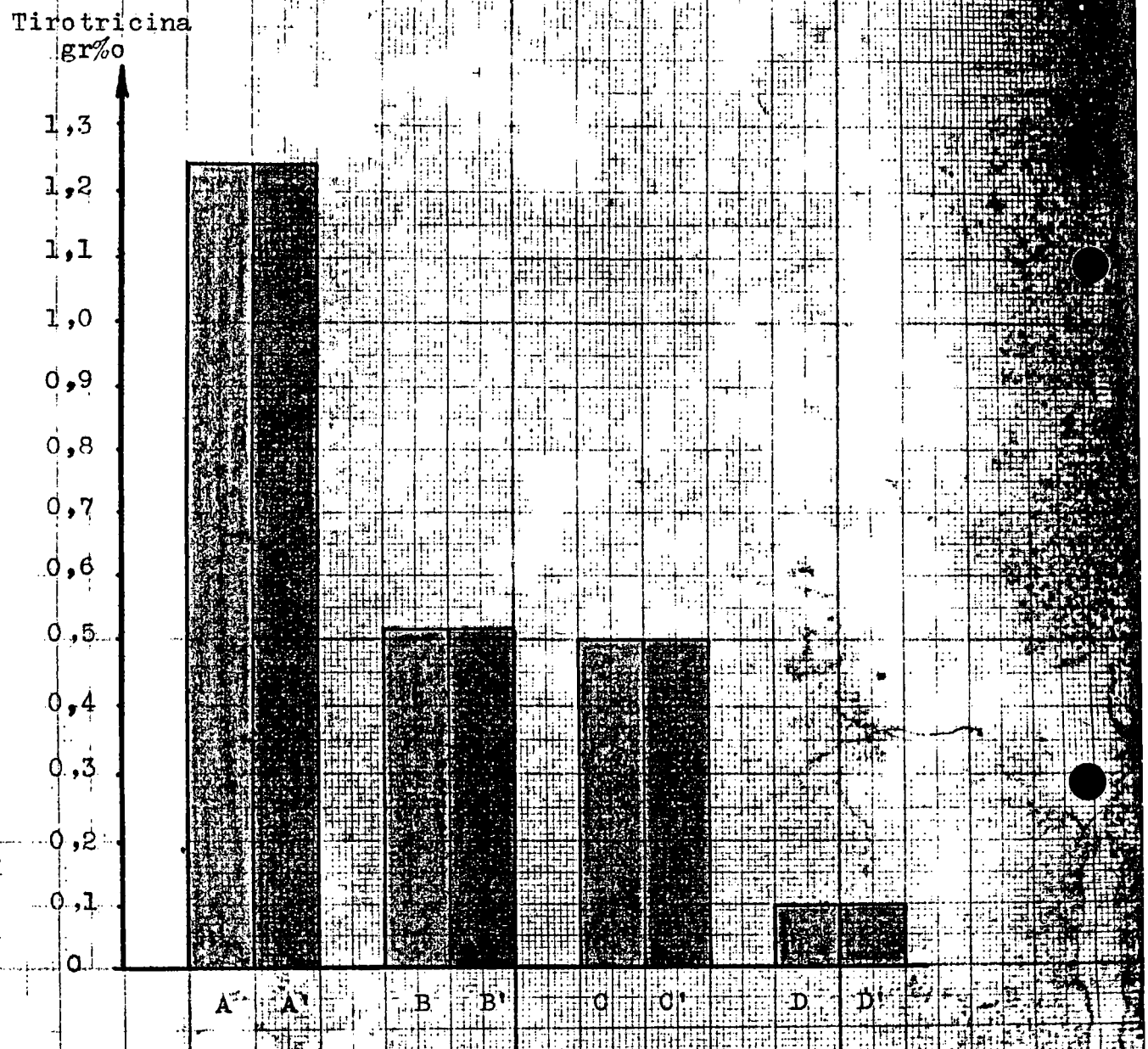


Gráfico N°2.

1) PRODUCCION POR CULTIVO EN SUPERFICIE

B) PRODUCCION DE TIROTRICINA

1) Producción por cultivo en superficie

a) Influencia de la fuente nitrogenada.

b) Influencia del pH del medio.

c) Influencia de factores accesorios.

I) Producción por cultivo en superficie:

El medio básico (A) utilizado en todas las experiencias fué el de Lewis, Dimick y Feustel (33) cuya composición es la siguiente:

Bacto-Triptona	1,5 %
Glucosa	3 %
H_2KPO_4	0,070 %
ClK	0,035 %
$SO_4Mg.7H_2O$	0,050 %
Cl_2Ca	0,025 %
Fe (como $SO_4^=$)	2 p.p.m
Mn (como $SO_4^=$)	2 p.p.m

La composición química (132) de la Bacto-Triptona es:

N total	13,72 %
N amínico	8,47 %
Cenizas	6,38 %

En el medio de cultivo descripto se utiliza como fuente nitrogenada Bacto-Triptona que por ser marca de fábrica resulta costosa para la obtención industrial del antibiótico en gran escala. Además la designación con nombre de fantasía de la peptona no significa una variable fácil de reproducir, para obviar el inconveniente de desconocer el origen de la peptona y además obtener fuentes nitrogenadas a bajo costo se decidió preparar peptonas a partir de diferentes materias primas tales como: carne de ganado vacuno por acción de la pepsina y pepsina-pancreatina a pH adecuado; caseína en presencia de pancreatina en medio alcalino y caseína en medio ácido clorhídrico y bajo presión; a partir de hígado porcino más estómago porcino en medio acidulado por ácido clorhídrico y por último peptona obtenida por autolisis de estómago porcino en medio acidulado por ácido clorhídrico.

La técnica de obtención de las mismas es la siguiente:

Preparación de peptonas

a) Preparación de peptona de estómago por autolisis

Se operó con estómago porcino de la matanza del día, se limpió para privarlo del tejido adiposo y mucus que lo acompañan, se picó finamente, se colocó en un frasco Pirex

y se diluyó con tres veces su peso en agua. Se ajustó el pH a 1,9-2,1 con ClH conc. y se dejó autolizar a una temperatura de 45-50º C manteniendo el pH por agregado de ClH conc. cada cuatro horas. Se determinó albumosas y las reacciones resultaron negativas en un tiempo que osciló entre 48-62 horas. Al final de este período se hirvió media hora para destruir la enzima. Se enfrió en cámara frigorífica para que solidificaran las sustancias grasas, se agregó supercel y talco y se filtró a través de papel mojado. Se neutralizó a pH : 6. S concentró al vacío hasta consistencia siruposa y se desecó por Spray.

La peptona obtenida se presentó como un polvo de color amarillo-pardo, muy higroscópico, olor "sui-generis" y de sabor característico.

La determinación de N total y N amínico se realizó sobre el polvo obtenido después de desecación por el Spray y se obtuvieron los siguientes datos:

N total	12,40 %
N amínico	1,601 %

Para la determinación de albumosas se realizaron las siguientes reacciones:

a) La solución acuosa al 10% debe ser límpida y no cambiar por

acción del calor; 10 ml de esta solución no deben precipitar por adición de 1 ml de NO_3H oficinal, agregado gota a gota y a la temperatura de 17-19ºC.

b) Esa misma solución no debe precipitar por adición de un igual volumen de una solución saturada de $SO_4(NH_4)_2$ o de ácido tricloroacético al 20% (albumoses).

c) La adición a esa misma solución de algunas gotas de ácido fosfotúngstico determinará la aparición de un precipitado abundante (diamino-diácidos y polipéptidos).

Todas las determinaciones potenciométricas se realizaron con un potenciómetro Leed y Nortrhup Company, Philadelphia, PA., U.S.A.

b) Preparación de peptona péptica (133).

Carne desengnasada y desfibrinada	1000 gr
H_2O destilada	6000 gr
Pepsina extractiva oficinal	1 gr
ClH oficinal	60 gr
CO_3H Na c.s.p	pH = 2

Método operatorio:

En un frasco Pyrex de 26 litros de capacidad se colocaron 5 kilos de carne vacuna, desengrasada, finamente picada, se agregaron 15 litros de agua potable. Aparte se sus

pendió la pepsina 5 gr., titulada según la F.A. (134), en 500 ml de agua, luego se agregó al contenido del frasco, se ajustó el pH con ClH al 20% hasta pH 1,8-2, se colocó el recipiente en un B.M mantenido a la temperatura de 50ºC, durante 24 horas. A las 12 horas de haber comenzado la digestión se determinó albumosas, por las reacciones descriptas anteriormente, y se obtuvieron resultados positivos (Restos de albumosas). A las 24 horas las mismas determinaciones acusaron resultado negativo. Se hirvió media hora para destruir el principio enzimático. Se neutralizó con $HNaCO_3$ hasta pH 6. Se dejó enfriar en cámara frigorífica para que solidificaran las materias grasas, se agregó supercel y talco y se filtró por papel mojado. Se concentró al vacío hasta consistencia siruposa y se desecó por Spray.

Las determinaciones de N total y N amínico se realizaron sobre el polvo obtenido después de desecación por Spray y se obtuvieron los siguientes datos:

N total	8,95 %
N amínico	1,001 gr%

La peptona obtenida es de color amarillo y de olor característico.

c) <u>Preparación de peptona péptica-pancreática.</u>

Método operatorio:

Una partida de peptona pépsica preparada de acuerdo con la técnica y cantidad anterior antes de concentrar; se neutralizó con CO_3Na_2 en sol.saturada hasta pH 7,5-8, se adicionaron 200 gr de pancreatina titulada según la F.A, previa suspensión de la misma en agua, se colocó el frasco Pyrex en B.M a la temperatura de 45ºC. A las 24 horas se realizaron los ensayos de albumosas que dieron resultados negativos. Se adicionó un trozo de parafina para evitar la formación de espuma y se hirvió media hora con el objeto de destruir la enzima pancreática. Se ajustó el pH a 6, se dejó en cámara frigorífica y así precipitaron las materias grasas, se agregó supercel y talco para facilitar la filtración, se agitó y filtró por papel mojado. Se obtuvo un líquido de aspecto límpido y de color amarillo-ámbar. Se concentró al vacío hasta consistencia siruposa y se desecó por Spray. Polvo de color blanco-amarillento, olor sui-generis y sabor característico.

Los valores de N total y amínico obtenidos fueron los siguientes:

N total	3,52 gr%
N amínico	0,584 gr%

d) Preparación de peptona de hígado

Método operatorio:

Se trabajó con hígado porcino fresco al que se privó del tejido conjuntivo y anexos que lo acompañaban, se picó finamente y se mezcló con la cantidad requerida de estómago, previamente limpio y también picado finamente. De acuerdo con ensayos previos de orientación realizados para conseguir una proteolisis total se emplearon las siguientes proporciones:

Hígado porcino, picado	10 kilos
Estómago porcino, picado	2,500 kilos
Agua destilada	25 litros
ClH c.s.p obtener pH	1,9 - 2,1

El hígado posee un sistema de "buffers" muy poderoso y para obtener un pH de 1,9 - 2,1 es necesario adicionar gran cantidad de ácido.

En este ensayo se realizó la digestión del hígado por acción de la pepsina contenida en el estómago fresco y no por acción de la pepsina extractiva, por los siguientes motivos:

1) La digestión se realiza más rapidamente.

2) El estómago contiene factores de gran valor nutri-

tivo (135) (factor intrínseco de Castle) cuya presencia resultaba interesante en estos ensayos.

3) Los factores nutritivos del estómago parecen tener influencia en la actividad de los elementos similares del hígado (factor intrínseco de Castle).

Tiempo empleado para obtener el hidrolizado de hígado, 72 horas, se mantuvo la regulación del pH por ajuste cada 12 horas. Se hirvió media hora para destruir el principio enzimático. Enfriamiento en cámara frigorífica, se adicionó talco y supercel, se filtró por papel mojado. Se concentró al vacío y se desecó por Spray. Se presenta como un polvo fino blanco-amarillo.

N total	9,8 gr%
N amínico	0,81 gr%

Las determinaciones de N total y N amínico se realizaron sobre el producto obtenido por desecación en Spray.

e) Preparación de peptona de caseína.

Método operatorio:

En frasco Pyrex se colocó 1 kilo de caseína más 5 litros de agua potable, se agregó ClNa al 40% (aproximadamente 50 ml), agitando constantemente hasta disolución parcial de la caseína. Por separado se suspendieron en agua 25

gr de pancreatina (F.A). Se determinó el pH potenciométricamente y se ajustó con OHNa al 10% hasta pH 8 - 8,5, esta operación se realizó antes de agregar la pancreatina. Como conservador se adicionó tolueno en proporción de 3%o. La digestión se realizó en B.M a la temperatura de 45ºC, 24 horas. Al cabo de este tiempo se realizaron pruebas de albumosas y dieron resultados negativo. Se hirvió el contenido del balón, media hora, para destruir la pancreatina, se colocó en cámara frigorífica para precipitar las materias grasas, se adicionó supercel y talco, se agitó y filtró por papel mojado. Se concentró al vacío y se desecó por Spray. Polvo de color amarillo claro.

N total	9 gr%
N amínico	0,366 gr%

f) Peptona a partir de caseína (en medio ácido)

Método operatorio:

La caseína (136) se colocó en un balón previa adición de ClH 3 N y se calentó en autoclave a 1 atmósfera de presión durante 10 horas. Se enfrió en cámara frigorífica se adicionó talco y supercel, se filtró a través de papel mojado. Se concentró al vacío y se desecó por Spray.

N total	6,67 gr%
N amínico	1,02 gr%

DESCRIPCION DEL EQUIPO EMPLEADO EN LA DESECACION POR SPRAY.

Se empleó un aparato piloto (137) fabricado por la casa Kestner (Tipo L.6) que consta de las siguientes partes:

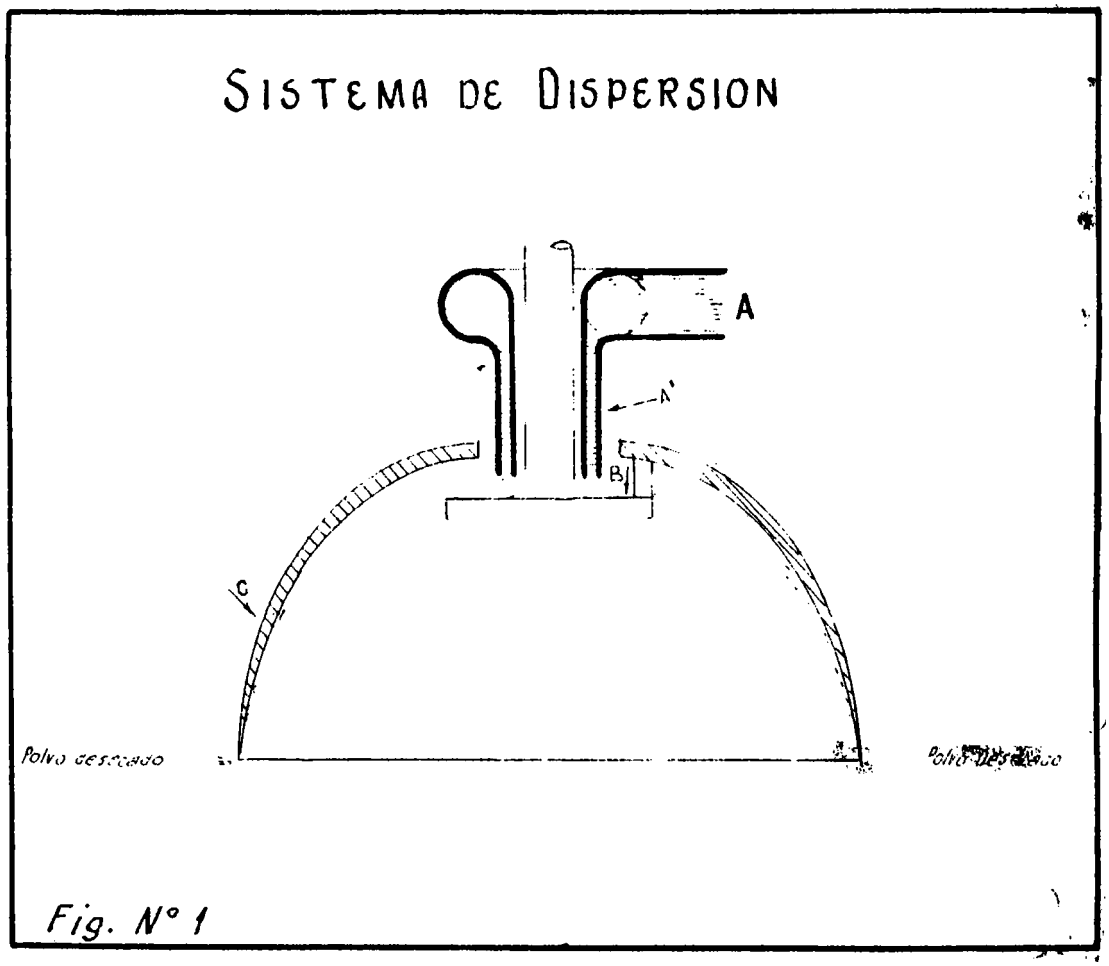


Fig. N° 1

1) Sistema de dispersión:

Está formado por una campana y un disco dotados de movimiento giratorio (6.000 a 10.000 r.p.m). Por acción de la gravedad o por impulsión se hace llegar el material a desecar por el caño A que termina en el disco anular A'a nivel del disco distribuidor B, que por fuerza centrífuga impulsa el material a desecar contra la pared interna de la campana C.

2) Cámara de desecación:

El sistema de dispersión está situado en la parte superior de la cámara de desecación, la que consiste en una amplia cámara de acero estañado, forma cilíndrica y vertical. Su parte inferior afecta la forma de un tronco de cono provista de un agujero de descarga, en la parte frontal tiene una gran puerta que se usa para limpiar el interior de la cámara o para descargar el material; también posee ventanas de observación. Por su parte superior recibe la entrada de aire caliente y en cuatro puntos laterales posee las consecciones de las tuberías de evacuación de aire húmedo que es expulsado por un ventilador a succión.

3) Sistema de circulación de aire caliente:

Un radiador calienta el aire el que es puesto en movimiento por la aspiración producida por un ventilador. El aire penetra en la cámara de desecación a la altura del sistema de dispersión a través de un sistema que lo distribuye de tal manera que determina la formación de una corriente de aire en sentido tangencial con relación al círculo formado por la campana, luego de recorrer la cámara es expulsado a la atmósfera por el ventilador.

4) Sistema de recuperación de polvos desecados:

Consta de cuatro filtros de tela colocados en el interior de la cámara de desecación y a través de los cuales pasa el aire antes de ser expulsado al exterior. Parte del material desecado queda adherido a las telas de los filtros pero la mayor cantidad caen al fondo de la cámara de desecación y pudiendo ser sacado por el orificio inferior o por la puerta lateral.

5) Instrumentos de control:

Control de temperatura y presión

Posee dos termómetros y dos manómetros que da-

terminan la temperatura y presión del aire a la entrada y sa-
lida de la cámara de desecación.

Este sistema de desecación ofrece grandes ventajas para la obtención de polvos finamente divididos de sustancias muy higroscópicas, como en este caso: desecación de diferentes tipos de peptonas. De acuerdo con ensayos preliminares se adoptaron las siguientes condiciones de desecación:

Temperatura del aire de entrada	150º C
Presión de vapor en el calefactor	8 Kgr/cm^2
Temperatura del aire de salida	65ºC
Temperatura de entrada de la solución	55-60ºC

Preparación del medio de cultivo en superficie

a) Preparación del medio de cultivo.

Se colocó en un recipiente que contenía agua potable a la temperatura de ebullición, la cantidad de peptona requerida para 200 litros de medio, según la fórmula del medio de cultivo de Lewis (38) y colaboradores: 3000 gr, se agitó constantemente para facilitar la disolución de la sustancia y se hirvió por espacio de media hora. Por separado se disolvían las sales y se adicionaron a la solución de peptona, se llevó a volumen, se ajustó el pH a 7,4 - 7,5 con OHNa al 10%. Las determinaciones del pH aproximadas se realizaron usando indicadores externos como el Bromo-cresol púrpura y el rojo fenol, sobre piedra de toque y el pH final con el potenciómetro Leed y Nortrhup Company, Philadelphia, Pa., U.S.A.

b) Distribución y esterilización del medio de cultivo.

La solución peptonada-salina se distribuyó en botellas de caras planas de un litro de capacidad y en proporción de 225 ml en cada una. Se obturaron con tapones de algodón recubiertos con gasa y se esterilizó en autoclave a 120ºC media hora. En estas condiciones las botellas quedan listas para ser inoculadas con el Bacilo brevis proveniente del me-

dio de desarrollo.

c) La glucosa se disolvió aparte en solución al 50% y se esterilizó a 120ºC, media hora.

d) Preparación del cultivo madre:

Un día antes de preparar el medio de cultivo se sembraba sobre agar inclinado Bacilo brevis (BG) y se incubaba en estufa a la temperatura de 37ºC, 24 horas., al término de este período se observaba el crecimiento del germen bajo forma de colonias características, redondas, bordes lisos y brillo perlado y poco adheridas al agar. Se adoptaron las máximas precauciones de esterilidad y se adicionaba con pipeta estéril unos 15 ml de agua destilada estéril, se taponaba nuevamente el tubo y se agitaba el mismo por simple rotación entre las manos con lo que se obtenía una suspensión de los gérmenes desarrollados, que posteriormente se utilizaba para sembrar una de las botellas conteniendo el medio de cultivo estéril, previa adición de 12 ml de glucosa estéril, al 50%. Unos pocos ml (2-3 ml) de la suspensión de gérmenes son suficientes para obtener un buen cultivo madre, después de incubar a 37ºC, 24 horas, se observaba sobre la superficie del medio de cultivo una fina película blanquecina y uniforme que indicaba la presencia de un cultivo puro, pues en caso de infección del me-

dio aparecían burbujas en el seno del mismo y la película era de aspecto rugoso. Se agitaba la botella que contenía el cultivo superficial de Bacilo brevis, para suspender los gérmenes y luego con una pipeta estéril se aspiraban 50 ml que se agregaban a la solución de glucosa al 50%. Se mezclaba por simple agitación y se sembraban todas las botellas por adición de 14 ml en cada una. Se colocaban las botellas en estufa a 37ºC un tiempo que oscilaba entre 7-10 días y al final de este tiempo se observaba en la superficie del medio de cultivo una película de espesor variable, de color blanquecino en general el espesor de la película corría paralelo al rendimiento de tirotricina.

a) Influencia de la fuente nitrogenada

En la preparación del medio de cultivo para obtención de tirotricina en superficie se utilizó, como se indicó anteriormente, la fórmula de Lewis y colaboradores, pero como única variante el tipo de peptona usada. Así, se utilizaron los siguientes tipos de peptonas: de autolizado de estómago, de carne por digestión pépsica y por digestión pépsica-pancreática, de hidrolizado de hígado, de caseína por acción de la pancreatina y por hidrólisis ácida y además peptona bacteriológica comercial.

Con todos estos tipos de peptona se prepararon los diferentes medios de cultivo, se esterilizaron, se inocularon con el germen productor del antibiótico y se incubaron en estufa a la temperatura de 37ºC, 7 días y luego se procedió a la extracción del material bactericida de los distintos medios, siguiendo la técnica de Hotchkiss y Dubos (78). Al final del período de incubación se les adicionó a cada uno de los medios ClH conc. hasta pH 4,7, se dejaron a la temperatura ambiente 24 horas en reposo, luego se centrifugaron, se decantaron los líquidos sobrenadantes y los sedimentos se tomaron con alcohol de 95º en proporción de 50 ml por litro de medio de cultivo original, se dejó nuevamente 24 horas en repo-

so y luego se filtraron a través de papel de filtro, los extractos alcohólicos obtenidos se diluyeron con 10 volúmenes de solución de ClNa al 1% y se obtuvieron los precipitados que contenían el antibiótico. Los precipitados se separaron por filtración y se secaron en estufa a 37ºC hasta pesada constante.

Los rendimientos de tirotricina variaron en forma notable en los distintos medios, con lo que se comprobó la importancia que tiene la elección de la fuente nitrogenada para obtener un rendimiento máximo del principio activo con el mínimo gasto. Así las mayores proporciones del antibiótico se obtuvieron con el medio de cultivo que contenía peptona de autolizado de estómago y peptona de carne vacuna por digestión pépsica, luego le seguían los medios que contenían peptonas de hidrolizado de hígado y de caseína por digestión pancreática. Los rendimientos menores de tirotricina se obtuvieron con los medios de cultivo que contenían como base nitrogenada peptona por hidrólisis de caseína en medio ácido, peptona de carne por acción pépsica-pancreática y peptona bacteriológica comercial.

La estimación de tirotricina se realizó por gravimetría, el método de Rittenberg y el método bacteriostático de las diluciones seriadas.

Nº de peptonas	M.Rittenberg	Dilseriada	Dil .real tirotricina	Gravimé trico
1	1,243 gr%o	1/561	1:1.222.000	1,240gr%o
2	1,072 gr%o	1/561	1:1.122.000	1,064gr%o
3	0,320 gr%o	1/121	1:242.000	0,300gr%o
4	0,921 gr%o	1/194	1:388.000	0,918gr%o
5	1,021 gr%o	1/194	1:338.000	1,015gr%o
6	0,311 gr%o	1/121	1:242.000	0,308gr%o
7	0,403 gr%o	1/121	1:242.000	0,400gr%o

(Gráfico Nº 2).

Nº1: peptona de autolizado de estómago.

Nº2: peptona de carne (pépsica)

Nº3: peptona de carne (pépsica-pancreática)

Nº4: peptona de caseína (pancreática)

Nº5: peptona de hidrolizado de hígado

Nº6: peptona de caseína (ácida)

Nº7: peptona bacteriológica comercial.

PEPTONAS

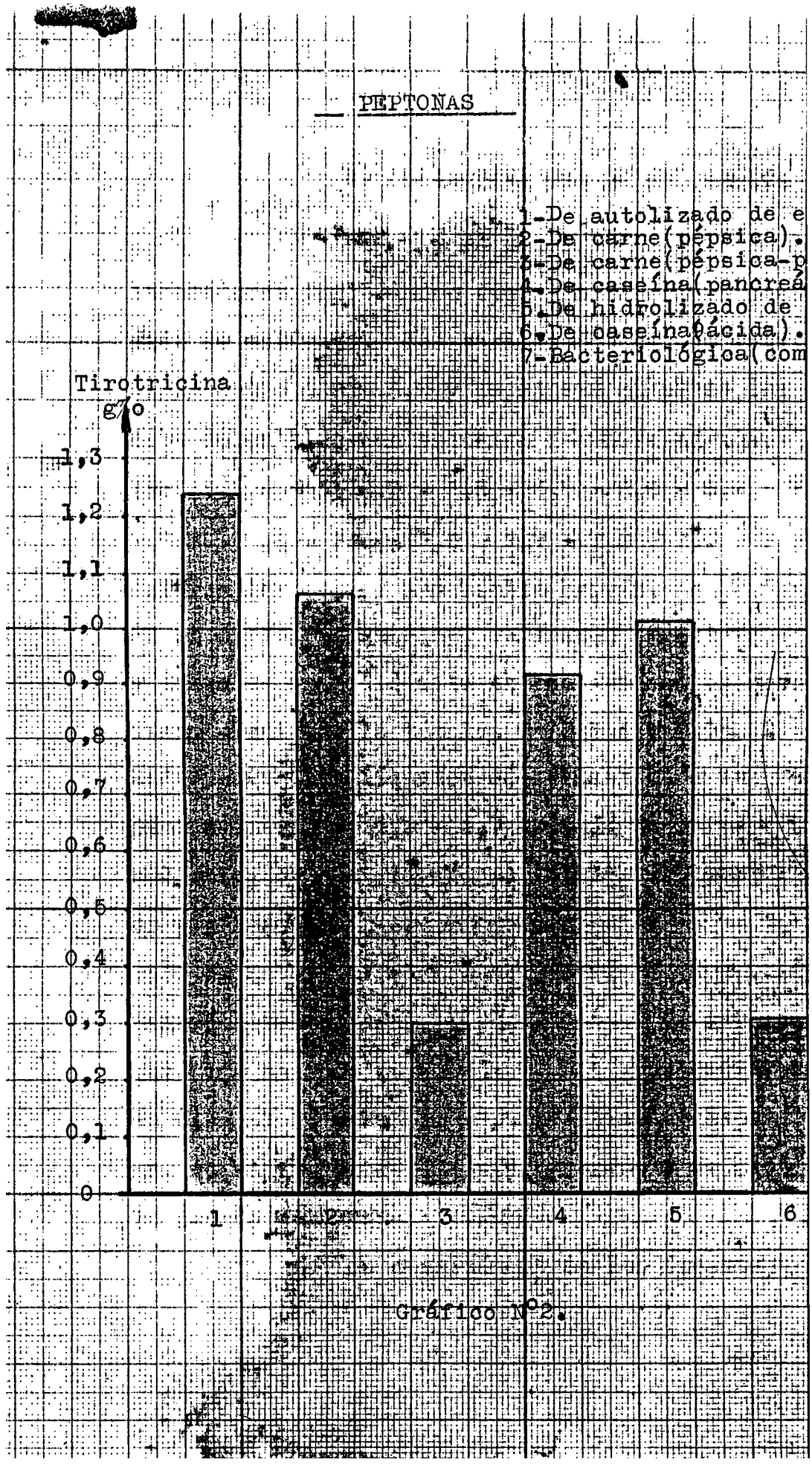


Gráfico Nº2.

b) Influencia del pH del medio.

Se utilizó el medio de cultivo de Lewis y colaboradores (88) y como fuente nitrogenada peptona de autolizado de estómago. Las variaciones del pH estuvieron comprendidas entre 6,2 - 8,2 y se ajustó el pH de los diferentes medios de cultivo con solución de OH.Na al 10%. Los pH fueron los siguientes: 6,2 - 6,5 - 6,7 - 6,8 - 6,9 - 7 - 7,1 - 7,2 - 7,3 - 7,4 - 7,5 - 7,6 - 7,7 - 7,8 - 7,9 - 8 - 8,2. Se inocularon los medios con Bacilo brevis, en la forma descripta en el capítulo anterior, se incubó en estufa a 37ºC, 7 días, y luego se procedió a la extracción del principio antibacteriano siguiendo la técnica de Dubos y Hotchkiss (78). Se acidificaron los líquidos de fermentación con ClH al 10% hasta pH aproximado de 4,5 - 4,7 se dejó 24 horas a la temperatura ambiente, se centrifugó, el líquido sobrenadante fué descartado y al sedimento se le adicionó alcohol de 95º, en proporción de 50 ml por cada litro de medio de cultivo y luego se filtró a través de papel de filtro. El extracto alcohólico obtenido se adicionó, gota a gota y agitando, sobre solución de ClNa al 1% y en estas condiciones precipitó la tirotricina, se filtró sobre filtros pareados y se secó en estufa hasta pesada constante.

Se observó que en los frascos que contenían

medio del cultivo con pH por debajo de 6,9 el crecimiento de los gérmenes no era bueno y la producción del antibiótico era menor de 1 gr%o.

Por el contrario los medios que tenían pH comprendidos entre 6,9 - 7,9 dieron siempre rendimientos del antibiótico superiores a 1 gr%o. Los rendimientos mayores se obtuvieron siempre en los medios de cultivo en los que el pH estaba comprendido entre 7,3 y 7,5. Rendimientos que fueron de 1,240 gr%o. (Gráfico Nº 3).

Lewis y colaboradores (88) estudieron también la influencia que ejercía las variaciones del pH en el rendimiento del antibiótico y llegaron a la conclusión que era más importante la naturaleza químico de los reguladores u-tilizados que el valor del pH. Los mejores rendimientos de tirotricina los obtuvieron cuando el pH del medio era de 7,5.

pH	Rendimiento de tirotricina (gravimetría)
6,2	0,775 gr%o
6,5	0,875 gr%o
6,7	0,950 gr%o
6,8	0,995 gr%o
6,9	1,045 gr%o
7,0	1,100 gr%o

Influencia del pH

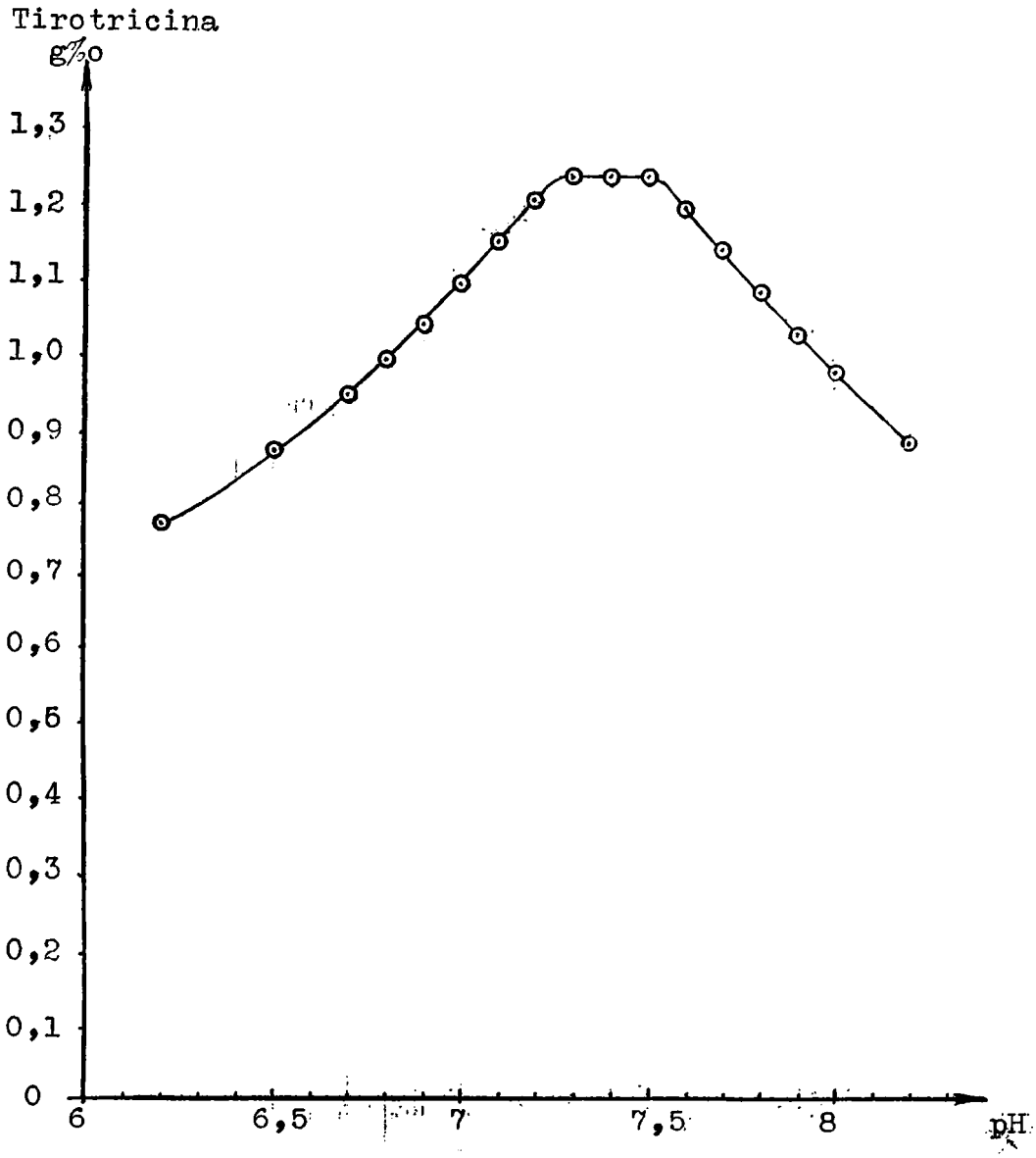


Gráfico Nº3.

pH	Rendimiento de tirotricina (gravimetría)
7,1	1,155 gr%o
7,2	1,210 gr%o
7,3	1,240 gr%o
7,4	1,240 gr%o
7,5	1,240 gr%o
7,6	1,200 gr%o
7,7	1,145 gr%o
7,8	1,090 gr%o
7,9	1,035 gr%o
8,0	0,985 gr%o
8,2	0,890 gr%o

c) Influencia de factores accesorios

Se empleó el medio de cultivo de Lewis pero como fuente nitrogenada peptona de autolizado de estómago y se le adicionó "corn-steep".

El "corn-steep" (138) se obtiene de la siguiente manera. El grano de maíz es embebido en agua y macerado en tanques de madera abiertos, a la temeperatura de 45-52°C durante 40-48 horas, en esta forma los materiales solubles son disueltos; esta disolución es ayuda-da por el SO_2 que antes del proceso de maceración se le añade a los tanques para evitar putrefacciones. Posteriormente el líquido es concentrado hasta más o menos un 50% y este concentrado crudo de licor "corn steep" es el que se usó en el medio de cultivo. Posee numerosos amino-ácidos: alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenil alanina, prolina, treonina, tirosina y valina. Más de un cuarto del N está como alanina. Contiene una cantidad considerable del complejo vitamínico B con excepción de tiamina: riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina y biotina, también inositol, la mitad posiblemente como fitina. Las cenizas contienen numerosos cationes tales como: Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Mo, K, Zn y aniones: S, P.

El licor "corn-steep" tenía un pH de 3,7 - 4,1

El"corn-steep" utilizado reveló:

N total	6,61 gr%
N amínico	0,794 gr%

Se le adicionó al medio de cultivo 10 ml de "corn-steep" por litro de medio. El rendimiento de tirotricina fué igual a la obtenida con el medio conteniendó peptona de autolizado de estómago.

Por el método de Rittenberg :1,248 gr%o gravimétrico: 1,240 gr%o y por el de las diluciones seriadas: 1/ 561 correspondiente a una dilución real de tirotricina de 1: 1.122.000.

2) PRODUCCION POR CULTIVO EN PROFUNDIDAD

Concepto industrial de fermentación

Para considerar una reacción del tipo fermentativo (139) no es condición necesaria que haya liberación de gases. "In vitro" se pueden provocar fermentaciones con extractos de enzimas, libres de células.

Se puede decir que: "Una fermentación, en el vasto sentido en que el término es ahora usado, puede ser definido como un proceso en el cual son producidos cambios químicos en el substracto orgánico, ya sean carbohidratos, proteínas, grasas u otro tipo de materia orgánica, por la acción de catalizadores bioquímicos conocidos como "enzimas" elaboradas por tipos específicos de microorganismos vivos.

a) Planeo del aparato de fermentación:

Los primeros ensayos para obtener tirotricina en medios aereados, agitados sumergidos se realizaron en un aparato de laboratorio y se basaron en la descripción de un trabajo de Stokes (89), quién usaba un medio sintético compuesto de sales minerales, glucosa y como fuente de nitrógeno un ácido-aminado. El fermentador era de vidrio de 10 litros de capacidad. Se colocaba el medio de cultivo, a pH 7, en proporción de 5 litros por carga, la aereación era de 1,5 litros de aire por minuto y se inoculaba con cultivo proveniente de medio superficial de Bacillo brevis. Agitación e incubación a 37°C, 36-60 horas.

El aparato consistía en un frasco de boca ancha, de 10 litros de capacidad, provisto de agitación mecánica a una velocidad aproximada de 60 r.p.m. El aire era enviado desde un compresor por medio de un tubo de goma, en el que se intercalaba un filtro lleno de algodón recubierto de gasa, y luego un tubo de vidrio atravezaba el tapón y penetraba en el frasco que contenía el medio de cultivo hasta llegar al fondo del mismo (Ver figura nº 2). Este frasco se sumergía en un baño maría cerrado, con tapa, cuya temperatura se mantenía entre 35-37ºC.

La composición (91) del medio de cultivo era la siguiente:

Ácido glutámico		5 gr
$(H_2PO_4)_2Ca.H_2O$	sol.acuosa saturada	2 ml
PO_4HK_2		0,5 gr
PO_4H_2K		0,5 gr
$SO_4Mg.7H_2O$		0,2 gr
ClNa		0,01 gr
$SO_4Fe.7H_2O$		0,01 gr
$SO_4Mn.4H_2O$		0,01 gr

Todas las sales disueltas en 700 ml de H_2O

Glucosa	10 gr
H_2O dest. c.s.p	1 litro

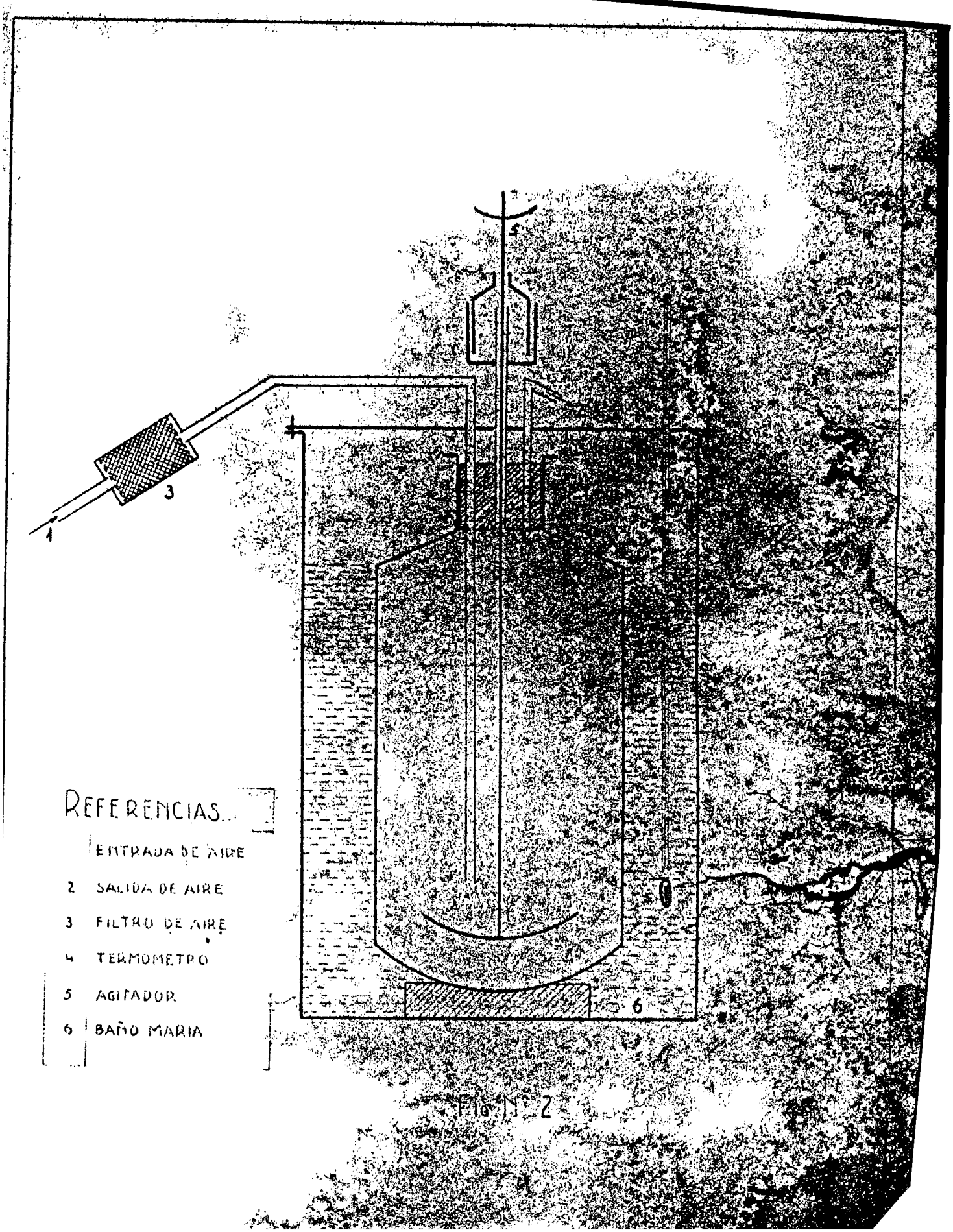

5
3
1
6
REFERENCIAS
1 ENTRADA DE AIRE
2 SALIDA DE AIRE
3 FILTRO DE AIRE
4 TERMOMETRO
5 AGITADOR
6 BAÑO MARIA

Fig. Nº 2

La glucosa se disolvió y esterilizó por separado. El pH del medio salino-nitrogenado, se ajustó a 7. Se esterilizó en autoclave 30' a la temperatura de 120°C, el frasco conteniendo el medio de cultivo y conectado al filtro. Luego se inoculó con medio de cultivo superficial de B.brevis y se incubó a 35-37°C, previa adición de la solución de glucosa estéril, poniendo en marcha el agitador y el compresor. Asepticamente se sacaba muestra del cultivo cada seis horas, a las 60 horas se comprobó la presencia del antibiótico, por el control bacteriológico, dilución 1/11 correspondiente a una dilución real de tirotricina de 1: 22.000, el método de Rittemberg: 0,102 gr% y por gravimetría: 0,100 gr%.

Para producción de tirotricina en mayor escala, se hizo construir un fermentador piloto. Este fermentador tiene una capacidad aproximada de 100 litros y posee características tales que hacen de él un equipo versátil capaz de adaptarse a condiciones muy variadas ya que no se conocían las necesidades reales del problema. Fundamentalmente ofrece las posibilidades de controlar los siguientes factores:

1) Esterilización directa hasta presiones de dos atmósferas de todas sus partes.

2) Variaciones de temperaturas regulables.

3) Variaciones de presión hasta dos atmósferas. Soporta vacío.

4) Agitación mecánica regulable.

5) Entrada de aire esterilizado por filtración, regulable y que permite la agitación del medio de cultivo.

6) Controles de nivel.

7) Permite el agregado de cargas de sólidos y líquidos durante el proceso, tomas de muestras y descargas parciales.

8) Permite la evaporación de las soluciones obtenidas ya sea a presión normal o al vacío.

Posee un sistema (Figura Nº 3) de calefacción de doble fondo (12) cuyos dos puntos A y B comunican por un caño acodado formando un dispositivo (11) de circulación en termosifón, en este doble fondo se coloca agua la que es calentada en el caño de unión por un mechero al que se le regula la llama con el objeto de mantener una temperatura entre 35-37ºC. En el fondo de la cámara del fermentador hay otro dispositivo de calefacción constituído por un serpentín (10) por el que se hace circular vapor de agua a presión desde una caldera y permite una elevación de temperatura suficiente con el objeto de esterilizar todo el aparato y el medio de cultivo y en el caso necesario, evaporar las soluciones obtenidas.

El aire que se envía desde el compresor circula a través de un tubo de goma de paredes resistentes y además entre el fermentador y el tubo se intercala un filtro (3) de forma cilíndrica, desarmable, en el que se puede cargar algodón prensado, terminado en un extremo por un caño con rosca para ser conectado al fermentador y por el otro extremo cerrado con un tapa provista de una unión para conectarlo al tubo de goma.

El fermentador está provisto de dos manómetros

(5) (para la medida de presión y vacío) y un termómetro (6). También posee un motorcito de corriente trifásica que acciona un pequeño agitador (7). En la parte inferior tiene un sistema de descarga (13). En la parte superior posee una tapa con borde que calza sobre la cámara de fermentación haciendo un cierre hermético. La tapa es desmontable y se cierre por medio de tornillos del tipo de los del autoclave de Chamberland. Posee además dos mirillas (2) que pueden servir también para cargar el aparato con materiales sólidos y en la parte central tiene una válvula (1) que se utiliza para practicar la siembra del medio de cultivo. El aparato también posee un nivel (4) provisto de un sistema de extracción aséptica de muestras para el control de la fabricación.

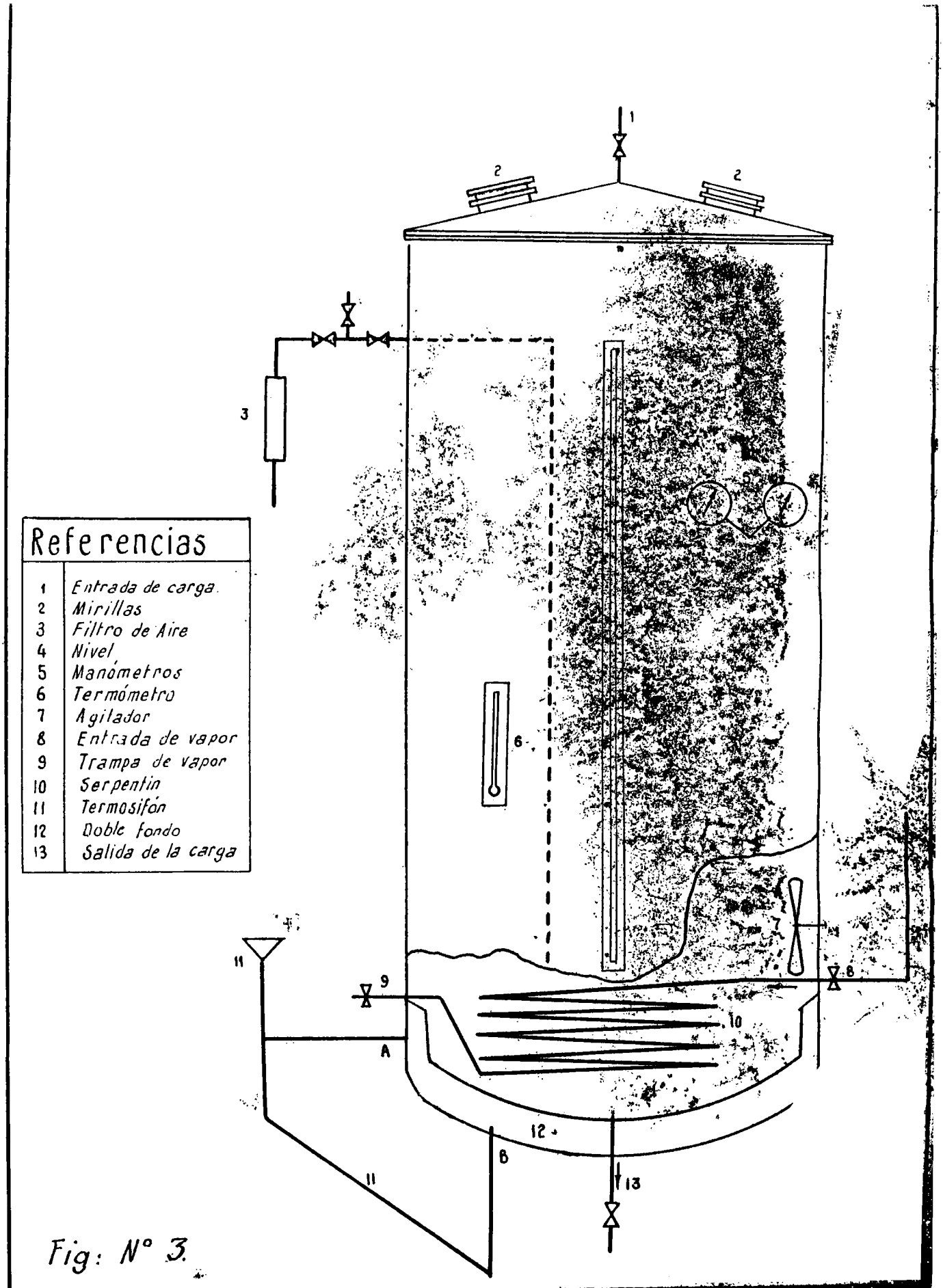
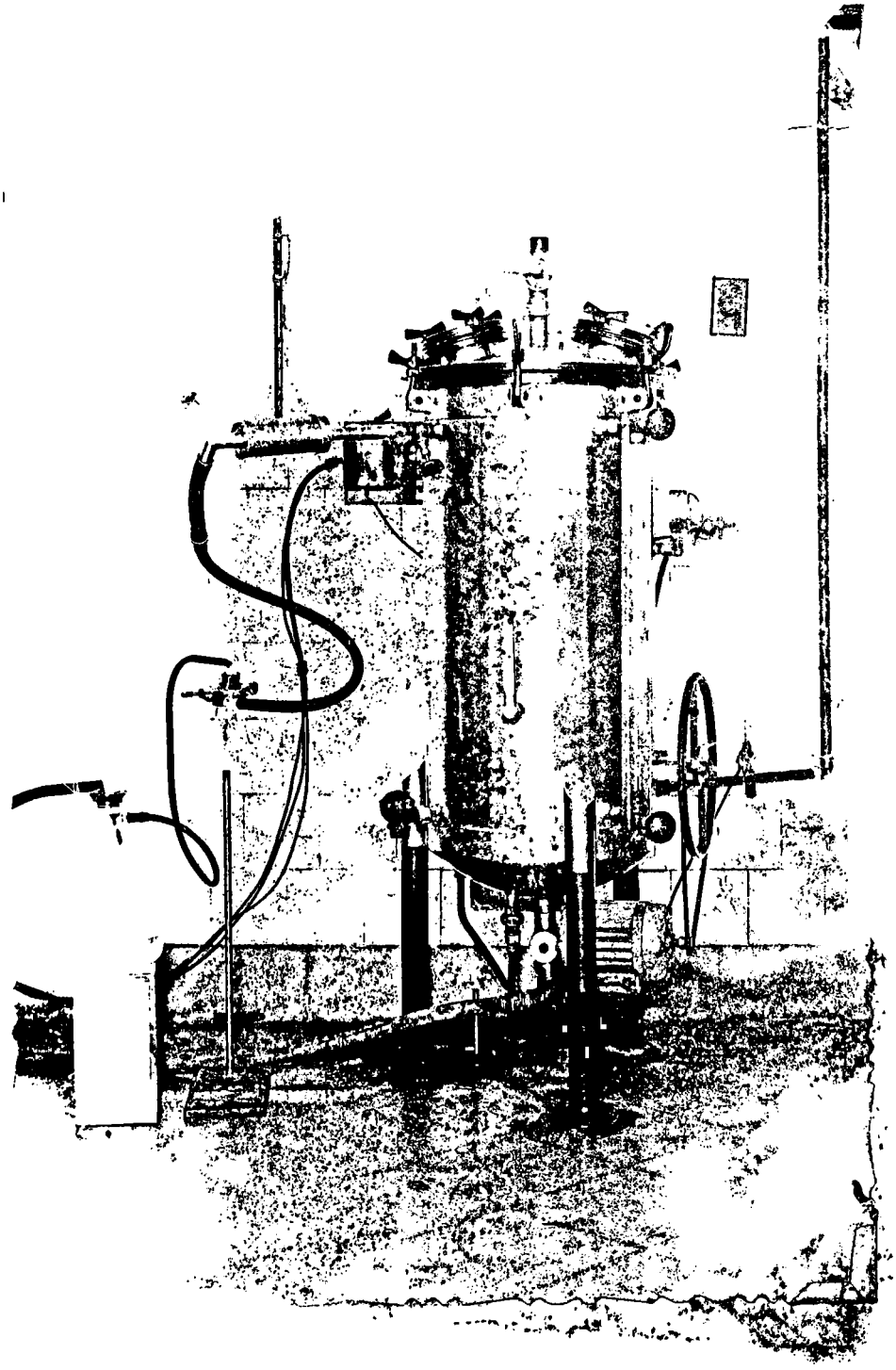

Referencias
1 Entrada de carga
2 Mirillas
3 Filtro de Aire
4 Nivel
5 Manómetros
6 Termómetro
7 Agitador
8 Entrada de vapor
9 Trampa de vapor
10 Serpentin
11 Termosifón
12 Doble fondo
13 Salida de la carga
1
2
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
A
12
B
11
13

Fig: N° 3.



b) Puesta a punto del fermentador

Consideraciones previas

De acuerdo con las experiencias preliminares realizadas y los datos de la literatura, se adoptó como "operación tipo" la descripta por Stokes y Woodward (91) y se trató de reproducir sus resultados de acuerdo con el siguiente plan:

1) Análisis de las operaciones de carga:

La fórmula del medio de cultivo de Stokes es la siguiente:

d-l ácido glutámico	250 gr
PO_4HK_2	25 gr
PO_4H_2K	25 gr
$SO_4Mg.7H_2O$	10 gr
$SO_4Fe.7H_2O$	0,5 gr
$SO_4Mn.4H_2O$	0,5 gr
ClNa	0,5 gr
Soluc.saturada de $(H_2PO_4)_2Ca$	100 ml
H_2O c.s.p	50 litros

El pH se ajustó a 7.

La carga del material se realizó directamente en el fermentador sin tapa y agitando por su dispositivo mecánico, se calentó por el serpentín a vapor manteniendo una

temperatura de aproximadamente 60ºC. En esas condiciones se puede completar la preparación del medio de cultivo en 30 minutos y está listo para esterilizar.

2) Estudio de la esterilización de la carga

La esterilización del fermentador se realizó haciendo pasar vapor de agua a presión por el serpentín y el aparato alcanzó la temperatura máxima de 130ºC.

Se realizaron esterilizaciones del aparato a diferentes temperaturas y determinando el pH antes y después de cada esterilización. También se infectó el medio con un germen esporulado termoresistente : Bacilo subtilis. Se efectuaron tomas de muestra a las siguientes temperaturas y se practicaron con las mismas, siembras sobre agar y caldo simple.

Muestra	Temperat.	pH	agar	Caldo simple
1) antes de esterilizar	20ºC	7	+	+
2) después de infectar con B.subtilis	20ºC	7	+	+
3) " " " " " "	100ºC	7	+	+
4) " " " " " "	105ºC	7	+	+
5) " " " " " "	112ºC	7	+	+
6) " " " " " "	120ºC	5	-	-
7) al enfriarse el aparato	40ºC	6	+	+
8) " " " "	37 ºC	4,3	+	+

El medio de cultivo después de esterilizado se infectaba, se pensó que esa infección se producía al hacer penetrar el aire al aparato y que el filtro era insuficiente para retener los gérmenes aunque dentro del mismo se colocaba algodón bien prensado recubierto de gasa y era esterilizado en estufa a 180°C, 2 1/2 horas, tiempo y temperatura suficiente para esterilizar a calor seco. Por si la invasión de microorganismos extraños se producía por el aire insuflado, antes del filtro se colocaron dos Kitasatos intermediarios, uno contenía agua y otro solución acuosa glicerinada, donde al aire burbujeaba. A pesar de estas precauciones el medio se infectaba después de esterilizado y esto era debido a ciertas pérdidas del cierre del fermentador que fueron paulatinamente localizadas y al ser subsanados estos defectos de construcción el medio permanecía estéril después de haberlo esterilizado a 120°C 1/2 hora y se adoptó esta técnica de esterilización como definitiva.

3) Técnica de inoculación del medio de cultivo

Se realizaron numerosos ensayos para decidir la técnica más adecuada para efectuar la siembra del medio de cultivo del fermentador y adicionar la solución de glucosa estéril, sin producir contaminaciones. Se decidió practicar la inoculación con un medio de cultivo en superficie de Bacilo

brevis, contenido en un frasco de boca ancha, provisto de un tapón de goma con dos tubos acodados formando sifón, en esa forma y previo flameado intenso del caño de entrada del fermentador y del tubo del frasco que contenía el cultivo se practicaba la siembra, adoptando las máximas precauciones de esterilidad. Existen muchas posibilidades de contaminación durante esta etapa pero para evitar posibles accidentes se realizaron las siembras manteniendo el medio de cultivo a 45-50ºC teniendo en cuenta la termorresistencia del Bacilo brevis. El problema mayor en la industria de los antibióticos es evitar la contaminación de los medios, más aún en el caso especial de la tirotricina en que el germen posee grandes exigencias nutritivas y necesita condiciones especiales no para reproducirse, sino para originar el antibiótico.

4) Control de la marcha de la operación tipo.

La composición del medio de cultivo fué la de la fórmula de Stokes (91) modificada en colaboración con Woodward

Ácido glutámico	250 gr
Glucosa	500 gr
PO_4H_2K	25 gr
PO_4HK_2	25 gr
$SO_4Mg.7H_2O$	10 gr
ClNa	0,5 gr
$SO_4Mn.4H_2O$	0,5 gr

$SO_4Fe.7H_2O$	0,5 gr
$(PO_4H_2)_2Ca.H_2O$	100 ml de una solución saturada
H_2O dest. c.s.p	50 litros

El pH se ajustó a 7. El aire insuflado fué de 1,5 litros por minuto, para cada 5 litros de medio. El medio de cultivo, menos la glugosa, se esterilizó a 120ºC 1/2 hora y cuando la temperatura del mismo había descendido a 45-50ºC se efectuó la inoculación con un medio de cultivo superficial de Bacilo brevis de 24 horas de incubación y se adicionó además la solución de glucosa estéril. Se incubó a una temperatura de 35-37ºC, 48 horas. La extracción del antibiótico se realizó por la técnica de Dubos y Hotchkiss (73). Se realizaron cuatro ensayos y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Ensayo Nº	Método Rittenberg	Diluciones seriadas	Concentración real de T	Gravimétrico
1	0.093 gr%	1/11	1 : 22.000	0,092 gr%
2	0.100 "	1/11	1 : 22.000	0.104 "
3	0.096 "	1/11	1 : 22.000	0.099 "
4	0.101 "	1/11	1 22.000	0.103 "

Se obtuvieron rendimientos de tirotricina semejantes a los indicados por Stokes y Woodward, pero como para

la preparación del medio se necesita ácido glutámico, sustancia que desde el punto de vista económico resulta costosa para la obtención en gran escala del antibiótico, se decidió efectuar ensayos variando el tipo de materia nitrogenada. Así en lugar de ácido glutámico se utilizó peptona de autolizado de estómago que en cultivo en superficie había dado los mayores rendimientos de tirotricina.

c) Estudio de la producción de tirotricina con modificaciones del medio.

1) Se preparó el medio de cultivo indicado por Stokes y Woodward (91) pero se reemplazó el ácido glutámico por peptona de autolizado de estómago.

Peptona de autolizado de estómago	500 gr
PO_4H_2K	25 "
PO_4HK_2	25 "
$SO_4Mg.7H_2O$	10 "
$SO_4Fe.7H_2O$	0,5 gr
$SO_4Mn.4H_2O$	0,5 "
Cl Na	0,5 "
$(PO_4H_2)_2Ca.H_2O$ en sol.saturada	100 ml
H_2O destilada c.s.p	50 litros

Se ajustó el pH hasta 7, se esterilizó el medio a 120ºC 1/2 hora y cuando la temperatura del aparato había descendido a 45-50ºC se practicó la siembra con un cultivo en superficie de Bacilo brevis de 24 horas, y además se adicionó la solución de glucosa estéril al 50%. Se puso en movimiento el compresor y el agitador. Se sacaron muestras del medio cada 12 horas y se sembraban sobre agar inclinado y caldo simple y se observó que no habían ocurrido contaminaciones.

El crecimiento del Bacilo brevis en este medio y habiéndose realizado la incubación a 35ºC, era normal pero

no hubo producción del antibiótico. El líquido de fermentación crudo y elaborado según la téonica de Dubos y Hotchkiss (78), no demostraron poder antibiótico por el método de las diluciones seriadas y por la téonica de Rittemberg la reacción del triptofano dió negativa.

2) Como con el medio conteniendo peptona de autolizado de estómago no se obtuvo tirotricina, se pensó que utilizando peptona de gluten que contiene ácido glutámico, en proporción importante, se obtendrían resultados favorables. Se preparó el medio de cultivo de Stokes y Woodward (91) pero en lugar de ácido glutámico se utilizó peptona de gluten que se preparó en la forma siguiente:

Se colocó 1 kilo de gluten en un frasco de vidrio Pyrex se le adicionaron 20 gr de papaína (título 1:160, F.A) más 7 litros de agua destilada y se ajustó el pH hasta 6, se calentó a 70-80°C por espacio de cinco horas, se hirvió para destruir el exceso de fermento, se enfrió en cámara frigorífica. Se concentró al vacío y se desecó por Spray.

Peptona de gluten	750 gr
PO_4HK_2	25 "
PO_4H_2K	25 "
$SO_4Mg.7H_2O$	10 "
$SO_4Mn.4H_2O$	0,5 gr
$SO_4Fe.7H_2O$	0,5 "

ClNa	0,5 gr
$(PO_4H_2)_2Ca.H_2O$ en sol.saturada	100 ml
H_2O destilada c.s.p	50 litros

Se ajustó el PH hasta 7, se esterilizó el medio a 120ºC,1/2 hora, se inoculó con un cultivo de B.brevis y se adicionó la solución estéril de glucosa. Se puso en funcionamiento el compresor y el agitador y la temperatura se mantuvo en 35ºC. Al cabo de 48 horas se observó que el crecimiento del germen era normal pero las pruebas de identificación del antibiótico dieron resultado negativo.

3) Otra modificación del medio fué utilizando peptona de gluten y ácido glutámico en las siguientes proporciones:

Peptona de gluten	600 gr
Acido glutámico	50 "
PO_4HK_2	25 "
PO_4H_2K	25 "
$SO_4Mg.7H_2O$	10 "
$SO_4Fe.7H_2O$	0,5 gr
$SO_4Mn.4H_2O$	0,5 "
ClNa	0,5 "
$(PO_4H_2)_2.H_2O$ sol.saturada	100 ml
H_2O destilada c.s.p	50 litros

Se ajustó el pH hasta 7, se esterilizó a 120ºC 1/2 hora y se operó en la misma forma que en 2). Hubo buen crecimiento del germen, pero los ensayos realizados para revelar tirotricina dieron resultado negativo.

IV

METODOS DE CONTROL DE LA PRODUCCION DE TIROTRICINA

Métodos de control de la producción de Tirotricina

Contrariamente a lo que ocurre con la penicilina en la tirotricina no se habla de unidades sino que se la expresa gravimetricamente, por el método de las diluciones seriadas, eso se debe a algunas características de la misma que la diferencian de la penicilina. Por ejemplo la tirotricina se consigue fácilmente como un producto relativamente puro y en soluciones alcohólicas y dispersiones acuosas es estable.

Sin embargo para medir la cantidad de tirotricina aparte del método gravimétrico, según la técnica de Dubos y Hotchkiss (91) que resulta la más satisfactoria pero es muy laboriosa, en la práctica diaria se emplean para determinar el antibiótico en las varias etapas de la fabricación los siguientes métodos:

a) El poder hemolítico

b) El contenido de triptofano

c) El poder antibacteriano

a) El poder hemolítico:

Dimick (140) describe un método de valoración cuantitativa de la tirotricina en los medios de cultivo basado en las propiedades hemolíticas de la misma.

Con este procedimiento se determinan pequeñas cantidades, alrededor de 100 mgr de tirotricina por litro de medio con una aproximación de 5%.

Para la realización de esta determinación se necesita:

1) Preparar una solución standard de tirotricina en alcohol de 95° 50 mgr de tirotricina se diluyen en un litro de alcohol de 95°. La tirotricina tipo usada fué provista por la casa Merck.

2) Preparación de una suspensión de eritrocitos:

Se necesitan ratas de una cepa Sprague-Dawley, a las que se les extrae sangre por punción del corazón y se la coloca sobre un anticoagulante. Se centrifuga el material para separar los glóbulos rojos, los cuales previo lavado se resuspenden en solución de ClNa al 0,87%, en proporción de 10 veces el volumen original de sangre. Se conserva en la heladera pero debe prepararse cada tres o cuatro días.

3) Las determinaciones se realizan en un colorímetro fotoeléctrico de Klett-Summerson con filtro 660 mμ.

Es necesario determinar la curva de calibración del aparato para cada dilución de hematíes. Se usan

siete diluciones diferentes de la solución standard de tirotricina en alcohol de 95º para así obtener la curva del colorímetro.

La determinación se realiza pesando una cantidad determinada del producto obtenido por el método de Dubos y Hotchkiss y luego disolviendo en una cantidad determinada de alcohol de 95º. Si el ensayo de estimación de tirotricina se quiere hacer en un medio de cultivo, se aspira con pipeta 1 ml del medio, previamente homogeneizado por agitación, se coloca en un tubo de centrífuga cónico, se le adicionan 9 ml de alcohol de 95º, se agita vigorosamente, se centrifuga y luego con este extracto alcohólico se hacen diluciones con alcohol y se efectúan las determinaciones colorimétricas.

Para conocer el número de microgramos de tirotricina por ml de cultivo se multiplica el número de microgramos leídos en la curva de calibración por el factor propio, este último depende de la dilución del extracto alcohólico:

microgramos leídos x factor = tirotricina por ml de cultivo

Con éste método Dimick comprobó que utilizando el método de extracción de Dubos y Hotchkiss (73), el 75% del producto crudo era recuperado.

Este método es satisfactorio, pero para efectuar varias determinaciones de diferentes medios de cultivo, es necesario establecer una curva standard para cada lote de sangre y poseer ratas para que provean la sangre.

b) El contenido de triptofano

Rittenberg, Stenberg y Bywater (141) describen un método para estimar rapidamente tirotricina en medios de cultivo superficiales o aereados sumergidos. Se basa esta técnica en el contenido del amino-ácido triptofano en la tirotricina, el que en contacto con determinados reactivos da reacciones coloreadas.

Procedimiento ensayado:

Muestras pesadas de tirotricina standard fueron disueltas en alcohol (especialmente fué usado alcohol etílico absoluto) para dar soluciones de la concentración deseada y con las mismas se determina la curva del colorímetro. Las soluciones alcohólicas son estables y pueden ser mantenidas indefinidamente. El color es desarrollado por añadido de 0,5 ml de p-dimetil amino benzaldehido al 5% en ClH concentrado (preparado diariamente) y 0,5 ml de alcohol en 5 ml de ClH concentrado. Esto es seguido por añadido de 1 ml de sol.alcohólica de tirotricina obtenida de un medio de cultivo. Si la tirotricina está presente, desarro-

lla enseguida una coloración rosada. Se deja cinco minutos en reposo y luego se le adiciona 1 gota de una solución acuosa de NO_2Na al 0,2% y un color azul aparece en pocos segundos. La densidad de color se lee después de 15 minutos en un electrofotómetro de Fisher, Modelo A.C., filtro 650 m μ. Un tubo conteniendo 1,5 ml de alcohol, 5 ml de ClH concentrado, 0,5 ml de p-dimetilaminobenzaldehido en sol.al 5% y 1 gota de solución de NO_2Na al 0,2% es usado como blanco.

Para comprobar si hay tirotricina en un medio de cultivo y valorarla se procede en la siguiente forma:

En un tubo de centrífuga se miden 5-10 ml de la muestra, se ajusta el pH 4 - 4,5, por adición de una cantidad predeterminada de ClH.se centrifuga, el líquido sobrenadante es descartado y al sedimento se le añaden 5 ml de alcohol, el sedimento es así resuspendido, el tubo es agitado 10 minutos y luego dejado en reposo 20 minutos y recentrifugado.1 ml del líquido claro sobrenadante es usado para efectuar la reacción coloreada. Esta cantidad es equivalente a 1 ó 2 ml del líquido de fermentación, dependiendo de la proporción de la muestra inicial. El orden puede ser aumentado si es necesario por variaciones de la muestra inicial o del volumen de alcohol usado para la extracción. Generalmen

te 1 ml de una solución conteniendo 200 γ del standard es comparada con cada serie desconocida. La cantidad de tirotricina en la muestra desconocida es calculada con la curva trazada para el electrofotómetro de Fisher que se usó en las determinaciones de esta investigación.

Con este método se pueden determinar hasta valores de 25 γ por ml con una aproximación de 5%. Tiene la ventaja de que trabajando en serie pueden realizarse de 40-50 determinaciones en 4 horas.

El método no es específico para tirotricina y se abren como mínimo dos series de críticas:

a) La proporción de gramicidina y tirocidina está sujeta a los cambios de las condiciones de fermentación o a las diferentes cepas de organismos, pero los resultados obtenidos por Rittenberg y Dimick indican que tal variación no ocurrió en el transcurso de las variaciones ensayadas.

b) También es posible que sustancias no antibióticas conteniendo triptofano soluble en alcohol e insoluble en agua puede estar en los distintos cultivos, dando de este modos resultados altos. Solo el 80% de la tirotricina determinada por el método descripto es también semejante a la aislada por Dimick y determinada por el método hemolítico.

g) Método bacteriológico

Para controlar tirotricina se usa también el método bacteriológico (91) de las diluciones seriadas, colocando concentraciones diferentes del antibiótico en contacto con gérmenes testigos. La tirotricina de un medio de cultivo puede estimarse cualitativamente, centrifugando una porción del mismo, 1 ml del líquido sobrenadante es añadido a igual volumen de un cultivo de más o menos 5 horas, de Micrococus conglomeratus (cepa M.Y), en caldo, e incubado 2 horas a 37ºC, la presencia de la sustancia antibacterial será revelada por lisis del cultivo. Este ensayo es sencillo y seguro y se adaptó para determinaciones cuantitativas, no solo utilizando tirotricina aislada por la técnica de Dubos y Hotchkiss, con ligeras modificaciones o para valorar tirotricina directamente de un medio de cultivo, procediendo en la siguiente forma. Una cantidad determinada del cultivo es centrifugada y resuspendida en alcohol etílico en igual proporción que el volumen del alicuota usado. Dejar reposar 24 horas a temperatura ambiente y luego este extracto alcohólico es diluído con agua y se hacen diluciones seriadas, la mínima cantidad necesaria para producir lisis del germen testigo indicará la actividad del antibiótico. Generalmente 4 γ de tirotricina son suficientes para provocar lisis del microorganismo. Pueden ser usados otros microorganismos testigos

como el Lactobacillus casei, estafilococo aureus, etc,

Para valorar Tirotricina en preparaciones farmacéuticas del tipo emulsión o ungüento Reedy y Wolfson (142) describen una técnica de extracción del antibiótico con alcohol y propilen-glicol, luego preparan diluciones con alcohol etílico y siguen la técnica de las diluciones seriadas, empleando como germen testigo: Streptococcus fecalis (M-19).

El método de las diluciones seriadas da valores aproximados de la concentración de tirotricina, tanto en líquidos de fermentación como una vez elaborada la tirotricina y realizando la determinación bacteriológica con la solución alcohólica de tirotricina.

Método adoptado:

Se realizaron estudios sistemáticos para llegar a un método que dió resultados satisfactorios en lo que se refiere a la uniformidad del método y a la rapidez. Es una técnica de diluciones seriadas y sirve para medir el antibiótico en medios de cultivo, la droga elaborada en formas farmacéuticas variadas.

Técnica:

Se utilizan 12 tubos conteniendo cada uno 5 ml. de caldo simple a pH : 7.

Como germen testigo, Stafilococcus aureus Oxpa (209), cultivo de 6 horas en caldo simple y posteriormen

te diluído 1/10.

Como control se emplea una solución alcohólica de tirotricina al 2% de la que en el momento de la titulación se hace una dilución 1/40.

Tubo	Cantidad de la solución a medir	Corresponde a una dilución	Dilución real de tirotricina
1	0,5 ml. del material a medir	1: 11	1:22.000
2	0,5 ml. del tubo Nº1	1:121	1:242.000
3	0,3 " " " "	1:194	1:388.000
4	0,2 " " " "	1:286	1:572.000
5	0,1 " " " "	1:561	1:1.122.000
6	1 " " " Nº2	1:726	1:1.452.000
7	0,5 " " " "	1:1331	1:2.662.000
8	0,3 " " " "	1:2137	1:4.274.000
9	0,2 " " " "	1:3146	1:6.292.000
10	0,1 " " " "	1:6171	1:12.342.000
11	0,05" " " "	1:12.221	1.24.442.000
12	5 ml. caldo simple (control).		

Se agrega a cada tubo 0,1 ml. del cultivo de Stafilococcus aureus, diluído 1/10.

Se colocan los tubos en estufa a 37º C. y se hacen lecturas periódicas, a las 6, 12 y 24 horas y se da como poder bacteriostático de la tirotricina la máxima dilución en el tubo que no se observa crecimiento del germen.

Al medir líquidos de fermentación es necesario calentar previamente el material para destruir las formas vegetativas y evitar el desarrollo del Bacilo brevis que molestaría en la lectura. Se coloca el material en un B.M a la temperatura de 80°C durante 5 minutos, con este simple variante se evita tener crecimiento del germen en 24 horas.

V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se planeó este trabajo con el objeto de contribuir al mejor conocimiento y posibilidades de industrialización de la tirotricina con materias primas del país.

Se estudió la biología del Bacilo brevis, observando la influencia de varios factores: pH, temperatura, mutaciones, sobre su capacidad de producir tirotricina.

Los ensayos desarrollados por cultivo en superficie del Bacilo brevis han proporcionado resultados positivos pues se obtuvieron buenos rendimientos de tirotricina con caldo de cultivo preparado en base de materias primas cuya forma de obtención se detalla.

Los ensayos realizados por cultivo en profundidad (método aereado sumergido) han permitido reproducir experiencias relatada en la literatura pero no se han podido reemplazar los medios nutritivos reconocidos por otros más económicos, pues a pesar de obtener buenos desarrollos del germen no se consiguió aislar tirotricina en cantidades apreciables. Se detallan variaciones en el método fundamental que no condujeron a mejoras en el rendimiento.

La producción de tirotricina obtenida en cada u

[illegible]

13-10-2009

no de los casos fué controlada por métodos químico y biológico cuya técnica se describe.

VI

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Waksman, S.A. - "Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances" 2nd.Ed The Commonwealth Fund.New York (1947) 36.
2. Cornil, A.B. y Babes, V. - J.conn.méd.prat.Paris (1885) 7:321.
3. Gerré, C. - Centralbl.f.Bakteriol.(1887)2:312.
4. Delbrück, M. - Advances in Enzimology. (1942)2:1.
5. Delbrück, M., Luria, S.E., Anderson, T.F. - J.Bact. (1943) 46:57.
6. Kolmer, J.A. - "Penicillin Therapy, Including tyrothricin and other antibiotic therapy". D.Appleton-Century Co.Inc., New York (1945),7.
7. Waksman, S.A., Horning, E.S., Welsch, M y Woodruff, H. B. - Soil.Sc. (1942) 54:281.
8. Herrell, W.E. - "Penicillin and other antibiotic agents" Saunders, W.B Company.Philadelphia and London (1946),269
9. Waksman, S.A. - "Les Antibiotiques" Medicine et Biologie", Masson, Cie.París, (1947) 11.
10. Filho, R.A. - Rev.Brasil.farm. (1946) 27:336.
11. Bouchard, Ch. - Comp.rend.Acad.Sci.,París (1889) 108:713.
12. Emmerich, R. y Löw, O. - Ztschr.Hyg.Infektkr. (1899)31:1.
13. Alsberg, C.L., Black, O.F. - U.S.D.A.,Bur.of Plant Indus

try,Bull.270.(1913).

14. Oxford, A.E., Raistrick, H. y Smith, G. - Chem.Ind. (1942)61:22.

15. Wrede, F. y Strack, E. - Ztschr.f.physiol.Chem. (1924) 140:1.

16. Gratia, A. y Dath, S. - Comp.rend.Soc.Biol.(1924),91: 1442.

Comp.rend.Soc.Biol.(1925),92: 1125.

Comp.rend.Soc.Biol.(1925),93: 451.

Comp.rend.Soc.Biol.(1926),94: 1207.

17. Florey, H.W., Chain, E., Heatley, N.G., Jennigs, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. y Florey, M.E. - "Antibiotics". Ed.Geoffrey Cumberlege, London.(1949) 1:320.

18. Fleming, A. - Brit.J.exp.Path. (1929) 10: 226.

19. Hetherington, A.C y Raistrick, H. - Philos.Trans.B.(1931) 220:269.

20. Weindling, R. y Emerson, O.H. - Phytopathology (1936) 26: 1068.

21. Anslow, W.K. y Raistrick, H. - Biochem.J.(1938) 32: 687.

22. Dubos, R.J. - J.exp.Med. (1939) 70:1.

23. Waksman, S.A. y Woodruff, H.B. - J.Bact. (1941)42:231.

24. Waksman, S.A. y Woodruff, H.B. - Proc.Soc.exp.Biol.,N.Y. (1942) 49:207.

25. Chain, E., Florey, H.W. y Jennings, M.A. - Brit.J.Exp. Path.(1942), 23:202.

26. White, E.C. y Hill, J.H. - J.Bact. (1943) 45:433.

27. Bush, M.T. y Goth, A. - J.Pharmacol.Exp.Therap.(1943) 78: 164.

28. Chain, E., Florey, H.W., Jennings, M.A. y Williams, T.I.- Brit.J.exp.Path.(1943)24:108.

29. Philpot, F.J. - Nature, Lond. (1943) 152:726.

30. Schatz, A., Bugie, E. y Waksman, S.A. - Proc.Soc.exp.Biol. N.Y. (1944) 55:66.

31. Waksman, S.A. y Schatz, A. - J.Amer.pharm.Ass.(Sci.Ed) (1945) 34:273.

32. Silcox, H. - Chem.Engineer.News.(1946)24:2762.

33. Porter, R.W. - Chem.Metallurg.Engineer.(1946)50:142.

34. Mac Kee, C.M., Rake, G. y Houck, C.L. - J.Bact.(1944)47: 187.

35. Jansen, E.F. y Hirschmann, D.J.-Arch.Biochem.(1944)4:297

36. Gause, G.F y Brazhnikova, M.G. - Lancet.(1944) 247:715.

37. Gause, G.F. - Lancet.(1946)251:46.

38. Johnson, B.A., Anker, H. y Meleney, .L. - Science (1945) 102:376.

39. Carter, H.E., Gottlieb, D. y Anderson, H.W. - Science (1948)107:113.

40. Bartz, Q.R. - J.Biol.Chem. (1948)172:445.

41. Rebstock, M.C., Crooks, H.M.Jr.,Controulis,J. y Bartz, Q. R. - J.Am.Chem.Soc.(1949)71:2458.

42. Bryer, M.S., Schoenbach, E.B., Chandler, C.A., Bliss, E. A. y Long, P.H. - J.Amer.Med.Ass.(1948)138:117.

43. Anónimo - J.Amer.Pharm.Ass.(Ed.Pract.Pharmacy)(1949)Vol. 10/3 168-169 y 180-181.

44. Waksmann, S.A. y Lechevalier, H.A. - Science (1949)109:305

45. Waksmann, S.A., Swart, E.A. y Hutchison, D. - Arch.Biochem.(1949)22:16.

46. Fleming, A. - Proc.Roy.Soc.(London),s.B.(1922)93:306.

47. Cavallito, CH.J y Bailey, J.H. - J.Am.Chem.Soc.(1944)66 1950.

48. Florey, H. - J.A.M.A. (1947)135:1047.

49. Waksman, S.A. - Microbial Antagonims and Antibiotic Substances" 2nd.Ed.The Commonwealth Fund.New York (1947) 108.

50. Waksman, S.A. - J.Bact.(1943)45:64.

51. Wrede, F. y Strack, E. - Ber.dtsch.Chem.Ges.(1929) 62 B: 2061.

52. Kuhn, R y Schön, K. - Ber.dtsch.Chem.Ges.(1935)68:1537.

53. Birkinshaw, J.A., Oxford, A.E. y Raistrick, H. - Biochem. J.(1936)30:394.

54. Raphael, R.A. - Nature,(1947)160:261.

55. Raphael, R.A. - J.Chem.Soc.(1947),805.

56. Fleming, A. - "Penicillins-Its Practical Application". Butterworth y Co,Ltd,London (1946) 27.

57. Johnson, J.R., Bruce, W.F y Dutcher, J.D. - J.Am.Chem. Soc.(1943)65:2005.

58. Johnson, J.R., Bruce, W.F y Dutcher, J.D. - J.Am.Chem. Soc.(1945)67:1736.

59. Raistrick, H. y Baker, W. - J.Chem.Soc.(1941) II:670.

60. Birkinshaw, J.H., Michael, S.E., Bracken, A. y Raistrick H. - Lancet.(1943) 245:625.

61. Dutcher, J.D. - J.Biol.Chem. (1947)171:321.

62. Kuehl, F.A., Peck, R.L., Hoffhine, Ch.E., Peel, E.W. y Folkers, K. - J.Am.Chem.Soc.(1947)69:1234.

63. Cavallito, Ch.S., Buck, J.S. y Suter, C.M. - J.Am.Chem. Soc.(1944)66:1952.

64. Robinson, H.J. y Graessle, O.E. - J.Pharmacol.(1942) 76:316.

65. Strauss, E. - Proc.Soc.exp.Biol.,N.Y.(1947)64:97.

66. Curran, H.R. y Evans, F.R. - Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. (1947) 64:231.

67. Emmerich, R. y Saida.-Zbl.Bakt., 1 Abt.Orig.(1900)27:776.

68. Gardner, A.D. - Lancet.(1946) 248:668.

69. Abraham, E.P., Callow, D. y Gilliver, K. - Nature (1946)

70. Klein, M. y Kalter, S.S. - J.Bact. (1946) 51:95.

71. Abraham, E.P. - Biochem.J.(1945)39:398.

72. Stanley, N.F. y Mills, J.A. - Aust.J.Exp.Biol.,med.Sci. (1946)24:133.

73. Waksman, S.A., Spencer, E.L. y Horning, E.S. - J.Bact. (1943)46:233.

74. Bergel, F., Morrison, A.L., Moss, A.R., Klein, R., Rinderknecht, H. y Ward, J.L. - Nature (1943)152:750.

75. Atkinson, N.- Aust.J.exp.Biol.med.Sci.(1942)20:287.

76. Raistrick, H., Birkinshaw, J.H., Braken, A., Michael, S.E., Gye, W.E., Hopkins, W.A. y Greenwood, M. - Lancet (1943) 245:625.

77. Florey, H.W., Chain, E., Heatley, NG., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. y Florey, M.E. - "Antibiotics" Ed.Geoffrey Cumberlege, London.(1949) 1:233.

78. Dubos, R.J. y Hotchkiss, R.D. - J.Exp.Med.(1941)73:629.

79. Duclaux, E. - Le lait, Bailliere, Paris (1887):213.

80. Nicolle, M. - Ann.Inst.Pasteur.(1907)21:613.

81. Pringsheim, E.G. - Centralbl.f.Bakteriol.(1920)51:72.

82. Much, H. y Sartorius, F. - Med.Klin.(1924)20:347.

83. Rosenthal, L. - Comp.Rend.Soc.Biol. (1925)92:77.
Comp.Rend.Soc.Biol. (1925)92:1568.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.(1941)46:448.

Rosenthal, L. e Illitch, Z. - Comp.Rend.Soc.Biol.(1926) 95:10.

84. Hoogerheide, J.C. - Botan.Rev.(1944)10:559.

85. Breed, R.S., Murray, E.G.D. y Hitchens, A.P. - "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Sixt. Ed., Baltimore (1948).

86) Dubos, R.J. y Hotchkiss, R.D. 9 J.Biol.Chem.(1940)132:791

87. Hotchkiss, R.D. y Dubos, R.J. - J.Biol.Chem.(1940)136:803

88. Lewis, J.C., Dimick, K.P. y Feustel, I.C. - Industr.Engng. Chem.(1945)37:996.

89. Stokes, J.L. - Bacterial Processes, U.S.:2,406.174. Chem. Abst.(1946)40:6563^{4}.

90. Stokes, J.L. y Woodward, C.R. - J.Bact.(1943)15:29.

91. Stokes, J.L. y Woodward, C.R. - J.Bact.(1943)46:83.

92. Appleby, J.C., Knowles, E., McAllister, R.C.A., Pearson, J. y White, T. - J.Gen.Microbiol.,(1947)1:145.c/Chem. Abst.(1947)41:6370^{h}.

93. Dubos, R.J. y Cattaneo, C. - J.Exp.Med.(1939)70,:249.

94. Dubos, R.J. y Hotchkiss, R.D. - J.Biol.Chem.(1941)141:

95. Dubos, R.J. - J.Pediatrics.(1941)19:588.

96. Tishler, M., Stokes, J.L., Trenner, N.R. y Conn, J.B. - J.Biol.Chem.(1941)141:197.

97. Hotchkiss, R.D. - Advances in Enzymology(1944)4:153.

98. Gordon, A.H., Martin, A.J.P y Synge, R.L.M. - Biochem. J(1943)37:86.

99. Hotchkiss, R.D. - J.Biol.Chem.(1941)141:171.

100. Christensen, H.N., Edwards, R.R. y Pierema, H.D. - J. Biol.Chem.(1941)141:187.

101. Synge, R.L.M. - Biochem.J.(1945)39:351.

102. Lipmann, F., Hotchkiss, R.D. y Dubos, R.J. - J.Biol.Chem. (1941)141:163.

103: Gordon, A.H. - Biochem.J.(1943)37:79.

104: Synge, R.L.M. - Biochem.J.(1945)39:355.

105. Gregory, J.D. y Craig, L.C. - J.Biol.Chem.(1948)172:839.

106. Consden, R., Gordon, A.H. y Martin, A.J.P. - Biochem.J. (1944)38:224.

107. Gordon, A.H., Martin, A.J.P. y Synge, R.L.M. - Biochem.J. (1943)37:313.

108. Christensen, H.N., Uzman, L. y Hegsted, D.M. - J.Biol. Chem.(1945)158:279.

109. Dubos, R.J., Hotchkiss, R.D. y Coburn, A.F. - J.Biol. Chem.(1942)146:421.

110. Heilman, D. y Herrell, W.E. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (1941)47:480.

111. Herrell, W.E. y Heilman, D. - Am.J.Med.Sci.(1943)206:221.

112. Blinnikova, E.I. - Biokhimiya (1945)10:151. c/C.A.(1945) 39:4360[6].

113. Macheboeuf, M. Bull.Soc.Chim.Biol.(1948)30:161.

114. Dubos, R.J. - J.Exp.Med.(1939)70:11.

115. Herrell, W.E. y Heilman, D. - J.Clin.Inv.(1941)20:583.

116. Rammelkamp, Ch.H. y Weinstein, L. - Proc.Soc.Exptl. Biol.Med.(1941)48:211.

117: Henle, G. y Zittle, Ch.A. - Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. (1941)47:193.

118. Lewis, J.C., Dimick, K.P., Feustel, I.C., Fevold, H.L., Olcott, H.S. y Fraenkel-Conrat, H. - Science (1945)102: 274.

119. Fraenkel-Conrat, H., Lewis, J.C., Dimick, K.P., Edwards, B., Reitz, H.C., Ferrel, R.E., Brandon, B.A. y Olcott, H.S. - Proc.Soc.Exp.Biol.,N.Y.(1946)63:302.

120. Skadhauge, K. - Physiol.Biochem.Pharmacol., Sec .II (1950)3,243.

121. Reilly, J. - Cátedra y Clínica (1948) Nº 141:111.

122. Mondolfo, H. y Hounie, E.-"Farmalecta" Ed.Instituto Massone S.A., Bs.As.(Rep.Argentina)(1946)Año 1,Nº8,235.

123. Dubos, R.J. - Ann.Int.Med.(1940)13:2025.

124. Rammelkamp, Ch.H. y Weinstein, L. - J.Infect.Dis.(194 71:166.

125. Wright, V.W.M. - J.Franklin Inst.(1942)233,188.

126. Rammelkamp, Ch.H. y Weinstein, L. - Proc.Soc.Exptl.Biol. Med.(1941)48:147.

127. Silbergleit, A.H. - J.Am.Pharm.Assoc.(1944)5:232.

128. Anónimo - "Notas Terapéuticas". Parke,Davis y Cía, Detroit,Mich.E.U.A.(1946)38:67.

129. Rapallini, S.D.A. - De "La Prensa Médica Argentina", (1948)35:1.,Ed.Instituto Massone.S.A.Bs.As.(1949).

130. Reillyy, J. - Presse Med.(1948)56:107.

131. Anónimo. "Terapéutica Antibiótica con Tirotricina". Pub. Dep.Científico del Instituto Massone S.A. Bs.As.(1949).

132. Verna, L.G. - "Técnicas Generales y Experimentación Bacteriológica" ed."El Ateneo"Bs.As.(1945)1:255.

133. Goris, A. y Liot, A. - Pharmacie Galenique, ed.Masson et Cie, París.2da.Ed.(1942)2:1282.

134. Farmacopea Argentina, 3ra.Ed.(1943).

135. Goodman, L. y Gilman, A. - Bases Farmacológicas de la Terapéutica.(UTEHA),Mexico.(1945)2:1249.

136. Hankes, L.V., Riesen, W.H., Henderson, L.M. y Elvehjem, C.A.-J.Biol.Chem.(1948)176:467.

137. Lugones, S. - "Desecación por el sistema de dispersión (Spray")(folleto, publicación personal) (1948)

138. Liggett, W.R. y Koffler, H. - Bact.Rev.(1948) 12:297.

139. Prescott, S.C. y Dunn, G.C. - "Industrial Microbiology" 1ra.Ed.Mc Graw Hill Book Company, Inc N.Y. and London (1940) 6.

140. Dimick, K.P. - J.Biol.Chem.(1943)149:387.

141. Rittenberg, S.C., Stenberg, H.E. y Bywater, W.G. - J. Biol.Chem.(1947)168:183.

142. Reedy, R.J. y Wolfson, S.W. - J.Amer.Pharm.Assoc.(1950) 39:1.