

REAL ACADEMIA DE FARMACIA

DISCURSO

LEIDO POR EL

EXCMO. SR. D. JOSÉ MARÍA FERNÁNDEZ-LADREDA
Y MENÉNDEZ-VALDÉS

EN LA SOLEMNE SESIÓN CELEBRADA EL DÍA
27 DE NOVIEMBRE DE 1947, PARA TOMAR POSESIÓN
DE UNA PLAZA DE ACADÉMICO DE NÚMERO

Y

CONTESTACION

EN NOMBRE DE LA ACADEMIA

POR EL

EXCMO. SR. D. LUIS BLAS Y ÁLVAREZ
ACADÉMICO DE NÚMERO



M A D R I D
M C M X L V I I

DISCURSO

LEÍDO POR EL

Excmo. Sr. Dr. D. JOSÉ MARIA FERNÁNDEZ-LADREDA Y
MENÉNDEZ-VALDÉS

TEMA

LOS ANTIBIÓTICOS - PENICILINA

SEÑORES ACADÉMICOS, SEÑORAS Y SEÑORES:

LA Real Academia de Farmacia me ha abrumado con el honor de concederme un puesto de académico de número, y con ello me proporciona la satisfacción de poder servir a mi Patria en aquel sector a que preferentemente me llama mi vocación, y creo que mis aptitudes, tomando parte en la labor cultural y el desarrollo de la ciencia en España, pilares fundamentales de su progreso y de su engrandecimiento.

Bien me hago cargo que ni mi preparación, ni mi saber, han de permitirme, a pesar de mi buena voluntad, aportar algo estimable a la obra magnífica, plena de realidades, que esta Real Academia, en la que figuran los mayores prestigios de la profesión farmacéutica, viene llevando a cabo, para honra suya y gloria de la nación que tiene la fortuna de contarlos entre sus hijos beneméritos. No han de faltarme, sin embargo -yo así lo espero-, entusiasmo ni deseos de trabajar para, dentro de mi modestia, ayudaros y, ya que no pueda formar parte del cimiento que sostiene la obra, sea al menos una de esas piedras pequeñas que no son tan indispensables, pero que, no obstante, prestan un servicio útil para la consolidación del edificio.

No vengo aquí, afortunadamente, a reemplazar a nadie que la muerte haya arrebatado a la Academia, circunstancia siempre dolorosa y triste, sino porque, con una visión clara de la enorme importancia y del papel fundamental que la Farmacia tiene en la actualidad, y que aumentarán, ciertamente, al correr de los años, a propuesta del excelentísimo señor ministro de Educación Nacional, cuya preocupación por los grandes avances de la cultura y de la investigación científica nadie puede poner en duda, el Gobierno ha concedido a esta Academia

la categoría que le correspondía, asimilándola a las demás integradas en el Instituto de España y dando entrada en la misma a cultivadores de ciencias afines a la Farmacia. Y uno de éstos -el último, desde luego- soy yo, dedicado modestamente a explicar en la Facultad de Ciencias de esta Universidad de Madrid la asignatura de Química Industrial del Doctorado, a la que tengo tal cariño que no he querido abandonar su explicación cuando la bondad del Caudillo me llevó a las tareas del Gobierno. Por vuestra benevolencia y la circunstancia que acabo de citar, estoy, sin duda, yo aquí, un tanto avergonzado de sentarme a vuestro lado, como el pobre suele estarlo al lado de los nobles y los ricos, aun cuando éstos le prodiguen, como vosotros me prodigáis a mí, afectos y atenciones, que es precisamente lo que distingue la nobleza auténtica y el saber verdadero.

Escogí un tema sobre los "antibióticos" porque, aparte la importancia de su estudio químico y de su fabricación industrial en España, es quizá en el que más aparecen siempre unidos y más se precisa la colaboración del farmacéutico con el químico, y dentro de ellos me fijé en la penicilina porque en España se conoce poco de ella, en el aspecto de su preparación y de su estructura y propiedades. No sería posible tratar con alguna extensión este tema sin tener presentes los magníficos trabajos del doctor BUSTINZA, gloria verdadera de la Farmacia y de la Universidad españolas, y al que yo he seguido constantemente a lo largo de este discurso. Las dificultades con que he tenido que luchar, a causa de mi cargo oficial, para preparar el tema, con el fin de no retrasar mi colaboración activa con vosotros, y la escasa bibliografía existente en España sobre la penicilina, me hacen temer que defraude vuestras esperanzas, pues hay en él muy poco de original y mucho de recopilación de trabajos extranjeros, especialmente de Inglaterra y Norteamérica, países en los que más se ha estudiado el asunto en sus diferentes aspectos.

Confío, sin embargo, en que él podrá prestar alguna utilidad a los jóvenes que se decidan a investigar sobre la materia, especialmente desde el punto de vista de su fabricación industrial y de las posibilidades de mejora o descubrimiento de sustancias nuevas, y de todos modos no olvido que vuestra benevolencia es mucha y mi voluntad muy grande, y que por ello sabréis perdonarme y con vuestros consejos orientarme en la labor futura que a vuestro lado me propongo realizar.

Y sin molestaros más, entro en el tema.

Progreso de la Farmacia

Una parte numerosa de los medicamentos corrientemente utilizados en la actualidad fueron conocidos en las Edades Media y Antigua. En la moderna era científica los trabajos de muchos investigadores permitieron descubrir los principios activos de medicamentos vegetales que anteriormente sólo se empleaban en el estado crudo o como extractos. Estos principios activos, convenientemente purificados, tienen sobre los medicamentos naturales la ventaja de su composición constante y de su acción fisiológica invariable, y, al poder ser administrados por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, aseguran una rapidez mayor de acción y una mayor seguridad en la absorción. El jugo concentrado de las cápsulas de diferentes adormideras, conocido como opio, desde los tiempos más antiguos encontró enorme difusión como narcótico, mencionándose su empleo en documentos asirios y egipcios, pero hasta el año 1816, en que Sertürner consiguió aislar su principal principio activo, el alcaloide morfina, no se logró la fabricación en gran escala y su racional empleo en Medicina. La corteza de las plantas del género *Cinchona*, que en 1638 curó las fiebres padecidas por la virreina del Perú, Cinchón, no encontró empleo generalizado hasta que Pelletier y Cavendou, en 1820, descubrieron su componente activo, el alcaloide Quinina, tan utilizado modernamente para combatir el paludismo.

La planta *Ephedra vulgaris*, de gran aplicación en el tratamiento del asma y en los procesos de elevación de la tensión sanguínea, encontró su gran difusión después que Nagai aisló de ella su alcaloide activo, Efedrina, y Manske, Johnsen y Skita realizaron de modo elegante su preparación sintética. Los progresos de la química orgánica en el conocimiento de la constitución química de numerosas sustancias medicinales, permitieron el desarrollo de los métodos de preparación sintética de gran parte de los medicamentos naturales, produciendo una verdadera revolución en el campo de la industria farmacéutica que puede afirmarse surgió tal como hoy se la conoce con el perfeccionamiento de los procedimientos de síntesis y de los estudios llevados a cabo para determinar la constitución de las combinaciones orgánicas.

Así, por ejemplo, el mentol, que existe en la Naturaleza en la esen-

cia de menta, se produce en la actualidad sintéticamente por reducción del timol, producto de degradación de la mentona existente en determinados aceites esenciales. Otro producto natural, el alcanfor, en su modificación dextrógira, componente principal de la esencia extraída del *Cinnamomum camphora*, y en la levógira, constituyente de ciertos aceites esenciales, se obtiene hoy en grandes cantidades por diferentes métodos sintéticos de fabricación que utilizan todos, como primera materia, el α pineno, constituyente principal de la esencia de trementina, y no solamente pueden producirse sintéticamente medicamentos naturales, sino otros muchos que, no encontrándose en la Naturaleza, reemplazan o suplementan a aquéllos. Así sucede con el conocido hipnótico cloral, introducido en Medicina por Liebreich y preparado a comienzos del siglo XIX por Liebig, y con el cloroformo, tan utilizado en la narcosis, así como en las industrias de resinas y aceites, que se fabrican por síntesis en grandes cantidades. Numerosos antisépticos, antipiréticos, anestésicos, analgésicos, etc., etc., se producen partiendo del alquitrán de hulla. La salicina, el glucósido de la Sahgenina, existente en las hojas y cortezas de determinadas clases de sauces, se ha sustituido modernamente por los salicilatos, preparados por la conocida síntesis de Kolbe a partir del fenol. El derivado acetilado del ácido salicílico, la aspirina, con propiedades analgésicas, antineurálgicas y antipiréticas muy superiores a las del ácido de partida, se fabrica actualmente en grandes cantidades; el benzoato de bencilo, de gran aplicación en la destrucción de los insectos originarios de las plagas y en la sarna, y el p. p-diclorofenil-tricloro-etano, utilizado contra los piojos, portadores del tifus, se han fabricado en cantidades de gran importancia durante la guerra pasada. El conocimiento de las relaciones entre constitución química y acción fisiológica que ha sido alcanzado por el químico, en colaboración con investigadores biológicos, ha facilitado la obtención de nuevos compuestos de constitución definida que permiten lograr determinados efectos medicinales. El ácido dietil barbitúrico (veronal), descubierto en 1898 por Nebelthau, es un derivado alcohilado en el C del ácido barbitúrico, que se prepara por la condensación del éster malónico con la urea; en el veronal pueden sustituirse uno o ambos grupos etilo por otros radicales orgánicos y los productos así preparados diferir en el tipo de acción fisiológica. Se obtiene de tal forma el luminal (ácidoIenil-etil-barbitúrico), el evipán (sal sódica del N-metil C-metil C-ciclo-hexil-barbitúrico) y otros muchos hipnóticos, algunos que actúan con gran rapidez y producen períodos cortos de sueño, y otros más

lentamente absorbidos, produciendo sueño más prolongado. Algo parecido acontece con los anestésicos locales. Desde muy antiguo, viene utilizándose para hacer insensibles al dolor los tejidos del cuerpo la cocaína, como se sabe, el alcaloide obtenido de las hojas de coca. La determinación de la constitución química de la cocaína condujo a la producción sintética de una serie de sustancias semejantes a ella en mayor o menor grado, tanto en la estructura molecular como en la facultad para producir la anestesia de los tejidos cuando es aplicada localmente o inyectada. La novocaína (clorhidrato del éster p-aminobenzoico del N-dietilamino-etanol), la estovaína, pantesina, etc., etc., todos derivados de complicados amino alcoholes, son ejemplos de sucedáneos de la cocaína altamente interesantes y muy utilizados en la actualidad en Medicina.

Las investigaciones llevadas a cabo por Faraday y Hofmann en el alquitrán de hulla nos pusieron en posesión de los importantes antisépticos fenólicos, el primero de los cuales, el fenol tiene aún uso muy generalizado como desinfectante, a pesar de que otros productos obtenidos sintéticamente de diversas sustancias del alquitrán de hulla son más activos y selectivos en su acción; tal ocurre con los cresoles, menos tóxicos que el fenol y dos veces y media más activos; y el amilo meta cresol, con un poder germicida 300 veces superior al fenol. La introducción de átomos de halógeno en la molécula de los compuestos fenólicos suministró a la Medicina antisépticos no tóxicos muy superiores en actividad al fenol, entre los que pueden citarse el para cloro meta cresol y el para cloro meta xilenol. La dificultad de preparar disoluciones estables de cloro de conocida eficacia limitó su empleo como antiséptico, hasta que la producción sintética de compuestos orgánicos del tipo de la cloramina ha suministrado un método de antiseptia con cloro que eliminó todos los inconvenientes del empleo directo.

En el grupo de los colorantes, los acridínicos, cuyo compuesto fundamental es la acridina (contenida en cantidad pequeña en el alquitrán de hulla, pero que sintéticamente puede obtenerse al calentar la difenil amina con ácido fórmico y cloruro de cinc), figuran como antisépticos poderosos: la acriflavina, proflavina y euflavina, muy utilizadas en las heridas de guerra como consecuencia de su poder de destrucción de bacterias en presencia de líquidos o gases sin daño para el proceso normal de curación. El mercurio cromo, compuesto que combina las propiedades antisépticas del mercurio con las del colorante fluoresceína y la penicilina, de la que después nos ocuparemos en detalle, han puesto de

manifiesto su gran valor en tiempo de guerra debido a sus efectos específicos en la destrucción de bacterias.

Forman en la actualidad grupo importantísimo, entre los compuestos medicinales sintéticos, los agentes quimioterápicos que, siendo selectivamente tóxicos para los organismos productores de infección, no son dañosos a los tejidos del cuerpo. Al comienzo del presente siglo, Ehrlich y Shiga prepararon, calentando juntos ácido arsénico y anilina, el compuesto orgánico arsenical atoxilo, como sal sódica del ácido p-aminofenil arsénico, utilizado en el tratamiento de la enfermedad del sueño tropical, pero empleado cada vez menos a causa de su acción tóxica secundaria; prolongadas investigaciones condujeron más tarde (1906) al descubrimiento del salvarsán 606 (clorhidrato del 3-3' diamino 4-4' dioxarsenobenzol), utilizado en cantidades considerables en el tratamiento de las espiroquetosis, tripanosomiasis, en determinadas formas de malaria y especialmente como antisifilítico.

Recientemente aparecen como compuestos quimioterápicos importantísimos los derivados de las sulfonamidas cuando, en 1935, Domagk encontró que el prontosil destruye los estreptococos hemolíticos, que son responsables de la fiebre puerperal, escarlatina y erisipela. El prontosil (como se sabe, la amida del ácido sulfanílico) es un colorante azosintético rojo oscuro. Después se pasó a preparar otros compuestos del mismo grupo, tales como la sulfanilamida y la sulfapiridina; la primera, utilizada más bien en infecciones estreptocócicas, y la segunda, en las neumocócicas. La sustitución de unos grupos de átomos por otros llevó finalmente a los químicos orgánicos a la preparación de compuestos medicinales como la sulfadiazina, sulfatiazol, sulfaguanidina y otros, con definidos usos específicos.

En el campo de las hormonas contribuyeron los químicos a su más rápido desarrollo con el estudio de la constitución química y de la producción sintética de las mismas; y así, en 1901, Takamine y Aldrich aislaron de las glándulas suprarrenales una sustancia cristalina, elevadora de la presión sanguínea, llamada adrenalina, fabricada en la actualidad sintéticamente, en crecidas cantidades, a partir de la pirocatequina, el ácido cloroacético y el oxiclورو de fósforo. De la misma manera, la insulina, sustancia que Banting y Best, en 1922, reconocieron en el tejido insular del páncreas, y a la cual se atribuye el *control* del metabolismo del azúcar, por aplicación de los principios corrientes en la industria química, pudo ser concentrada en tal forma que está siendo inyectada y utilizada como agente medicinal en la regulación de

la diabetes en el hombre. Partiendo de cuidadosas investigaciones bioquímicas, Abel logró separar del páncreas de las ovejas insulina cristalina, y puede confiadamente esperarse que la constitución química de esta sustancia sea aclarada y llegue a ser posible la producción sintética de la misma.

En el metabolismo del cuerpo humano tiene una gran importancia la glándula tiroíde, y su defecto produce serias enfermedades; antiguamente se administraba la glándula animal en forma de polvo seco o como extracto, pero los trabajos bioquímicos han dado como resultado que Kendall, en 1915, descubriera la sustancia activa de las glándulas tiroides de los animales llamada tiroxina, cuya constitución química ha sido confirmada por síntesis, y por este medio se prepara hoy en grandes cantidades.

Los factores alimenticios accesorios necesarios para el mantenimiento de la salud, funciones de crecimiento y corporales son las vitaminas, que adquieren cada día mayor importancia en el tratamiento de enfermedades deficitarias (avitaminosis) y en profilaxis. Originariamente su nomenclatura era sencilla (A, B, C, D, etc., etc.), pero en la actualidad tiende a complicarse, como resultado del trabajo de los bioquímicos. Muchas vitaminas se consideraron al principio sustancias individuales, pero se vió más tarde que estaban formadas por más de un compuesto. Se producen hoy sintéticamente numerosas vitaminas: la vitamina A, promotora del crecimiento, aislada del aceite de hígado de peces, tiene gran analogía con la carotina -el pigmento de las zanahorias- y podría designarse provitamina A, ya que dentro del organismo animal se transforma en dicha vitamina, que durante la guerra se acertó a sintetizar químicamente, sin que hasta el presente se haya logrado seguir este método en la producción industrial.

La vitamina B₁, antineurítica, existente en abundancia en la cubierta de los granos de arroz, en la levadura, en el germen de trigo, etc., se fabrica actualmente en grandes cantidades por métodos de síntesis y se utiliza en Medicina con el nombre de aneurina. La vitamina B₂, factor también de crecimiento, de un color amarillo intenso, muy sensible a la luz, conocida como lactoflavina y muy difundida en el reino vegetal y en los organismos animales. La vitamina C -factor antiescorbútico, muy abundante en los frutos secos (naranjas, limones, coles, habichuelas, etc.), se fabrica sintéticamente en grandes cantidades, bajo la denominación de ácido ascórbico, partiendo de la 1-sorbosa, obtenida de la sorbita mediante oxidación por el *bacterium* de la sor-

bosa. La vitamina D, del aceite de hígado de bacalao -vitamina anti-rraquítica-, que modernamente se ha comprobado consiste en dos vitaminas, la D₁ y la D₂, ambas preparadas sintéticamente; la primera, conocida con el nombre de calciferol, un isómero de la ergosterina, poseyendo, por tanto, la fórmula bruta C₂₈ H₄₃ O H. que contiene cuatro enlaces dobles; la segunda, clerivada de la dehidrocolesterina, que puede producirse a partir de ésta y se diferencia de la anterior en la cadena lateral. La vitamina E, que influye en la fecundidad, idéntica a los alcoholes del grupo del tocoferol (α tocoferol y β tocoferol), de constitución perfectamente conocida, y que se fabrica sintéticamente por condensación catalítica de la trimetilhidroquinona con el bromuro de fitiljo obtenido a partir del fitol, La vitamina K, reguladora de la coagulación de la sangre, y cuya falta en el organismo conduce al empobrecimiento en protrombina, y que hoy va siendo reemplazada por la menaftona (2 metilnaftoquinona 1-4).

Debemos agregar a lo indicado hasta aquí que si la industria farmacéutica utiliza ciertamente gran número de productos químicos que otras industrias emplean también, se requieren para ella extremados grados de pureza; así, la farmacia emplea ácido sulfúrico, carbonato sódico, sulfato ferroso, ioduro potásico, etc., etc., pero con un elevado grado de purificación que les prive de las impurezas perjudiciales. Recientemente, se han introducido en farmacia las formas purificadas de kaolín, el trisilicato de magnesia y otras sustancias inorgánicas.

El resumen que acabamos de hacer de la transformación que experimentó la industria farmacéutica en los últimos años, pasando de sencillos materiales botánicos a complejos compuestos químicos, conduce a pensar si no sería conveniente la creación de la ingeniería farmacéutica, toda vez que los productos orgánicos, como los bioquímicos y micológicos, requieren una técnica muy compleja y grandes aparatos, no siendo suficiente el ingeniero químico para atender a esta nueva industria, dado que la enseñanza de éste se hace con la vista puesta en las necesidades de la pesada industria química y los procesos de ésta son relativamente toscos, comparados con los de la industria farmacéutica; cuyas técnicas obligan a tratar sobre una gran escala lo referente a esterilidad y toxicidad y exigen que el ingeniero farmacéutico sea una combinación de, ingeniero, científico, toxicólogo y farmacéutico. Cualesquiera que puedan ser los puntos de vista sobre esta observación. lo que sí nos parece indudable es que en la batalla emprendida contra los microbios los esfuerzos combinados del químico desarrollan-

do nuevos compuestos, del ingeniero proyectando los métodos de producirlos, del bacteriólogo, epidemiólogo y médico, se hacen absolutamente indispensables, y esto, por sí solo, justificaría el acierto de la nueva composición dada a esta Real Academia de Farmacia.

Simbiosis y Antibiosis

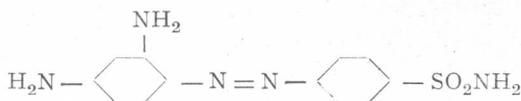
Los microbios crecen y efectúan muchas reacciones metabólicas en substratos naturales, tales como el suelo y estanques de agua, de manera completamente diferente a como lo realizan en cultivos puros donde ellos no participan de la influencia del crecimiento de otros organismos. En medios artificiales y naturales, ya sean éstos materiales sintéticos, masas orgánicas complejas e infusiones utilizadas para la preparación de productos esencialmente industriales, o cuerpos de plantas y animales, los cultivos puros de microbios se ven libres de los efectos de asociación y lucha de otros microbios que tienen lugar en substratos naturales. En poblaciones mixtas se desarrollan reacciones que ordinariamente no tienen lugar en cultivos puros. En el caso mismo de infecciones mixtas, un patógeno puede ser precedido o seguido por uno o más saprofitos, con lo cual los procesos de destrucción realizados en el cuerpo vivo del animal o de la planta son aplacados o acelerados. En las poblaciones mixtas que se encuentran en substratos naturales, las afinidades ecológicas son en gran parte responsables de muchas de las diferencias esenciales en el comportamiento y metabolismo de los microbios, comparadas con las observadas en los mismos organismos creciendo en cultivos puros. La mayor parte de los microorganismos, habitando un medio natural, suelo o agua, están sometidos a numerosas interdependencias, tanto antagónicas como asociativas o aún simbióticas. Todo organismo es directa o indirectamente influenciado por uno o más de los otros miembros constituyentes de la población compleja. En los comienzos se atribuyeron estas influencias a la lucha por los alimentos. Pfeffer decía: "Que todo el mundo y todas las afinidades amistosas y antagónicas de diferentes organismos son fundamentalmente reguladas por la necesidad de obtener alimento." Pero bien pronto se reconoció que esta explicación no estaba completamente de acuerdo con todas las complejas afinidades que tienen lugar en la naturaleza entre microorganismos. Quien primeramente acentuó -1879- el significado de las afinidades antagónicas entre microorga-

nismos fué De Bary, hablando del fenómeno de la antibiosis, por el cual, cuando dos organismos crecen sobre el mismo sustrato, más pronto o más tarde, uno vence al otro y aun lo mata. Afinidades simbióticas o mutualistas y antagónicas entre microorganismos determinan si resultarán ventajas o desventajas para el organismo de la particular asociación; las primeras son beneficiosas y las segundas perjudiciales. Kruse afirmó que cuando dos organismos son capaces de utilizar el mismo alimento pero son afectados diferentemente por las condiciones cercanas, reacción, suministro de aire y temperatura, aquel que encuentra condiciones más favorables para su desarrollo crecerá más rápidamente, y con el tiempo será capaz de suprimir al otro. Poter señala que los efectos producidos por hongos en cultivo mezclado son debidos al agotamiento de alimentos o a la formación de productos beneficiosos o dañosos. E. F. Smith señaló que cuando dos o más organismos viven en estrecha proximidad pueden ejercer efectos antagónicos, indiferentes o favorables uno sobre otro. Estas potencialidades fueron más tarde ensanchadas para incluir efectos estimulantes, inhibidores, de sobrecrecimiento y no influenciadores. En definitiva, se sabe que el antagonismo es un fenómeno muy complejo, resultado de actividades numerosas y frecuentemente poco conocidas. No puede trazarse una línea fina de demarcación entre efectos asociativos y antagónicos. Los microorganismos, habitando el suelo, viven en un estado de equilibrio. Cualquier trastorno de este equilibrio se traduce en un número de cambios en la población microbiana, a la vez cuantitativo y cualitativo. La naturaleza ecológica de esta población, descubierta bajo ciertas condiciones específicas, así como las actividades resultantes, tan sólo pueden ser comprendidas cuando las particulares afinidades entre los microorganismos sean reconocidas. A consecuencia de su gran complejidad, la población del suelo no puede ser tratada como un conjunto, pero algunos de los procesos, así como algunas de las relaciones entre grupos específicos de organismos pueden ser examinadas como individualidades separadas. Algunas han recibido especial atención, tales como las relaciones entre las bacterias no formadoras de esporas y las formadoras de las mismas, los actinomicetos y las bacterias, las bacterias y los mohos, las bacterias y los protozoos (aquéllas, seres primitivos del reino vegetal, y éstos, pertenecientes al reino animal) y las relaciones de las bacterias y los mohos con los insectos. La vida en común de dos organismos, resultando un cambio de tal naturaleza que no pudiera ser efectuado solamente por uno u otro de ellos aisladamente, constituye,

según se sabe el "sinergismo". Por él, microbios viviendo en asociación suelen desarrollar características que no poseen cuando viven en cultivos puros. Así, por ejemplo, cuando levaduras de cerveza se colocan reunidas con bacterias causantes de la tuberculosis en un medio libre de nitrógeno, conteniendo azúcar, la levadura desarrolla propiedades antagónicas hacia las bacterias, utilizando estas últimas como manantial de nitrógeno; la levadura segrega una sustancia bacteriolítica que causa no solamente la muerte de la bacteria sino también su desintegración, que es también activa fuera de las células. y de esta forma, determinadas bacterias son capaces de matar las levaduras al ser inoculadas dentro de suspensiones en agua destilada de esta última. El ácido para-amino benzoico y la sufapiridina ejercen también un efecto sinérgico sobre la penicilina, elevando el título de dilución en que la solución de penicilina inhibe a diversas bacterias.

Cuando Pasteur y Joubert describieron, en 1877, el efecto antagónico de ciertos organismos contaminadores, en el crecimiento del bacilo del ántrax, se halló la sugestión primera de que el fenómeno del antagonismo microbiano fuere capaz de posibilidades terapéuticas. La primera tentativa seria de emplear un antibiótico con propósitos curativos fué la de Emmerich y Loew, en 188g. Utilizando el descubrimiento de Bouchard de que el *pseudomonas piocyonea* es antagónico respecto de otras especies de bacterias, demostrando que el medio de cultivo en el cual el *Ps. piocyanea* había estado creciendo durante largo tiempo tenía la propiedad de inhibir o matar muchas bacterias patógenas. Atribuyeron este fenómeno a la acción del fermento *piocyanasa*, afirmando que el ántrax experimental podía ser curado con esta sustancia y sugiriendo su uso para tratar localmente la difteria y otras infecciones. Al combatir el ataque de una infección microbiana, el remedio que destruya el microorganismo mismo será claramente el más seguro en la acción. Si un medicamento capaz de hacer esto puede alcanzar el área afectada en la sangre, penetrándola completamente, será logrado el ideal terapéutico. La mayor parte de los antisépticos son enteramente inapropiados para tal fin: son mucho más letales para el hombre mismo que para los microorganismos que le atacan. Se sabe que, por lo general, cuanto más complejo es un organismo tanto más fácilmente es intoxicado, y una sustancia que haya de ser relativamente inofensiva para el organismo humano, pero letal para un microorganismo unicelular, habrá de tener propiedades tan excepcionales que no será fácil encontrarla. El año 1935 tuvo lugar un descubrimiento que

verdaderamente revolucionó la práctica de la Medicina. Las infecciones, agudas hasta entonces, casi siempre mortales en la juventud -meningitis, fiebre puerperal, neumonía, etc.- constituían casos ante los cuales la ciencia médica era generalmente impotente; y gracias a aquel descubrimiento son ahora tan dóciles al tratamiento, como antes eran rebeldes. El descubrimiento a que nos referimos fué la síntesis, por Mietzsch y Klarer, del medicamento conocido como "Prontosil" y la revelación por Domagk de sus propiedades terapéuticas. El *prontosil rubrum* preparado por Bayer 1. G., 4 sulfonamida-2'-4'-diaz-aminobenceno



se descompone en el organismo liberando su constituyente activo, la p-aminobenceno sulfonamida,



compuesto conocido casi universalmente como sulfanilamida, al cual debe el *prontosil* su actividad terapéutica, hasta el punto de que por su mayor solubilidad y su absorción más rápida ha venido a sustituir al *prontosil* en el uso terapéutico. Tomando como punto de partida la sulfanilamida, se descubrieron innumerables compuestos adicionales fácilmente obtenidos por síntesis, y el más importante de todos ellos la z-p-aminobenceno sulfonamido-piridina, conocida como sulfapiridina, muy utilizada en el tratamiento de la neumonía, en fermedad definida por Sir William Osler como "capitana de los ejércitos de la muerte". Mientras la sulfanilamida vencía la: mayor parte de las infecciones producidas por estreptococos, era casi inactiva a los neumococos, contra los cuales, por el contrario, la sulfapiridina ejercía una acción impresionante, descendiendo con su empleo la mortalidad debida a la neumanía, desde el 25 % a un 5 %. También merecen citarse la sulfanilguanidina, muy utilizada en la disentería bacilar, y la sal de sodio de la acetyl sulfanilamida aplicada a determinadas infecciones de la vista: En este campo, la farmacia inglesa ha preparado un medicamento que puede ser tenido en las casas para tomarlo cuando surja la enfermedad, al igual que puede hacerse con una tableta de aspirina;

nos referimos a la suliametacina [2-(4' -aminobencenosulfonilamino) 4: ó-dimetilpirimidina], que, sin embargo, no ha encontrado el campo extenso de aplicación que se esperaba. La manera de actuar todos estos compuestos es sumamente interesante, pues no lo hacen destruyendo bacterias, en unos cuantos minutos, en el tubo de ensayo, al igual que lo realizan los antisépticos ordinarios; por ejemplo, el prontosil no tiene ninguna acción sobre las bacterias fuera del organismo, y la misma sulfanilamida actúa impidiendo el desarrollo de unas pocas bacterias y no aniquilándolas en grandes cantidades. El modo de actuar, por tanto, en el organismo tiene que ser otro que el directamente letal para las bacterias. Las dos escuelas extremas que tratan de explicar teóricamente esta acción son la alemana, sostenida por Domagk, y la inglesa, patrocinada por Garrod. La primera eleva a la categoría de misterio impenetrable la acción de las sulfodrogas, algo así como si el desarrollo de los acontecimientos en un área de infección del organismo vivo sometido a la quimioterapia mantuviera secretos que no pudiéramos aspirar a dominar con nuestros conocimientos actuales. Garrod, por el contrario, sostiene que los compuestos de sulfonamida no tienen ninguna acción oculta, misteriosa e indirecta, sino que detienen en el organismo el desarrollo bacteriano obstaculizando el proceso necesario para su multiplicación. Esto es en sí mismo bastante para asegurar su destrucción, ya que las bacterias, mantenidas a la temperatura del organismo, tienen que crecer o morir, aparte de que cualquier infección aguda solamente progresa por rápida multiplicación bacteriana, y si ésta cesara, la intensidad, cada vez mayor, de las fuerzas defensivas del organismo la vencería inevitablemente. El estudio por Fildes, en el Hospital Middlesex, del metabolismo bacteriano, determinó de modo exacto cuáles eran los requisitos necesarios para el desarrollo de los estreptococos, y de él dedujo Lockwood, de Filadelfia, que la paralización del desarrollo bacteriano por la sulfanilamida *in vitro* es impedida por la peptona, constituyente, como es sabido, de todos los medios ordinarios de cultivo. Más tarde, siguiendo estas investigaciones, se demostró podía ser extraída de los estreptococos y otras bacterias una sustancia antagonica de la acción de la sulfanilamida sobre ellas en medio sintético. Al fin, se alcanzó un éxito aislando dicha sustancia, que identificada resultó ser el ácido p-aminobenzoico, compuesto esencial para el crecimiento de los estreptococos y algunas otras bacterias. Ellas mismas pueden formarlo, pero su ulterior utilización depende de una reacción enzimática, la cual es Impedida por la sulfanilamida, que-

dando de este modo interrumpida una etapa esencial en la formación de algún constituyente necesario para la célula bacteriana. La concentración de sulfanilamida que por dosis ordinarias puede ser alcanzada en la sangre logra este efecto en el medio nutritivo proporcionado por el organismo mamífero infectado, y resulta así justificado cómo la muerte de las bacterias bajo la influencia de tales medicamentos es una muerte por inanición. Este descubrimiento ha tenido una profunda significación, cuyo efecto más inmediato y práctico ha sido fomentar la aplicación local de estos medicamentos en forma de polvo a las heridas, medida que resultó ser de inmenso valor, particularmente en la cirugía de guerra. Es indudable que algunos microorganismos producen sustancias altamente nocivas para otros. La penicilina, formada por el mohó *Penicillium notaium*, poderoso antiséptico, y la Gramicidina, extraída por Dubas de un bacilo aislado del suelo, con propiedades muy similares a aquélla, son ejemplos clásicos de lo que venimos afirmando. La acción de la penicilina no es obstaculizada por el ácido p-amino-benzoico, como le sucede a las sulfanilamidas.

El gran valor que tiene la cromatografía en la preparación y aislamiento de algunos antibióticos, especialmente de la penicilina, nos impulsa a decir algo de este importante medio de análisis químico, fundado, como es sabido, en la adsorción diferencial en un proceso de contra-corriente. La cromatografía es absolutamente indispensable en el campo de la investigación, y su radio de acción alcanza a todos los problemas relacionados con la separación de sustancias más o menos semejantes. Así como la destilación fraccionada es equivalente a millares de destilaciones corrientes, la cromatografía, con el ordenado movimiento del líquido hacia el adsorbente, con el que se mantiene en todo momento en equilibrio, equivale a una constante y continua agitación del adsorbente seguida por filtración. Es en muchos casos la velocidad diferencial del movimiento la que permite, con un error infinitesimal, llegar a la separación de sustancias, de adsorción tan semejante que no es posible lograr una útil y adecuada separación mediante simple agitación con el adsorbente. El cromatograma ideal se realiza en un tubo en cuyo interior hay una columna de material adsorbente y poroso, a través del cual fluye el solvente. En todo el trayecto es constante la proporción de líquido a sólido, y la caída del primero es uniforme. Si en vez de un solvente puro hacemos pasar a través de la columna la solución de una sustancia adecuada, y suponemos que en una delgada sección de la columna la proporción de la sustancia disuelta en el solvente es α ,

se adsorberá en el material poroso la cantidad $1 - \alpha$. En este caso ideal el equilibrio entre sólido y líquido es instantáneo y no tiene lugar ninguna difusión. Evidentemente, si una porción a se mueve con la velocidad del líquido y una porción $1 - \alpha$ permanece estacionaria, la velocidad neta de la sustancia disuelta es α veces la velocidad del movimiento del líquido. La razón de las velocidades de la sustancia disuelta y del solvente se la representa por el símbolo R_F . De hecho, el equilibrio no se alcanza instantáneamente. La sustancia disuelta debe pasar de líquido a sólido y viceversa, lo cual tiene consecuencias prácticas muy importantes. Para lograr un equilibrio rápido hay que procurar que la distancia a través de la cual la difusión ha de llevar la sustancia disuelta sea lo más corta posible. Siempre, y nuestras experiencias así nos lo han confirmado, es causa de apreciable error no emplear un adsorbente finamente granulado.

Hasta aquí hemos supuesto que la isotérmica de adsorción era lineal, al ser constante la razón de la concentración de la sustancia disuelta en el líquido y en el adsorbente en equilibrio, pero de ordinario no es precisamente esto lo que ocurre, sino que generalmente la proporción de sustancia disuelta en la fase líquida aumenta con la concentración. El valor R_F crece con la concentración; por tanto, el frente, anterior se mueve más rápidamente que el posterior, y da como resultado el ensanchamiento de la faja. La adsorción de una sustancia puede a su vez modificar grandemente la adsorción de otra, y es ésta una nueva complicación a tener en cuenta en los análisis. El adsorbente más comúnmente empleado en los laboratorios es la alúmina, con un solvente no polar, tal como la bencina. Los grupos polares y polarizables en la sustancia disuelta son un factor importante en la determinación del comportamiento de la adsorción en esta clase de adsorbentes, y de modo parecido la elución es afectada por solventes polares o polarizables. Si un solvente tiene afinidades con el hidrógeno, es de ordinario un buen agente de elución. Estos adsorbentes difieren poco en selectividad y mucho en fuerza. El carbón también ha sido empleado recientemente en la cromatografía analítica. Sus isotérmicas de adsorción no son, ni con mucho, lineales, lo que es ventajoso en el análisis frontal y en el desarrollo por desplazamiento. En general, las cadenas grasas, y muy en especial los anillos aromáticos, determinan la adsorción en el carbón, mientras que las agrupaciones polares son menos importantes. Así, por ejemplo, la adsorción de los aminoácidos

tiene lugar en soluciones acuosas y pueden ser lixiviadas mediante el fenol o la efedrina.

Desde tiempo atrás vienen empleándose en el tratamiento de las aguas duras materiales productores del intercambio iónico, pero en gran escala sólo recientemente se utilizan en la cromatografía analítica. Esencialmente, se trata de ácidos insolubles o bases formadoras de sales insolubles. Primeramente se utilizaron los zeolitos, que aun cuando inestables en solución ácida, son útiles en el cambio del Na^+ por otros cationes. Adams y Holmes demostraron que ciertas resinas sintéticas poseen propiedades que favorecen este cambio iónico. Carbones sulfonados o resinas que contienen grupos de ácido sulfónico están en uso corriente hoy en día, y mediante ellos se consigue el cambio de los iones H^+ por otros iones. y es conocido existen, a su vez, resinas básicas capaces de producir cambios de aniones. Mas es preciso tener en cuenta que con estos adsorbentes las moléculas adsorbidas son retenidas por fuerzas electroestáticas, de tal forma que no es la estructura molecular, sino la carga, el principio determinante de la adsorción. Recientemente se ha introducido en el análisis cromatográfico el *gel* de sílice como adsorbente. La sílice absorbe aproximadamente la mitad de su peso de agua para formar el *gel* sin aparecer mojado. Así, mediante un *gel* de sílice saturado puede obtenerse un cromatograma empleando como solvente cualquiera que reúna la condición de ser inmisible, o poco menos, en el agua. Efectuando una conveniente selección del solvente no hay adsorción en el *gel* de sílice mismo, sino que el cromatograma depende exclusivamente de la distribución entre el solvente y el agua. En este cromatograma de reparto, el valor RF derivado del coeficiente de distribución y de las cantidades de agua y solvente inmisible está de acuerdo con el valor ya observado. No hay inconveniente en el empleo, en vez de agua, de otros líquidos, así como el reemplazo del *gel* de sílice por almidón, celulosa y otras sustancias. En los procedimientos de purificación de la penicilina, complicados y difíciles, dada su inestabilidad respecto de muchos compuestos químicos, así como las desfavorables solubilidad es del ácido libre y de sus sales, sin haberse encontrado un compuesto orgánico cuyo catión forme con ella una sal relativamente insoluble. adecuada para procesos de purificación, la cromatografía ha desempeñado un papel importantísimo, y de ella se ha hecho uso extensivo para separar de la penicilina cruda el producto puro. La adecuada distribución entre solventes, varios métodos de cromatografía y un proceso reductor por amalgama de aluminio

(que sin afectar a la penicilina cambia las solubilidades y la reacción cromatográfica de las impurezas) han permitido recientemente obtener sales de bario con una actividad de 1.000 a 1.500 unidades Oxford por miligramo, y hasta lograr preparaciones de sales de penicilina cristalinas, con lo cual parece haberse alcanzado el límite de purificación. Es ésta la razón por la que nos hemos detenido brevemente a tratar de la cromatografía analítica.

Las cuatro zonas siguientes se distinguen en la columna de adsorción. Cromatograma, desde la parte superior.

1.^a La Capa anaranjada, pardo oscura, de espesor inversamente proporcional a la cantidad de carbón usado para la decolorización, contiene algo de penicilina.

2.^a Ligera capa amarilla. Contiene la mayor parte de la penicilina. Nada de pirógenos.

3.^a Capa anaranjada. Contiene algo de penicilina. Algo o la totalidad de los pirógenos; y

4.^a Capa pardo o rojo-violeta. No contiene penicilina. El pigmento desaparece con exposición a la luz.

Antibióticos - Penicilina

Nuestro compañero, el doctor Bustinza, tan destacado en el campo de la Farmacia y de la Fisiología, que ha estudiado con tanto cariño cuanto a los antibióticos se refiere, y está reconocido hoy en el mundo científico como una autoridad en la materia, en su obra sobre la penicilina recomienda que la palabra antibióticos (empleada por Waksman, en 1941, como sustancias opuestas a la vida, por su demasiada amplitud, y en casos determinados ser salvación de los enfermos) se sustituya por la de "antibióticos selectivos antimicrobianos". Acéptese o no la sugerencia del doctor Bustinza, es lo cierto que existe un fenómeno muy generalizado, el del "antagonismo microbiano", según el cual numerosas especies de bacterias y hongos son capaces, en condiciones favorables, de dificultar o impedir el crecimiento de otras especies microbianas, y que esta acción inhibitoria es debida en muchos casos a las propiedades de ciertos productos metabólicos formados por el antagonista; y es a tales productos a los que se designa con el término antibióticos o antibióticos selectivos antimicrobianos. Las sustancias

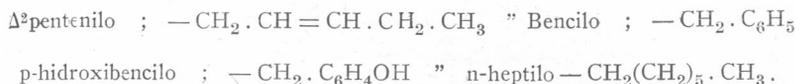
antimicrobianas pueden ser de naturaleza química o biológica. Las primeras, inorgánicas u orgánicas; así, por ejemplo, metales pesados, halógenos, fenoles, compuestos arsenicales, colorantes, etc. Las segundas incluyen una variedad de productos de plantas superiores (quinina, proteínas de la harina de trigo, etc.), animales superiores (lisozima, lactenina, etc.) y microorganismos, a los cuales específicamente se aplica el término antibiótico. La propiedad, poseída por cultivos filtrados de muchas bacterias, de inhibir el crecimiento de células bacterianas es conocido de antiguo, y se ha llegado a hacer la sugestión de que todas las bacterias, ensayadas a la edad conveniente y bajo condiciones propias de cultivo, son capaces de producir sustancias antibacterianas. Hoy se ha establecido definitivamente que esta propiedad es solamente característica de ciertas especies de bacterias específicas, mohos y actinomicetales. Las sustancias antibióticas de origen microbiano son fundamentalmente en naturaleza bacteriostáticas más bien que bactericidas; quiere decirse que inhiben el crecimiento de la bacteria en vez de ocasionar directamente su muerte. En su acción son selectivas. Algunas afectan mayormente las bacterias gram-positivas; su acción sobre las gram-negativas es más limitada, por lo que toca a la vez a las clases afectadas y a la concentración requerida para llevar a cabo una completa inhibición. Otras sustancias pueden inhibir solamente el crecimiento de ciertos miembros de ambos grupos de bacterias.

Está, por tanto, perfectamente justificado hablar de un "espectro característico bacteriostático " para cada sustancia antibiótica. El espectro señalará la distribución de inhibición del crecimiento de diferentes bacterias para diferentes concentraciones de una sustancia antibiótica. Y gráficamente, las franjas del espectro representarán la concentración de la sustancia. La producción de sustancias antibióticas por microorganismos específicos aparece influenciada por la raza del organismo, la composición del medio, la temperatura de incubación, la edad del cultivo, aeración y otros factores. Las sustancias antibióticas varían, por tanto, muy grandemente en su modo de acción sobre las células bacterianas, en su toxicidad sobre animales y en su utilización práctica para el tratamiento de enfermedades humanas.

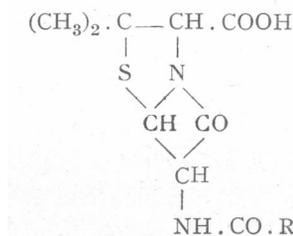
Entre las más importantes sustancias antibióticas se encuentra la penicilina producida por el moho *Penicillium: notatum*; soluble en alcohol y en agua; soluble en éter, al pH.2 Y en otros disolventes; termolábil; contiene nitrógeno; actividad biológica contra las bacterias gram-positivas, aeróbicas y anaeróbicas; activa *in vivo* con

muy baja toxicidad y agente fundamentalmente bacterinestático. La mayor parte de los microorganismos patógenos no sobreviven mucho tiempo en el suelo, incluso aunque ellos pudieran sobrevivir en cualquier otra parte en condiciones similares de alimentación, temperatura y humedad. La muerte de los gérmenes patógenos en el suelo es con frecuencia rápida y debida a armas químicas identificables, producidas por microorganismos antagónicos que son habitantes naturales del mismo medio. Este hecho indudable nos indica la gran aportación de la naturaleza al bienestar de la humanidad, ya que sería difícil imaginarse el desarrollo y la supervivencia de nuestra raza si el suelo hubiese sido un lugar apropiado para el contagio. Mientras los quimioterapeutas de las anteriores generaciones, buscaban los remedios para las enfermedades en extractos de plantas superiores, descubriendo agentes tan valiosos como la quinina y la emetina, o remedios fisiológicamente tan potentes como la digital y el opio, las dos últimas generaciones de científicos investigaron para encontrar remedios antibióticos sobre cultivos de microorganismos. Quien tenga curiosidad, como me ha sucedido a mí, de revisar la literatura publicada durante los últimos setenta años, encontrará referencias de hasta por lo menos veinte sustancias de origen microbiano, que manifiestan alguna actividad contra el bacilo de la tuberculosis, la gran preocupación, entonces y ahora, en el campo de las sustancias antibacterianas. Pero entre los antibióticos descubiertos, sólo dos han alcanzado, hasta el presente, una fase de desarrollo práctico para el tratamiento de las enfermedades humanas: la penicilina y la estreptomycinina. La última, producida por actinomicetales de una especie del género *Streptomyces griseus*, muy similar a la estreptotricina, aun cuando esta última tiene un espectro mucho más estrecho que la estreptomycinina, y es menos activa sobre ciertas bacterias, tanto gram-positivas como gram-negativas, aparte de dejar la estreptotricina un efecto tóxico residual en el cuerpo animal que con la estreptomycinina no aparece. En 1928 no había indicios de ningún agente químico eficaz contra las infecciones comunes; mas en este año, cuando el profesor Sir Alexander Fleming efectuaba, en su laboratorio del Hospital de Santa María, en Londres, investigaciones sobre la destrucción de bacterias por los leucocitos, una espora de un hongo, con la que no se contaba, vino a caer en uno de sus cultivos, produciendo ciertos cambios que llamaron la atención del sabio profesor e iniciaron el comienzo de la preparación e identificación del agente antibacteriano más poderoso que haya salido nunca a la luz.

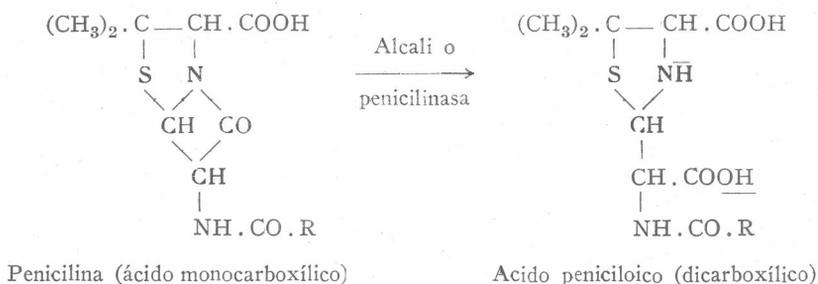
Las cuatro variedades conocidas de penicilina responden a la fórmula molecular $C_9H_{11}O_4N_2SR$, siendo la única diferencia entre ellas la constitución del radical R. Hay así la penicilina I o F en América, en la cual R es el radical Δ^2 pentenilo. La II o G, en América, con R radical bencilo. La III o X americana, en la que R es el radical p-hidroxibencilo, y la IV o K, de América, con R radical n-heptilo.



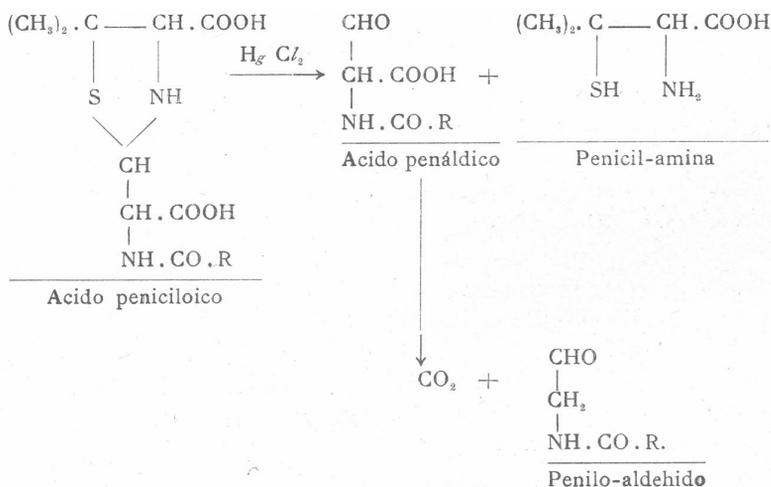
Todas las variedades son ácidos monobásicos fuertes y tienen una estructura β -lactámica, sin que los cuatro miembros del anillo β -lactámico se hayan encontrado hasta ahora en cualquier material biológico.



Por hidrólisis alcalina se forma un segundo grupo carboxílico, y el ácido dibásico resultante se llama ácido peniciloico, que a su vez se forma en la acción del enzima penicilinasas sobre la penicilina, lo que se comprueba experimentalmente por el hecho de que la penicilina, después de destruida por la penicilinasas, tiene la misma curva de titulación que el ácido peniciloico. Este paso de ácido monocarboxílico a dicarboxílico, es decir, el incremento de acidez consecuencia de la reacción, se mide nanométricamente en el conocido aparato Warburg por el volumen de CO_2 desprendido de un sistema "tampón o regulador" de bicarbonato sódico. Como dentro de ciertos límites la mayor parte de las reacciones enzimáticas proceden con velocidad proporcional a la concentración del enzima presente, puede utilizarse el experimento anterior para ensayo de la penicilinasas, y aún si el volumen de CO_2 desprendido fuere proporcional a la cantidad de substrato como método de ensayo de la penicilina.



En el paso se fijan, como se ve, los iones del agua (marcados en la figura con -) y se rompe el anillo β -lactámico. Es sabido que en la disociación química de los albuminoides, si ésta no prosigue hasta el final, o si son gradualmente desdoblados por fermentos, se engendran los péptidos, y que al proseguir la disociación química o fermentativa éstos cuantitativamente se transforman en aminoácidos. Ahora bien; cuando el ácido peniciloico, producto de la hidrólisis de la penicilina, que es un péptido, se trata por solución acuosa de cloruro mercúrico se descompone, dando un aminoácido, la penicilamina o $\beta\beta$ dimetilcisteína, y el ácido penáldico.

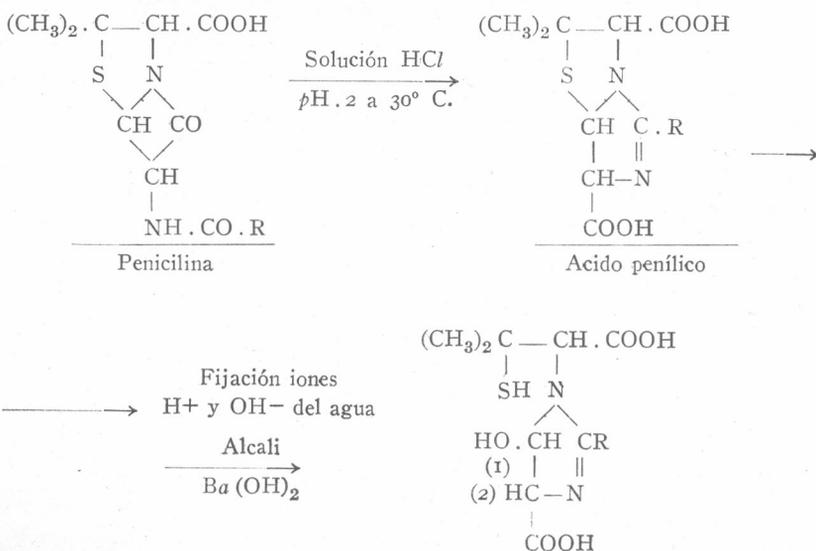


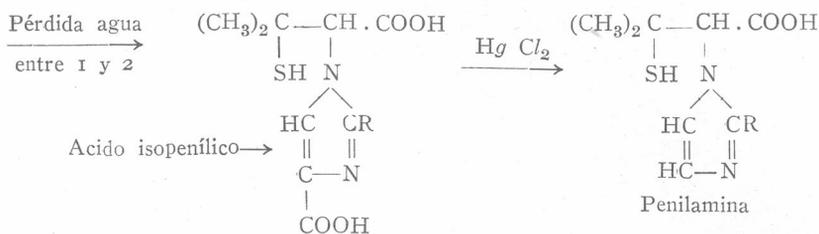
Debe, sin embargo, observarse que los aminoácidos obtenidos por hidrólisis de las proteínas son invariablemente levógiros, mientras la dimetil-cisteína obtenida de la penicilina es dextrógiira. Experiencias lle-

vadas a cabo esterificando la penicilina y ácido peniciloico han puesto de manifiesto que el grupo $-\text{COOH}$ en la penicilina y penicilamina es el mismo. Recuérdese que la cisteína tiene la fórmula:

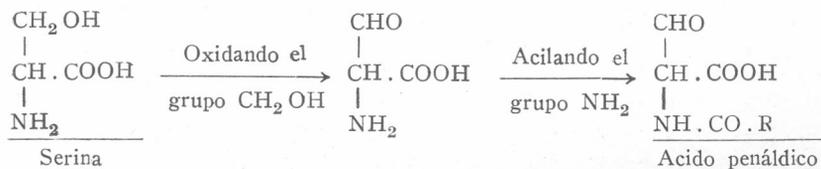
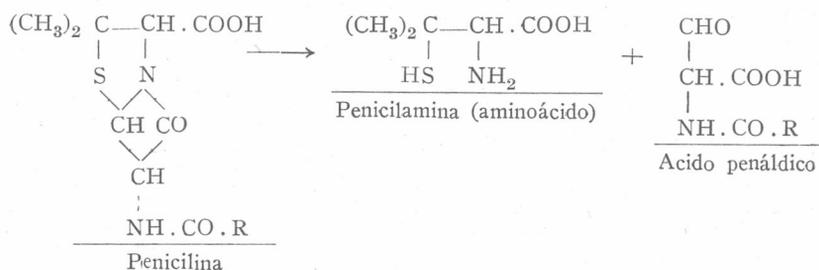


Cuando se inactiva la penicilina tratándola con ácido clorhídrico a un pH.2 y a 30°C ., el tipo de reacción es otro; los productos obtenidos son también ácidos dicarboxílicos, pero diferentes de los ácidos peniciloicos. Son los ácidos penílicos isómeros con las correspondientes penicilinas, pero tienen un anillo de cinco miembros. Se forman en dos fases: primero, abertura del anillo β lactámico de la penicilina; segundo, ciclización para formar el nuevo anillo de cinco miembros. Los ácidos penílicos, al tratarlos por álcalis como el hidróxido de bario, dan ácidos iso-penílicos, formación que tiene lugar adicionando agua para abrir el anillo conteniendo azufre, seguida de la pérdida de agua del grupo OH así formado y el grupo H del carbono, llevando el grupo $-\text{COOH}$. Las penilaminas se forman de modo análogo en el tratamiento de los ácidos penílicos con solución acuosa fría de cloruro mercúrico. Las penilaminas pueden mirarse como ácidos iso-penílicos menos CO_2 .

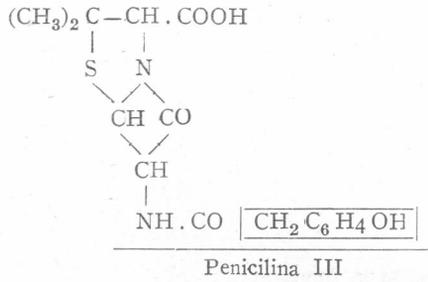




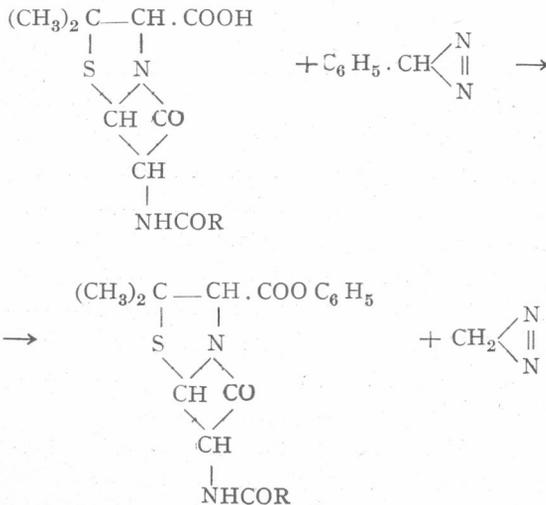
La estructura de la penicilina es, como se ve, relativamente sencilla. Deriva de dos aminoácidos; la penicilamina ($\beta\beta$ dimetil-cisteína) y una serina acilada cuyo grupo alcoholico ha sido oxidado a aldehído.



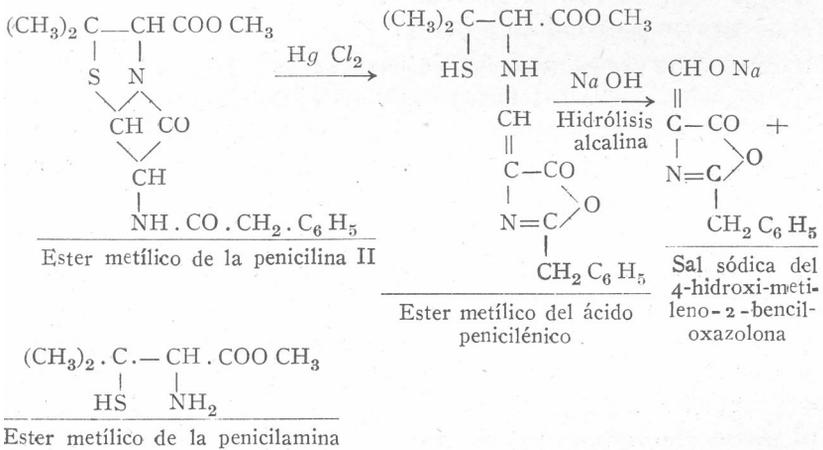
La estructura péptida de la penicilina está incorporada de manera hasta ahora desconocida dentro del anillo β lactámico. Recordemos que en los dipéptidos los dos aminoácidos se unen por el grupo amino de uno y el carboxílico del otro, y no se efectúa en esta forma en la penicilina, donde al ligarse el ácido penáldico y la penicilamina se eliminan cuatro átomos de hidrógeno y dos átomos de oxígeno. Esta particular estructura y las reacciones de la penicilina ofrecen poco estímulo al deseo de poder obtener comercialmente esta importantísima droga por vía sintética. Únicamente la penicilina III (para-hidroxibenzilo), que tiene en la cadena lateral un grupo hidroxibenzilo, ofrece la posibilidad de modificar dicha cadena y producir de tal forma penicilinas adicionales, algunas de las cuales pudieran ofrecer ventajas sobre los compuestos naturales. Hasta ahora, sin embargo, nada se ha realizado en este sentido.



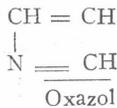
Con vista a encontrar un compuesto que de manera lenta se descomponga en el organismo humano liberando penicilina, se han estudiado por diferentes investigadores los ésteres metílico, etílico y bencílico de la misma. Por desgracia, el hombre no puede hidrolizar los ésteres, y una inyección subcutánea (hipodérmica) de 50.000 unidades emulsionada en engrudo de almidón falló en dar un perceptible nivel sanguíneo, y muy poca penicilina fué recuperada en la orina. Sin embargo, algunos experimentadores señalan el hecho de ser el éster bencílico altamente eficaz y no tóxico, manifestando que la administración bucal dió, en determinadas enfermedades de la infancia, muy buen resultado empleada en solución de aceite de sésamo. El éster bencílico se prepara fácilmente por la reacción del fenil-diazo-metano con la penicilina en un disolvente orgánico.



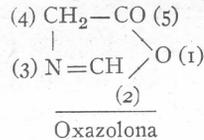
Mediante el bicarbonato sódico se separa la penicilina no transformada, y evaporando el disolvente se obtiene una resina con escasa actividad antibiótica. Si ahora tratamos el producto con materias que den lugar a una hidrólisis enzimática (extracto de riñones de ratón-suero de conejillo de Indias o conejos), se obtiene una materia de gran actividad, pudiendo afirmarse que el uso de ésteres en terapéutica solamente es útil cuando el cuerpo humano sea capaz de suministrar enzimas que logren llevar a cabo la hidrólisis de los mismos. Es también compuesto importante el ácido penicilénico, obtenido tratando en un disolvente no polar a la temperatura atmosférica el éster metílico de la penicilina II con cloruro mercúrico.



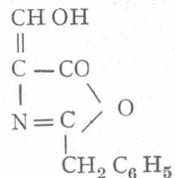
Recuérdese que el oxazol es:



La cetona, oxazolona, será:



y el 4 hidroximetileno . 2 benzil oxazolona es, por tanto:



Después de habernos ocupado con algún detalle de la constitución y estructura de la penicilina, sacando la consecuencia de que, hoy por hoy, hay muy pocas esperanzas en la posibilidad de su fabricación sintética, aunque la síntesis académica ya se haya logrado, vamos a tratar, siquiera sea brevemente, de un proceso muy interesante, el de su purificación. El cultivo crudo contiene, por término medio, de 10 a 80 unidades Oxford por centímetro cúbico. La penicilina es, según hemos visto, un ácido, en solución acuosa, muy inestable; pero, en forma de sales alcalinas y alcalinas térreas, estable entre los pH 5 y pH 7. Agitando el líquido de cultivo, después de acidificado con ácido fosfórico, ajustando su pH a 2, es posible extraer de él la penicilina con éter, pero al evaporar éste para obtener aquélla se observó que perdía en gran parte la penicilina su actividad. Es, no obstante, posible la reextracción de la penicilina de los disolventes orgánicos por agitación con fosfato tampón o con soluciones acuosas ajustadas a un pH entre 6 y 7. Para obtener la penicilina en su forma de ácido libre se sugirió el empleo de otros disolventes orgánicos, tales como el cloroformo, acetato amílico y la ciclohexanona. Siendo las sales de penicilina mucho más solubles en agua que en los disolventes orgánicos, puede separarse de éstos con, aproximadamente, $1/5$ a $1/10$ del volumen de solución alcalina. Se logró así concentrar la penicilina, y repitiendo varias veces la operación con diferentes disolventes y un pH adecuado, se obtuvo una considerable purificación de la misma, reduciendo simultáneamente el volumen de líquido. Manteniendo las soluciones frías durante todo el proceso se consigue reducir considerablemente las pérdidas de penicilina, y desecando después en el vacío la solución acuosa, partiendo del estado de congelación, se obtiene una sal de penicilina en polvo que conserva durante mucho tiempo inalterada su actividad antibacteriana. Se llega así a 450 a 1.700 unidades de penicilina por miligramo de producto seco. No obstante, desde el punto de vista químico, este preparado dista aún mucho de ser puro, conteniendo solamente pequeño tanto por ciento de penicilina en tal estado. La destrucción de la penicilina por ácidos y álcalis diluidos, por alcoholes primarios, agentes oxidantes, reactivos cetónicos, metales pesados; la solubilidad fácil en agua de las sales alcalinas y alcalinotérreas, sin haberse encontrado ningún compuesto orgánico cuyo catión dé con la penicilina lugar a una sal insoluble adecuada para su purificación con finalidad industrial, dificulta extraordinariamente el aislamiento de la penicilina en estado de pureza. Ya indicamos anteriormente la extensión con que se han apli-

cado los métodos cromatográficos, que, combinados con un proceso de reducción con amalgama de aluminio, permitieron a los investigadores de Oxford la obtención de penicilina de 1.000 unidades Oxford por miligramo, capaz de inhibir el crecimiento de determinadas bacterias en una dilución de 1: 50.000.000 ó de 1: 100.000.000. También es interesantísimo señalar en este campo de la purificación y en el del aislamiento y caracterización de los diversos tipos de penicilina, los valiosos servicios prestados por el análisis infrarrojo. Se sabe que el espectro infrarrojo de un determinado compuesto orgánico puede utilizarse para caracterizarlo. Es una de las más precisas constantes físicas, y, como tal, sirve a la manera de la impresión dactilar, pero en contraposición a otras muchas propiedades físicas, el espectro infrarrojo de una mezcla de dos compuestos, A y B, no está situado en alguna parte entre A y B, sino que consiste de una superposición directa del espectro de A más el espectro de B. Y esto es exacto para una mezcla de cualquier número de componentes, a condición de que estos componentes existan individualmente y no manifiesten cualquier acción recíproca física o química entre sí.

De esta suerte, el espectro infrarrojo de una mezcla puede ser utilizado para fines de análisis cualitativo y cuantitativo. Durante los últimos cuatro años, el análisis infrarrojo ha probado ser de la mayor utilidad en conexión con muchos aspectos del problema de la penicilina. Considerando que el agua, en cualquier apreciable espesor, es opaca a la radiación infrarroja en muchas regiones espectrales, y puesto que aparece deseable utilizar la sal sódica de la penicilina a lo largo del trabajo, ningún disolvente inerte apropiado se encontró, prefiriendo efectuar el estudio sobre muestras cristalinas en la fase sólida. Esto lleva consigo la introducción de factores, algunos de los cuales son ventajosos y otros perjudiciales. La cantidad de muestra requerida es pequeña, pues resultados satisfactorios en el análisis cualitativo se obtienen sobre cantidades inferiores a un miligramo, mientras el análisis cuantitativo requiere, por lo general, cantidades hasta de 15 miligramos. La novedad consiste principalmente en que la mayoría del trabajo analítico infrarrojo hasta este momento encontrado en la literatura ha sido hecho sobre gases, líquidos y materias amorfas, y no se han publicado, al menos que nosotros conozcamos, resultados de análisis cuantitativo sobre muestras en la fase sólida cristalina.

El espectro infrarrojo de la sal sódica de las diferentes penicilinas cristalinas se toma como tipo. Las muestras utilizadas para este fin,

aunque las mejores capaces de obtener, son ciertamente impuras en grados variables; pudiera, pues, parecer conveniente mirar las muestras hasta ahora utilizadas como tipos puros, probablemente, como más impuras de lo que sospechamos. De esta suerte, las curvas tipo, junto con los resultados cuantitativos hasta ahora obtenidos, deben ser aceptadas por el momento como ensayo. Es posible que ellos deban de ser corregidos muy severamente. Considerando que muchas de las bandas de absorción utilizadas son asociadas con la estructura cristal de las moléculas, debe ser acentuado que los métodos descritos se aplican solamente a materias cristalinas. Es, de otra parte, cierto que el catión de la sal desempeña un papel importante, y, de conformidad con ello, todas las curvas de calibrado deben ser hechas utilizando el mismo tipo de sal que aquellas que más tarde van a ser analizadas. El espectro infrarrojo de las diferentes penicilinas muestra muchas coincidencias, pero existen determinadas diferencias que pueden utilizarse para el análisis cualitativo. Las frecuencias que hasta ahora están siendo utilizadas son las siguientes:

Penicilina	Na G	703 cm^{-1}	,	14,23 μ
"	Na X	1,220 cm^{-1}	,	8,19 μ
"	Na F	831 cm^{-1}	,	12,03 μ
"	Na K	971 cm^{-1}	,	10,3 μ
						1,330 cm^{-1}	,	7,52 μ

El examen del espectro de una muestra dada, comparado con su prototipo, descubre la extensión a la cual están presentes las materias no-penicilínicas, y aunque éstas no puedan ser identificadas prontamente, su presencia puede ser descubierta con el empleo de otras técnicas.

El método generalmente seguido en el análisis cuantitativo es el de "tipo interno", que se describe en las interesantes publicaciones del *Staniford Rescarch Laboratories*. Se utiliza como patrón la d .1. -alanina, como se sabe, aminoácido aislado de las proteínas. El espectrómetro es del tipo prisma y espejos o, mejor, de enrejado con superficie metálica. El enrejado es giratorio. Llamando θ al ángulo que forman la normal a la reja y la bisectriz del ángulo que formar los rayos incidentes y difractados, la longitud de onda es $m \lambda = K \text{ seno } \theta$, siendo K la constante del espectrómetro.

Sin entrar a describir la práctica de este método, pues no es de este lugar, manifestaremos que con él puede analizarse cualquier mezcla con una precisión de ± 2 por 100 y qué, por tanto, en cuanto a

su seguridad, es comparable a cualquiera de los mejores conocidos. Un método de purificación de la penicilina que conduce a la sal sódica cristalina utilizada en el análisis espectral infrarrojo de que nos ocupamos es el consistente en utilizar un cromatograma de trisilicato magnésico. Una solución de penicilina (ácido libre), obtenida añadiendo ácido fosfórico a una solución acuosa de la sal sódica impura y extrayendo con éter u otro disolvente orgánico, se pasa por una columna de trisilicato magnésico. Cuando el cromatograma es desarrollado por medio de éter el tercio superior de la columna contiene el material activo, que es recuperado por lixiviación con un *tampón* fosfato de pH 7,5. La penicilina puede ser obtenida como sal sódica de pureza de 60 a 65 por 100 por acidificación y transferencia a éter, seguida de extracción con solución N/IO de hidróxido sódico. El tratamiento de la sal sódica impura con alcohol isopropílico le quita la mayor parte del color, dejando un producto que tiene una actividad de 1.400 a 1.500 unidades por miligramo. Disolviendo en alcohol metílico, enfriando, agregando alcohol isopropílico y permitiendo a la solución reposar en un refrigerador, se separan cristales de penicilina sódica en gran estado de pureza. La penicilina comercial que corrientemente se vende es la sal sódica o cálcica, nunca, generalmente, en estado de pureza. Su actividad está entre 300 a 1.500 unidades por miligramo, y, naturalmente, sus propiedades varían necesariamente con la naturaleza y cantidad de las impurezas presentes.

Fabricación de la penicilina

Desviándose de la matanza de la guerra, surgen de ella frecuentemente progresos que hacen avanzar la civilización por décadas, y, paradójicamente, la ciencia de economizar vidas frecuentemente alcanza su más alto valor en el ejército cuando los campos de batalla aparecen más ensangrentados. Al crédito siempre vivo de las sulfadrogas, plasma sanguíneo, etc., se debe que en la reciente guerra solamente un 2 por 100 de los heridos hayan sido perdidos, mientras se alcanzó un 7 por 100 en la primera guerra mundial. El más reciente y, sin duda alguna, el más firme de estos avances es el descubrimiento de la penicilina, el "oro enmohecido", cuando no puro, pardo amarillento, descubierto como subproducto metabólico del verde *Penicillium notatum* por Fleming y más tarde investigado en Oxford por Chain y Florey.

Nunca anteriormente en la Historia humana había sido descubierta una droga que pudiera realizar tanto y fuera, sin embargo, tan poco conocida. Casi tan maravilloso como las sorprendentes propiedades curativas de la penicilina es la extremada rapidez con la cual ha sido llevado a cabo el programa de su fabricación en gran escala en Inglaterra y Norteamérica, habiéndose pasado de la clínica, preparaciones en laboratorio y planta piloto a la fase de producción industrial en un año, aproximadamente. El mínimo de capacidad para hacer la industria rentable se estima en 40 billones de unidades Oxford de penicilina sódica mensualmente, y el coste en Norteamérica de una fábrica para esta producción estimase de 1.500.000 dólares. En cualquier proceso de fabricación de la penicilina es esencial el mantenimiento de la asepsia, dado que numerosas bacterias producen penicilinasas, enzima que, según indicamos, destruye con gran rapidez la penicilina.

También repetiremos que, hoy por hoy, no es posible fabricarla con métodos como los que se siguen en las sulfanilamidas, y hay que recurrir a extraerla del cultivo del moho, proceso, desde luego, no económico, en el que los químicos han logrado que este moho fabrique la sustancia en gran cantidad y con un costo muy pequeño, y ya es bastante. Hay dos métodos satisfactorios de producir industrialmente la penicilina; el de cultivo superficial, que se empleó mucho, sobre todo en Inglaterra, pero que va siendo cada vez más abandonado, por no poder económicamente competir con su rival, el método de cultivo sumergido o profundo.

Cultivo superficial.-En un número muy grande de frascos separados se efectúa la propagación del moho en un medio sintético, generalmente una modificación del bien conocido Czapek-Dox¹, conteniendo. nitrato sódico, fosfato ácido de potasio, cloruro potásico, sulfato magnésico, trazas de sulfato ferroso y dextrosa; tiene la ventaja sobre el medio nutritivo utilizado por Fleming, conteniendo solamente

1

<i>Medio de cultivo Czapek-Dox</i>	<i>Medio Czapek-Dox modificado por Abraham y colaboradores</i>
NO ₃ Na... .. 3,00 grs.	NaNO ₃ 3,50 grs.
PO ₄ H ₂ K 1,00 "	PO ₄ H ₂ K 1,50 "
CaK... .. 0,50 "	KCL... .. 0,50 "
SO ₄ Mg, 7H ₂ O... .. 0,50 "	SO ₄ Mg, 7H ₂ O... .. 0,50 "
SO ₄ Fe, 7H ₂ O... .. 0,01 "	SO ₄ Fe, 7H ₂ O... .. 0,015 "
Glucosa... .. 40,00 "	Azúcar pardo... .. 20,00 "
Agua destilada hasta... .. 1.000 c. c.	Agua destilada hasta... .. 1.000 c. c.

azúcar y muy pocas sales inorgánicas, que da una más alta concentración de penicilina y, por lo mismo, simplifica considerablemente la extracción. Los frascos utilizados pueden ser de diversos tipos; lo esencial es que su forma permita colocar fácilmente varios millares de ellos en el incubador. Cada frasco se carga con 500 centímetros cúbicos de media de cultivo; se cierra con un tapón de algodón en rama y se lleva al autoclave para esterilización total. Frío el frasco, se inocula con una suspensión de conidios de *Penicillium notatum* y se lleva a un incubador, donde se tiene, durante siete a once días, a una temperatura de 25 grados centígrados. Los conidios se obtienen lavando la capa superficial de un cultivo del moho en agar nutritivo. Hay que evitar, sobre todo en los primeros días de la fermentación, que la temperatura en el incubador se eleve demasiado. No debemos perder de vista que el incubador contiene, por lo menos, la producción de una semana, que su capacidad es, por lo mismo, considerable y que es difícil mantener una temperatura uniforme en todas las partes de un espacio tan grande sencillamente por *control* termostático. Hay que dejar en el incubador amplio espacio de aire alrededor de cada frasco y mantener una circulación perfecta del mismo. Las dificultades en el proceso de fabricación de la penicilina derivan de estas tres causas: primera, la sustancia activa es inestable; segunda, se encuentra en el medio de cultivo en muy pequeña proporción, y tercera, el moho se desarrolla más favorablemente a un pH cercano a la neutralidad, que es asimismo favorable al crecimiento de organismos insensibles a la penicilina, algunos de los cuales son productores de enzimas, como la penicilinasas, destructores de la penicilina en el mismo momento de su formación. Terminada la incubación en los frascos, son éstos vaciados sobre los coladores para privarles del "fieltro de micelio que los cubre, enfriando a continuación rápidamente el líquido del metabolismo a tan baja temperatura como sea posible, sin congelación, para, de tal forma, reducir al mínimo las pérdidas de actividad en el tratamiento que sigue.

Se trata ahora de concentrar y de purificar la penicilina, y para esto se siguen dos procedimientos. 1.^o Transferencia alternativa de la penicilina, que es, como se sabe, un ácido orgánico, a un disolvente orgánico y a una solución acuosa diluida de bicarbonato sódico o a una suspensión acuosa de cal, método en principio absolutamente idéntico al tan utilizado por todos los farmacéuticos en los ensayos de alcaloides. En el segundo método se hace uso de un adsorbente, del cual, pos-

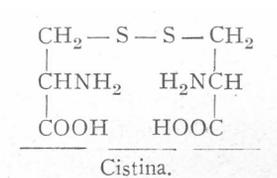
teriormente, la penicilina es extraída. Para el primer proceso se utilizan disolventes, como el cloroformo y el acetato de amilo; el caldo debe acidificarse con ácido fosfórico a un pH 2-3 y agitarlo con el disolvente. Este, con la penicilina en solución, es separado en una centrífuga de alta velocidad; la penicilina es transferida a una solución *tampón*, tal como una mezcla de fosfato disódico y fosfato ácido de sodio, de la cual es extraída por cloroformo; agregando solución acuosa de hidróxido o de bicarbonato sódico se forma la penicilina, que pasa dentro de solución en la fase acuosa. Más amplia purificación es efectuada repitiendo el proceso; la solución de sal final se seca por congelación, como más adelante indicaremos. Una de las dificultades en este método de extracción es la de poder asegurar la separación adecuada del disolvente orgánico de la solución alcalina acuosa que contiene la penicilina. La eficacia de la separación en una centrífuga puede ser mejorada por la adición de un compuesto orgánico cuyo catión sea activo superficialmente, tal como el bromuro del esteariltrimetil amonio. También se ha indicado la posibilidad de adicionar un agente emulsionante, o aniónico, o catiónico, en cantidad insuficiente para producir emulsificación.

Adsorción.-Los investigadores de Oxford utilizaron como adsorbente alúmina de Brockman, pero más tarde se vió que el carbón vegetal adsorbía rápidamente la penicilina del caldo, siendo efectuada la elución con una solución acuosa de acetato de amilo o acetona. Por este medio se logra una concentración diez veces mayor. También se recomienda utilizar una columna de adsorción, con *gel* de sílice, impregnada en solución acuosa de una base *tampón* a un pH 5-7, a través de la cual se hace pasar la solución de penicilina bruta en un disolvente orgánico. La penicilina forma de esta manera una sal que es retenida por el adsorbente más fuertemente que la mayor parte de los contaminadores; así que éstos o son llevados por el disolvente orgánico, o adsorbidos en la parte más baja de la columna. La parte alta de la columna se separa mecánicamente, y de ella se extrae la penicilina. Los métodos basados en la técnica cromatográfica no se han empleado hasta ahora en gran extensión en la práctica industrial, porque la adsorción directa y la lixiviación son en la aplicación mucho más sencillos y se han desarrollado a un grado favorable de eficacia. No obstante, en la actualidad se emplea muy ampliamente el procedimiento de extracción por disolvente.

En el método de fabricación de la penicilina por cultivo superficial

que acabamos de bosquejar, el medio de cultivo tiene una extraordinaria importancia, y modificaciones del mismo se traducen en gran aumento en la cantidad de penicilina obtenida. Asimismo, la selección en la clase del moho empleado debe ser tomada en consideración. Se descubrió primeramente en las investigaciones realizadas la imprescindible necesidad de la presencia de algunas trazas de elementos, especialmente cinc y cobre, pero el resultado más importante fué la observación deducida por Moyer en Peoria de que la adición al medio del líquido procedente de la infusión de maíz acrecentaba notablemente la riqueza en penicilina. El líquido de infusión de maíz es un subproducto de la industria del almidón, obtenido cuando el maíz es macerado en agua caliente. Contiene esta infusión diversos constituyentes solubles, y su efecto se debe a un número de compuestos cuya naturaleza no ha sido hasta ahora descubierta.

Añadiendo al medio esta infusión y sustituyendo la dextrosa por la lactosa se han obtenido titulaciones de *ochenta* y más unidades por centímetro cúbico. Se ha hablado de la adición al medio del aminoácido cistina, obtenido, como es sabido, por hidrólisis a la ebullición con ácido clorhídrico o sulfúrico, del cabello. Se llegaron a obtener titulaciones de alrededor de 190 unidades por centímetro cúbico, utilizando un medio conteniendo fenilacetamida y cenizas de infusión de maíz.



Secado por congelación.-Durante el proceso de fabricación de la penicilina por el método de cultivo superficial hemos hablado del procedimiento de secado por congelación, consistente en exponer a un alto vacío una disolución congelada, con lo cual el hielo se sublima sin pasar por la fase líquida, dejando el soluto seco en un estado en que, debido a su estructura abierta reticular, es muy rápidamente soluble en agua. En la forma en que este secado se aplica a la penicilina, el material a tratar consiste en una disolución acuosa, concentrada y estéril, de su sal cálcica o sódica; cuanto menor sea el volumen a secar (quiere decirse más alta la concentración), el proceso es más rápido, pero la exactitud de la subdivisión se hace en consecuencia más importante. Si por ejemplo hay que secar por congelación 100.000 unidades de un

centímetro cúbico de concentrado, cometer tan sólo el error de una gota en el volumen del líquido puesto en el frasco significaría en el producto acabado un error de un 5 por 100, aproximadamente; es decir, de *cinco mil unidades*, lo cual, en producto caro como la penicilina, es importantísimo para el fabricante, toda vez que un posible déficit en la titulación es cuestión muy seria para el enfermo. De aquí que el químico deba vigilar mucho la concentración más conveniente de la solución para someterla al secado. Se eliminan primeramente los pirógenos haciendo pasar la solución por un filtro de asbestos tipo Ertel, y a continuación las bacterias por filtración Seitz. Seguidamente se pasa la cantidad conveniente a los frascos, esterilizados en condiciones asépticas, mediante una apropiada máquina de carga trabajando debajo de una pantalla de vidrio. Los frascos ya llenos, colocados en bandejas de acero inoxidable, esterilizadas, se tapan con tejido de algodón estéril a fin de eliminar la contaminación y se trasladan a un refrigerador hasta que se congele la solución. Se colocan después sobre estantes que se hacen descender a la cámara de secado por congelación, consistente en un cilindro en el que se efectúa el vacío hasta una presión cercana a *un milímetro de mercurio*, y que lleva en su interior un serpentín de condensación mantenido a -50° C. Se cierra el cilindro, se hace el vacío, y al alcanzar un valor suficientemente bajo, se sublima el hielo sobre el serpentín. Para suministrar el calor latente de evaporación del hielo, se montan radiadores eléctricos debajo de los estantes en que los frascos descansan y se regula el calor para mantener una temperatura de -20° C., aproximadamente, hasta la sublimación de casi la totalidad del hielo. Debe señalarse la extraordinaria importancia que tiene la regulación de esta calefacción, toda vez que es preciso evitar que la temperatura se eleve nunca por encima del punto de fusión de la disolución de penicilina; de otra manera, la evaporación rápida del agua líquida determina que la penicilina residual tome la forma de una espuma fea solidificada. Una vez la penicilina seca, en cuyo estado es relativamente estable, no hay inconveniente en elevar la temperatura para privarla del resto de la humedad. Los frascos, protegidos hasta este momento por el cierre que proporciona el tejido estéril de algodón, se obturan ahora con tapones de goma esterilizados mantenidos en su sitio mediante cierre de aluminio, recubriendo seguidamente el cierre completo con una capa de aquel metal en polvo. El secado por congelación tiene, no obstante, en la práctica un grave inconveniente, el de que únicamente puede aplicarse con sencillez a cargas pequeñas,

tales como frascos conteniendo 100.000 unidades. Con cargas mayores, la capa de material congelado es demasiado gruesa para permitir la sublimación rápida del hielo, a menos de emplear una solución muy concentrada, lo que tiene las dificultades que ya señalamos en otro lugar de incrementar el error. Los frascos dispuestos para la venta, conteniendo medio o un millón de unidades de penicilina, se cargan por tanto utilizando penicilina ya seca, secada por congelación a granel mediante una modificación del procedimiento que acaba de describirse. Para facilitar la carga del frasco suele a veces granularse la penicilina finamente. La carga se efectúa unas veces a peso y otras a volumen. En los Estados Unidos se desarrolla actualmente de manera extraordinaria el método de secado por ondas de frecuencia de radio, patentado por la *Radio Corporation* de América, pero en Inglaterra no ha tenido hasta el momento aceptación.

Cultivo sumergido o profundo.- En América, desde el primer momento, se orientaron los fabricantes de la penicilina hacia un procedimiento que fuera capaz de suprimir los gastos de limpieza, carga, esterilización e incubación de los muchos millares de frascos, conteniendo cada uno sólo 500 centímetros cúbicos de líquido, que era preciso realizar diariamente en el proceso de cultivo superficial. Llegaron así después de muchísimas experiencias e investigaciones, a la conclusión de que el sistema ideal de llevar a cabo el proceso de fermentación sería en grandes cubas, y nació de tal forma el método de cultivo sumergido, con el cual se vió era completamente incapaz de competir económicamente la técnica del cultivo superficial. A éste, pues, hemos de recurrir seguramente en España cuando se acometa la fabricación de la penicilina. Se sabe que el *Penicillium notatum* produce la penicilina únicamente en condiciones aerobias; es por lo mismo fundamental en la fermentación sumergida suministrar continuamente gran cantidad de aire esterilizado al moho. Podemos dividir la producción de la penicilina por este procedimiento en cinco etapas:

- 1.ª La Fermentación sumergida; 2.ª Eliminación de micelios y adsorción por carbón vegetal de la penicilina; 3.ª Purificación por disolvente y formación de la sal sódica; 4.ª Secado por congelación y alto vacío; y 5.ª Embalaje, análisis y almacenaje. Como medio nutritivo se utiliza el líquido procedente de la infusión de maíz adicionado de un 4 por 100 de lactosa, que ya hemos indicado es excelente para la fermentación, ignorándose la causa, así como tampoco se conoce la razón por la cual la infusión de maíz proporciona resultados muy diferentes de

unas variedades a otras. Las cubas de fermentación son construidas de acero al carbono y tienen una capacidad normal de 45 metros cúbicos.

Cada baño fermentador es inoculado con una pequeña cantidad de cultivo puro de *Penicillium notatum* cuidadosamente criado sobre agar en el laboratorio y desarrollado en tanques de siembra. Incidentalmente, el *Penicillium notatum* se encuentra en el suelo, pero los cultivos empleados en la fabricación son cultivos puros seleccionados previamente, que dan un gran rendimiento en penicilina. Masa de los tanques de siembra se introduce en la carga del fermentador, y el moho se desarrolla y produce penicilina hasta que se forma la cantidad óptima. El ciclo de fermentación dura unos siete días; la temperatura durante él se mantiene entre 23 y 24° centígrados, mediante circulación de agua fría en la camisa, y por espacio de unas ochenta horas se sopla aire completamente esterilizado a través del líquido de fermentación. Por esto se llama este proceso de fermentación sumergida o proceso de tanque profundo, y en él se obtiene como subproducto el anhídrido carbónico. Propiamente tratados y después de un trabajo de una semana, aproximadamente, estos tanques despreciables mohos producirán una cantidad pequeña de penicilina. Si no obstante la cocción del medio de cultivo con vapor, indispensable para esterilizarla, no es la exactamente apropiada, casi nada de penicilina es obtenida, así como tampoco se obtiene si se presenta una infección bacteriana, por pequeña que sea. Debe tenerse presente que a una temperatura de 37,8° C. el moho, en todo caso, no se desarrolla, y que por bajo de un cierto nivel del pH pudieran formarse otras sustancias antibacterianas, disminuyendo grandemente el rendimiento en penicilina. Un exceso, por pequeño que sea, de acidez, alcalinidad o calor causa la descomposición de la penicilina. La carga del fermentador conteniendo grandes cantidades de micelios y trazas de penicilina es dejada caer, por gravedad, a una centrifuga abierta, teniendo la cesta, de acero inoxidable de 1,20 metros, en la cual los micelios son eliminados. Aun cuando el caldo sea expuesto al aire en esta operación, los peligros de contaminación son muy pequeños a causa de la velocidad de filtración. El caldo filtrado, muy ligeramente alcalino, se envía por medio de una bomba a un tanque de adsorción cerrado de acero inoxidable con paletas helicoidales, donde por espacio de quince minutos se agita con el 2 a 2,5 por 100 de carbón activo. La penicilina y determinados constituyentes del caldo son adsorbidos por el carbón vegetal, operación ésta, sin embargo, que no debe ser

innecesariamente prolongada, pues en otro caso sería excesiva la destrucción de la penicilina. La masa negra de caldo-carbón es trasladada por medio de bombas a unas centrífugas con cesta de acero inoxidable de 1,20 metros. El filtrado se envía a la alcantarilla, mientras la penicilina-carbón es rápidamente pasada, por gravedad, a un tanque de lixiviación con fondo cónico y agitadores laterales. Comienza en esta fase la purificación de la penicilina bruta utilizando disolventes orgánicos, y comprende las operaciones siguientes: 1.^a Extracción de la penicilina del carbón activo y eliminación del carbón; 2.^a Eliminación parcial de las impurezas por un tratamiento del concentrado de penicilina, junto con un ajuste del pH con ácido; 3.^a Separación de los disolventes y segundo tratamiento del extracto con una sal de sodio y regulación con fosfato; 4.^a Separación y recuperación de los disolventes por destilación; y 5.^a Filtración de la solución acuosa de penicilina sódica anteriormente a las operaciones de carga. El equipo usado en esta preparación se compone de pequeños tanques con agitadores laterales y revestimiento de vidrio, pudiendo observarse que el equipo empleado hasta este momento era, en la mayor parte, de acero inoxidable. El disolvente principal es el acetato amílico, aun cuando sean también utilizados otros disolventes orgánicos. Como filtro se emplea una cantidad pequeña de tierra de infusorios, que ayuda a eliminar el carbón lixiviado. Las centrífugas usadas para este propósito son del tipo corriente, probadas a vapor y de cesta de acero inoxidable de 1,20 metros. Ej. carbón agotado es descargado por medio de un transportador de hélice. La solución procedente de esta lixiviación del carbón alcanza aproximadamente a 900 litros. Para la primera extracción de ella del concentrado de penicilina, se agrega una pequeña cantidad de un ácido inorgánico, con el fin de ajustar bien el pH. La emulsión procedente de esta operación es llevada a una supercentrífuga con una concavidad de acero inoxidable de 15 centímetros, girando aproximadamente a 15.000 revoluciones por minuto. El refinado de esta operación conteniendo alguna de las impurezas es, destilado a unos 100 milímetros de presión, y así, al final de la extracción, el volumen, que progresivamente decrece, no pasa de 60 litros. En la segunda extracción, solución acuosa de bicarbonato sódico y una solución reguladora de fosfato son añadidas desde un pequeño tanque de alimentación. La penicilina reacciona rápida y completamente, formando una sal sódica, muy soluble en agua, que es pasada a una segunda supercentrífuga, similar a la ya descrita, y el disolvente es enviado a un alambique

recuperador y purificador, pudiendo así volver a utilizarlo. La penicilina sódica disuelta, de la extracción final, es pasada por un filtro debastidor, biológico, tipo Seitz, construido de acero inoxidable, en el que 24 placas mate de un papel especial, de 45 centímetros cuadrados, aproximadamente, eliminan las bacterias y sustancias pirógenas (productoras de fiebre) que aún pudieran estar presentes. Esta operación, que se realiza en muy pocos minutos, se lleva a cabo en un lugar esterilizado, y el filtrado es recibido en un contenedor de acero inoxidable, asimismo esterilizado, de 60 litros de capacidad aproximadamente. Destaquemos, como problema poco corriente en la industria, que en esta fase de purificación de la penicilina, 45.000 litros de caldo de fermentación han de ser concentrados, por extracción con disolvente, a 60 litros de solución de penicilina sódica, que aproximadamente, después del secado, darán de 2 a 2,5 kilogramos de producto seco. Pasa en este momento el concentrado de penicilina a la superficie esterilizada de la fábrica, pues de hecho las operaciones de filtración pirógena, lavado de frascos y esterilización, carga, congelación, deshidratación a elevado vacío, cierre de los frascos, etiquetado y empaque deben ser llevadas a cabo bajo las condiciones mejores de esterilización, en orden a evitar toda posibilidad de contaminación. Se trata de edificios que alcanzan en su conjunto, ordinariamente, Un volumen de 850 metros cúbicos. El aire en ellos debe ser esterilizado, y bancos con 250 lámparas ultravioleta, aproximadamente, destructoras de gérmenes, están distribuí dos por toda la superficie, constituyendo la más grande instalación de esta clase en el mundo. Todas las personas que deban entrar en esta área superesterilizada deben primeramente penetrar en una habitación también esterilizada y pasar entre una densa cortina de rayos ultravioleta, lavar sus manos con jabón quirúrgico y cambiar sus ropas por túnicas esterilizadas, guantes, zapatos y caretas que no deben nunca sacarse de este lugar. Las máscaras son utilizadas para evitar la posible contaminación al hablar, mientras las defensas plásticas transparente., evitan el ataque a los ojos por la luz ultravioleta. Como remate de estas precauciones, todas las operaciones de carga de los frascos, taponado, etc., se realizan protegidos con defensas de vidrio, y todo se ha dispuesto de tal forma que los frascos llenos, destapados, están expuestos a la atmósfera esterilizada solamente cuestión de segundos. Las paredes interiores de estos edificios son de vidrio, y semanalmente se lavan con una solución antiséptica.

Operaciones de carga.- El líquido procedente del filtro biológico es

conducido a dos máquinas de carga que extraen la solución acuosa de penicilina sódica, y automáticamente vierten por una pipeta una cierta cantidad dentro de los frascos esterilizados. Agua destilada libre de pirógenos es utilizada para lavar los frascos y para la dilución del producto. La operación de carga se lleva a cabo en una de las habitaciones superesterilizadas protegida por una pantalla de vidrio, y las bandejas están de tal forma dispuestas que solamente una hilera de frascos queda expuesta a la atmósfera en cualquier tiempo. Actualmente, es tan rápida la operación de carga que las botellas son expuestas tan sólo cinco segundos aproximadamente. Estos frascos, que son los contenedores finales, tienen una capacidad de 22 c. c., pero aproximadamente tan sólo 5 c. c. de solución son inyectados. El exceso de capacidad es para disponer de solución idónea del producto seco en el frasco al tiempo de tener que usarla en el campo. La velocidad de carga es de 50 a 60 frascos por minuto, y la exactitud en la cantidad introducida cae dentro de 0,05 c. c. En este momento, la solución contiene aproximadamente 20.000 unidades Oxford por c. c.; así que cada frasco contiene un total aproximado de 100.000 unidades, aproximadamente sesenta ¹ miligramos. Las bandejas, revestidas de cobre, con los frascos cargados, son rápidamente transportadas a otra habitación superesterilizada y colocadas en un refrigerador; todos los operadores que trabajan en este lugar frío llevan traje apropiado. Incidentalmente, una gran cantidad de amoníaco es requerida por día para la refrigeración, acondicionamiento del aire, abastecimiento y operaciones de tratamiento en frío a lo largo de la planta. Después de haber sido enfriadas a baja temperatura, las bandejas son rápidamente colocadas en los secadores y deshidratadas a muy baja presión.

Secado por sublimación.- Nos hemos ya ocupado de él con algún detalle al tratar del cultivo superficial; agregaremos ahora que la parte más interesante de la planta es el equipo de secado a alto vacío. Dado que la inestabilidad al calor de la penicilina sódica es grande, la deshidratación es menester realizarla en el estado de congelación; en otros términos, el hielo debe ser evaporado directamente sin pasar por el estado líquido, y esto se realiza con el uso de bombas de difusión de alto vacío, semejantes a las que se emplean actualmente en la producción de magnesio por el proceso al ferrosilicio. Cada secador contiene doce bandejas o aproximadamente 1.200 frascos de solución de peni-

¹ Una unidad por c. c. equivale a 0,0006 miligramos por c. c.; por tanto, 100,000 unidades en 5 c. c. equivalen a 60 miligramos.

cilina, y en la fábrica productora de 40 billones de unidades Oxford por mes, económicamente la mínima para ser rentable, es menester disponer de una batería de 15 secadores. La deshidratación a menos de 1 a 2 por 100 de humedad requiere pocas horas. Por medio de bombas se lleva a cabo un alto vacío, que determina un empuje de 10 toneladas sobre la puerta del secador; los vapores pasan a condensadores de baja temperatura, y una vez que la penicilina sódica ha sido deshidratada se retira a una habitación superesterilizada, en la cual tapones de goma son insertados dentro de los frascos por el uso de pinzas; la operación se realiza debajo de una pantalla de vidrio. A continuación, una tapa de aluminio es colocada y fijada a máquina, y se le pone por último un casquete para el polvo, después de lo cual el producto queda dispuesto para el etiquetado y empaquetado final. El producto seco, amorfo y pardo amarillento en color, contiene, según indicamos, 1 a 2 por 100 de agua y un 20 a 30 por 100 de la sal sódica de penicilina. El remanente, 70 a 80 por 100, siendo en mayor parte sustancias orgánicas desconocidas, pero no dañosas. No obstante, tan fuerte es la sustancia que todavía titula 500 unidades Oxford por miligramo. La unidad Oxford es difícil de visualizar; Florey la define como "la más pequeña cantidad de penicilina que, cuando disuelta en 50 centímetros cúbicos de un caldo de extracto de carne, justamente inhibe el crecimiento completo de la raza de prueba *Staphylococcus aureus*. Por tanto, material conteniendo una unidad por miligramo inhibe el crecimiento de este microorganismo a la dilución final de 1:50.000 en el cultivo medio. La planta de 40 billones de unidades por mes trata anualmente 35 a 40 millones de litros de líquido de fermentación, y, sin embargo, el rendimiento anual en producto seco es inferior a una tonelada, menos de 500 kilogramos en penicilina pura. Los 40 billones de unidades de penicilina sódica producidas por la planta mensualmente son suficientes para suministrar tratamiento completo a un mínimo, aproximadamente, de 8.000 enfermos y a un máximo de 350.000, dependiendo, como es natural, del tipo y gravedad de la infección.

Nos parece oportuno, después de habernos ocupado de los procesos más en uso actualmente para fabricar penicilina, profundizar en la teoría de algunas fases importantes de esta industria. Hemos detallado ya cómo la penicilina puede recuperarse de los caldos superficiales y sumergidos de infusiones de cereales por dos procedimientos: 1.º Adsorción con carbón y lixiviación; 2.º Extracción directa por disolvente. En el de adsorción se utiliza el carbón vegetal activo y el lavado por

lixiviación con un agente conveniente. El químico al frente de una industria de este género debe profundizar en los siguientes problemas: Examinar una serie de carbones de madera activos, con respecto al volumen, a la facultad de mojar, penicilina adsorbida y extraída por lixiviación, velocidades relativas de filtración; pH y temperaturas de adsorción y lixiviación, tiempo de contacto, estabilidad de la penicilina en el carbón, métodos de filtración, reducción en el consumo de carbón, métodos mecánicos de lixiviación, agentes de lixiviación, tales como la acetona acuosa, mezclas de ésteres yagua, butanol acuoso y metiletilcetona, estudios cuya finalidad no es otra que la mejora de rendimiento y la pureza del producto. Hasta ahora, entre todos los agentes de lixiviación, el mejor parece ser la acetona acuosa, pues proporciona un tiempo de contacto más reducido, altas velocidades de filtración con filtrados libres de carbón, una mayor reducción general en el volumen, mayor eficacia y disminución en el tiempo de manejo del carbón. Tiene, sin embargo, algunos inconvenientes, tales como la precisión de manejar grandes volúmenes, alta volatilidad y necesidad de eliminarla antes de continuar la manipulación, pero no son ninguno de ellos de gran importancia.

Lixiviación estática de adsorbatos.-En los primeros tiempos, el procedimiento de lixiviación exigía, después de la primera filtración, sacar el carbón del filtro, agitarlo con el agente de elución, volver a filtrar, y así varias veces en cada operación, dependiendo en gran parte el número, del disolvente orgánico utilizado. Como se comprende, se consumía mucho tiempo en el manejo del carbón. Se desarrolló, por tanto, con fines prácticos, la lixiviación estática, en la que el carbón es lavado directamente sobre el filtro, y a continuación arrojado, pudiendo utilizarse sin inconveniente los filtros de placa, así horizontales como verticales. En los filtros de placa horizontal, la eficacia media de la lixiviación, determinada en una serie de veinte experiencias, con un total de 1.500 litros de caldo, es de 90 por 100, y el promedio de recuperación de la penicilina, 85 por 100. Un filtro horizontal muy utilizado es el fabricado por la compañía norteamericana Sparkler, con tres placas horizontales, 35 centímetros de diámetro y cinco centímetros de espesor. El caldo (50 a 100 litros), con un pH 5 - 6, se agita durante cinco minutos, a temperatura de 5 a 10° C., con 2,5 por 100 de su peso de carbón, preferentemente agregado como fango acuoso, y seguidamente, con agitación continua, es lanzado por una bomba sobre el filtro, previamente revestido de sílice pura. Después de la filtración,

el carbón se lava con unos 10 litros de agua para privarle del caldo, y a continuación se seca haciendo pasar aire a través del filtro, evitando de tal forma la dilución innecesaria de la acetona. Este paso de aire durante quince minutos no causa destrucción de la penicilina. A velocidad de 2,5 litros por minuto, relativamente baja, se hace pasar por el filtro la acetona acuosa. Con un agente de lixiviación de 80 por 100 de acetona, el paso repetido del mismo por el filtro no solamente no aumenta la recuperación, sino que puede disminuirla; conviene entonces emplear una pasta gruesa de carbón. Si la acetona utilizada fuere de 90 por 100, el paso repetido es indudablemente ventajoso. El volumen del agente de elución por volumen de caldo puede reducirse en un 50 por 100 por el uso de un procedimiento de lixiviación en contracorriente, de dos fases, consistente en utilizar el segundo lixiviado de una fase como primer líquido de elución de la fase siguiente.

Evaporación instantánea de los lixiviados de acetona.- En las primeras experiencias, todos los esfuerzos se dirigieron a efectuar a baja temperatura los diferentes procesos de fabricación de la penicilina, dada su sensibilidad al calor. Sin embargo, los estudios realizados sobre la estabilidad térmica de los lixiviados de acetona y de los concentrados acuosos obtenidos, después que la acetona se ha eliminado, pusieron de manifiesto que la descomposición de la penicilina es relativamente lenta, y como consecuencia se ha introducido recientemente la evaporación directa y continua de los líquidos procedentes de la lixiviación con acetona. Naturalmente, ha de ser conveniente que la calefacción a que se somete el concentrado sea lo más baja posible.

Un tubo de vidrio con camisa de vapor lleva en la parte superior un dispositivo que esparce el líquido sobre la superficie interna del mismo. El líquido es alimentado a velocidad constante y de manera continua al dispositivo, y al desparramarse en el interior del tubo la acetona, destila, mientras el concentrado acuoso corre a través de un condensador de enfriamiento situado en la parte inferior y como prolongación del tubo, al receptor. De esta manera, es cuestión de segundos el tiempo de exposición del lixiviado de acetona y del concentrado a altas temperaturas. Todo el aparato es de vidrio. Existen también evaporadores directos de este tipo utilizados bajo presión reducida; pero estudios serios en esta dirección no se han realizado. También hay evaporadores con tubo metálico, cuyos concentrados, en general, contienen menos acetona que los de tubo de vidrio. Se recomiendan

en este caso, para seguridad de no destrucción de la penicilina, los tubos de acero inoxidable.

Proceso de disolvente.- En el curso de las investigaciones para la recuperación de la penicilina de los caldos sumergidos se han estudiado muy extensamente los métodos y condiciones para la extracción de la misma de los caldos con disolventes orgánicos y el subsiguiente paso de la penicilina de los disolventes a disoluciones acuosas. Esta operación en dos pasos puede repetirse hasta que la solución acuosa final tenga la pureza deseada de penicilina (unidades por miligramo de sólidos totales), así como la concentración deseada (unidades por centímetro cúbico). Esta fase de la fabricación también lleva consigo numerosos estudios: coeficientes reales de distribución a pH 2,5, 6 y 7; comparación de las disoluciones de disolvente y reguladoras; destructores de emulsión y centrifugación; purificación de disolventes para volver a utilizarlos; condiciones de extracción, tales como pH, tiempo de contacto, temperatura y relación de disolvente a agua; procedimiento especial de purificación aplicado a soluciones de penicilina en disolventes orgánicos; comparación de diversos procesos de recuperación. El objetivo general siempre es mejorar el rendimiento y la pureza de la penicilina terminada. Dos circunstancias hacen, sin embargo, difícil la operación discontinua: La Es preciso manipular grandes cantidades de caldo para obtener una cantidad apreciable de producto final; 2.° El proceso de recuperación lleva consigo la extracción de penicilina a un pH bajo, al cual es inestable. Para fines prácticos es, por tanto, menester emplear un proceso continuo para pasar la penicilina de una solución acuosa a otra, acuosa también, empleando como solución intermedia una orgánica. Esto lleva consigo dos operaciones de extracción separadas que pueden ser aplicadas al proceso posterior. Hoy se realiza una extracción continua para estos dos pasos, y el proceso posterior lleva consigo la repetición de estos, dos pasos. hasta que siendo los volúmenes demasiado pequeños para el trabajo en instalación continua sea preciso manejarlos por vía discontinua.

Extracción continua del caldo, directa.-El caldo, acetato de amilo y ácido fosfórico al 10 por 100, contenidos cada uno en un recipiente y a la temperatura de 3° C., son alimentados continuamente al tubo de extracción a baja presión y velocidad constante, sirviéndose de contadores de corriente, se agitan vigorosamente y pasan a una centrífuga. El tubo de extracción desempeña, pues, el papel de una bomba mezcladora en el trayecto que conduce a la centrífuga. Una porción pe-

queña del caldo se analiza, utilizando el ácido fosfórico al 10 por 100, a fin de conocer la cantidad de ácido por volumen de caldo que es preciso agregar para bajar el *pH* de este último a 2. Una vez esto conocido, se ajusta el contador de ácido con el contador de caldo en la debida relación. Los contadores de acetato de amilo y de caldo son ajustados de tal forma que la relación volumétrica de acetado a caldo sea igual a 0,4. La velocidad de corriente del caldo es aproximadamente de 25 a 30 litros por hora, así que el tiempo de contacto para la total extracción es de unos veinte segundos. De esta forma, la penicilina es rápidamente extraída por el acetato de amilo al *pH* crítico de 2. Desde el punto de vista del coeficiente real de distribución, solubilidad en agua y volatilidad de todos los disolventes estudiados, el acetato de amilo resultó ser el mejor. De unos datos recogidos de las publicaciones de F. C. Whitmore y colaboradores, del Pennsylvania State College, publicamos el cuadro siguiente de los coeficientes de distribución real de la penicilina G (1.650 unidades por mg.) a la temperatura de 0° C. y *pH* 2,5, entre agua y nueve disolventes. Se determinaron los coeficientes por dos métodos: el volumétrico, de titulación, y el de ensayo con *Staphylococcus aureus*. El de titulación se realiza pesando una muestra aproximadamente de 50 mg, de penicilina sódica y distribuyéndola entre una solución reguladora (ácido sulfúrico-sulfato ácido de potasio) con *pH* 2.5 y en cantidad de 30 centímetros cúbicos, y el disolvente orgánico en cantidad de tres centímetros cúbicos y a 0° C. A continuación, partes alícuotas de las dos capas se titulan con solución valorada de hidróxido sódico para determinar la cantidad de penicilina en cada capa. A la vez, se tomaron muestras para ensayos con los estafilococos. Los resultados concuerdan muy bien.

Coefficientes reales de distribución para la penicilina G a pH. 2,5 y 0° C.

Disolvente orgánico	Relación orgánica / Reguladora acuosa	
	Por titulación	<i>Staphylococcus aureus</i>
Acetato isopropílico	63/1	67/1
N. acetato butílico... ..	30/1	35/1
Acetato amílico	27/1	39/1
Cloroformo... ..	24/1	37/1
Eter etílico	14/1	14/1
Cloruro de etileno... ..	7,8/1	8,6/1
Eter diisopropílico	1/8,4	1/9,4
Tolueno	1/10	1/17
Tetracloruro de carbono... ..	1/30	1/66

Extracción continua por contracorriente. - Es relativamente bajo coeficiente efectivo. de distribución de la penicilina entre la disolución reguladora (pH -7) y el acetato de amilo impide las reducciones de gran volumen en la transferencia de la penicilina del acetato amílico a la solución reguladora, excepto que se hagan múltiples extracciones.

La reextracción discontinua es costosa y lleva mucho tiempo por lo cual se prefiere utilizar una torre continua de extracción en contracorriente. El extracto de acetato amílico fluye a presión constante al fondo de la torre. Simultáneamente, la solución reguladora (pH-7,4) entra, en la cantidad calculada, en la parte alta de la torre. La velocidad de los agitadores se ajusta en forma que la solución reguladora se esparce en finísimas gotas que descienden lentamente a través de la disolución de penicilina en el acetato amílico, continuamente ascendiendo. Hay seis obstáculos en la parte superior y dos en la parte inferior de la torre; los primeros recogen las gotas de la solución reguladora, que tienden a ser arrastradas por la corriente de acetato amílico; los inferiores facilitan la separación del extracto de la solución reguladora. La disolución de acetato amílico llega a la torre a velocidad de 10 a 15 litros por hora, y la de disolución reguladora, a la de dos a tres litros también por hora. Con estas velocidades de corriente hay una reducción de volumen del 15-20 por 100 del original y una recuperación de penicilina superior al 90 por 100. La eficacia del aparato de extracción se calcula con toda facilidad por la ecuación de Underwood para la extracción líquido-líquido, continua y en contracorriente. Sabido es que esta ecuación supone que los disolventes no son miscibles y que la constante de distribución no varía en el campo de las concentraciones que intervienen. Se aplica la ecuación a la extracción de la penicilina del acetato amílico por una solución reguladora.

$$\frac{X_n}{X_o} = \frac{E - 1}{EN + 1 - 1}$$

X_n = Concentración del refinado en unidades por centímetro cúbico.

X_o = Concentración de la solución alimentadora en unidades por centímetro cúbico.

E = Factor de extracción = SD/H .

S = Volumen de extractor (solución reguladora), en litros.

H = Volumen del alimentador (acetato amílico), en litros.

D = Coeficiente de distribución (solución reguladora/acetato amílico).

N = Número de pisos teóricos del extractor (generalmente = 1,66).

Generalmente, las dos fases de la extracción forman una unidad en la industria de extracción de la penicilina.

Efecto de los fosfatos sobre la estabilidad de la penicilina.-Son bien conocidos los problemas prácticos que presenta la inestabilidad de la penicilina en soluciones acuosas. Su importancia crece por la tendencia actual hacia la producción comercial y distribución de sales cristalinas de la penicilina G, desde que se sabe que, bajo condiciones comparables de almacenaje parecidas a las utilizadas clínicamente, soluciones preparadas de penicilina G cristalizada pierden su potencia antibacteriana más rápidamente que soluciones preparadas de sales de pureza algo inferior.

Los estudios de fermentación con diferentes estirpes de *Penicillium notatum*, señalaron que una positiva correlación, independiente de la acción reguladora, pudiera existir entre la concentración de K_2HPO_4 inicialmente presente en el líquido de cultivo y el mantenimiento de un relativamente alto grado de actividad antibacteriana en la penicilina bruta (filtrado libre de moho obtenido de los cultivos de *Penicillium*) producida en él. Y tal correlación existe lo mismo en las penicilinas crudas del cultivo superficial que en las del sumergido. Se había recomendado ya hace tiempo por diversos investigadores (Challinor, Mac Naughton, Dimond y Peltier) la conveniencia de emplear en los medios de cultivo altas concentraciones de fosfatos, con el fin de ayudar a retener la actividad de la penicilina bruta, pero el apoyo para esta recomendación lo fundamentaban en la gran capacidad reguladora de las soluciones de fosfato; es decir, se trataba de suministrar y mantener cierta concentración de iones hidrógeno, favorable al sostenimiento de la actividad antibacteriana en la penicilina, siendo los más favorables pH para ello entre 5,5 y 7. Experiencias recientes han mostrado, sin embargo, que si efectivamente la destrucción de la penicilina en soluciones acuosas esterilizadas aparece retardada por la adición de pequeñas cantidades de mezclas de sales fosfatadas, este efecto no depende, en su mayor parte, si es que depende algo, de la capacidad reguladora en iones hidrógeno de los fosfatos. Las experiencias comprobatorias de lo que venimos afirmando pueden realizarse en la siguiente forma: Soluciones acuosas de mezclas apropiadas de K_2HPO_4 y de $K_2H_2PO_4$, o bien de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 se diluyen con agua destilada esterilizada y se preparan soluciones acuosas estériles de penicilina sódica de material seco con potencia, aproximadamente, de 900 a 1.100 unidades por miligramo. Últimamente se utilizó por

Robertson Pratt, en los laboratorios Cutler, de California, penicilina sódica y potásica cristalina de gran pureza, de potencia superior a Ir500 unidades por miligramo. Las experiencias se preparan con concentraciones de fosfato, extendiéndose de cinco milimoles a cero milimoles (agua destilada) por litro, y la concentración inicial de penicilina, 6.240 unidades por centímetro cúbico. Las soluciones no conteniendo fosfato aparecen perdiendo el 50 por 100 de su potencia inicial en tres días, mientras aquellas conteniendo tan pequeña cantidad de fosfato como un milimol por litro pierden el 50 por 100 a los seis días. Diez días se precisaron para una pérdida equivalente en soluciones conteniendo cinco milimoles de fosfato por litro. No existe, por tanto, duda que las soluciones de fosfatos ejercen una acción protectora contra la pérdida de actividad.

Se estudió también la relación entre la concentración de fosfato por 100.000 unidades de penicilina y el efecto estabilizante del mismo a cada una de varias concentraciones molares. Se hicieron variar las concentraciones molares de fosfato desde cero a 0,005 milimoles, y las concentraciones de fosfato con relación a la penicilina, entre cero y 0,314 milimoles por 100.000 unidades. La concentración inicial de la penicilina variaba entre los límites 862 y 3.560 unidades por c. c. La mayor protección parece ser suministrada por una solución conteniendo 0,005 milimoles de fosfato por litro y 0,184 milimoles por 100.000 unidades. Y todas las numerosas experiencias llevadas a cabo coinciden en que la más favorable concentración de fosfato es esta de 0,005 milimoles, mientras la concentración más favorable con relación a unidades de penicilina varía ampliamente desde 0,0525 a 0,184 milimoles por 100.000 unidades de penicilina sódica o potásica. Una semejante acción protectora de los fosfatos sobre las soluciones de penicilina cálcica ha sido observada, y la concentración más favorable de fosfato para protección de esta sal de penicilina está probablemente en 0,005 milimoles, y la más favorable en relación a las unidades de penicilina, en las proximidades de 0,15 a 0,18 milimoles de fosfato por 100.000 unidades. Sin embargo, concentraciones de fosfato satisfactorias para un lote de penicilina cálcica pueden no serlo para otro, y esto se debe a que tal vez la naturaleza cualitativa o cuantitativa de las impurezas presentes sea muy importante en lo que se refiere a la efectividad del tratamiento con fosfato para determinado lote de sal cálcica. La tendencia a la formación de un precipitado blanco de fosfato cálcico se ha observado con ciertos lotes de penicilina cálcica, en tanto que

otros lotes se conservaban transparentes. A qué pueda atribuirse la acción protectora de los fosfatos sobre la penicilina no puede afirmarse de manera exacta en el momento presente; se abre aquí un amplio campo a la investigación. Tal vez sea debido a una esterificación de parte de la molécula, semejante a la señalada para gran número de otros compuestos de interés biológico por Kumler y Eiler, con el consiguiente bloqueo de un enzima comprometido en el proceso de destrucción. De las publicaciones del Laboratorio Cutter, de California, insertamos las tablas de las interesantes experiencias realizadas por Robertson Pratt sobre las pérdidas de potencia de las soluciones acuosas de penicilina sódica a los 50 grados centígrados y a 23 grados centígrados.

CUADRO A

TABLA I

Pérdida de potencia de las soluciones acuosas de penicilina sódica a 50° C.

Milimoles de fosfato por litro	Días requeridos para pérdida del 50% de potencia inicial cuando milimoles de fosfato por 100.000 unidades es igual a			
	0,085	0,184	0,314	0,0
5,0	3,1	3,4	2,7	—
2,5	1,9	2,1	1,6	—
1,0	0,9	2,0	1,6	—
0,5	0,6	0,7	0,6	—
0,1	0,6	—	—	—
0,0 (H ₂ O)	—	—	—	0,3

TABLA II

Pérdida de potencia de las soluciones acuosas de penicilina sódica a 23° C.

Milimoles de fosfato por litro	Días requeridos para pérdida del 25% de potencia inicial cuando milimoles de fosfatos por 100.000 unidades es igual a			
	0,085	0,184	0,314	0,0
5,0	12,2	18,6	12,2	—
2,5	10,7	16,2	10,7	—
1,0	10,9	10,9	10,9	—
0,0 (H ₂ O)	—	—	—	6,6

El arma, amarilla (cuando no pura) de defensa contra la muerte.- Todos conocen lo que es el moho, y así, se habla del pan mohoso y del queso mohoso; todos habrán visto alguna vez la vegetación verdosa que aparece sobre los alimentos cuando, durante tiempo suficiente, se los deja expuestos al aire en un lugar húmedo. En tales casos se elimina y arroja con disgusto, pero en la industria de fabricación de la penicilina sucede lo contrario: expertos científicos y numerosos obreros cultivan el moho, lo alimentan con lo que más le gusta, lo tienen al calor, lo protegen de daños y lo tratan con el mayor cariño, como a un huésped ilustre. En la industria del cultivo superficial, que hemos descrito, crece en frascos redondos de fondo plano, como los quesos holandeses, y lo hace en la parte alta de un caldo nutritivo constituido por azúcar y sales. No se cultiva cualquier moho viejo, sino una clase seleccionada especialmente de *Penicillium notatum*, y aun esta clase no se cultiva por sí misma, sino por lo que excreta en el caldo. Al moho se le separa después, y del caldo se extrae la penicilina, el más poderoso y seguro, hasta ahora, de los medicamentos conocidos, para el tratamiento de infecciones de bacterias y gérmenes. Nada sería suficiente para pagar los enormes servicios que en la pasada guerra la penicilina prestó combatiendo la gangrena mortal, propensa siempre a presentarse en las heridas de guerra. El efecto sobre pacientes que sufren enfermedades crónicas en los huesos es casi milagroso, pues enfermos llevando años en el hospital han podido levantarse y salir después de varias semanas de tratamiento. En las infecciones de la sangre, pulmonía y meningitis ha logrado grandes éxitos.

Breve historia del descubrimiento de la penicilina.- Hay que retroceder al año 1929 para situarnos al comienzo del descubrimiento de la penicilina. El personaje de la historia es una pequeña espora de moho que llegó por una ventana abierta del hospital de Santa María, de Paddington, en Londres, sin que se la invitara, y se llegó a una placa o cubeta de cultivo en la que el profesor Fleming, el bacteriólogo del hospital, cultivaba algunos estafilococos -es decir, las bacterias productoras de forúnculos, carbunco, infecciones crónicas de los huesos y algunas veces el envenenamiento mortal de la sangre-. Al depositarse sobre el medio de cultivo comenzó a crecer, y, a medida que crecía, excretaba algo que ocasionaba la muerte de las bacterias y las mantenía a respetable distancia. Entre la colonia de millones de bacterias que se desarrollaban, con el aspecto de una película lechosa, sobre el vidrio y la mancha creciente de moho verde, aparecía un halo claro.

Parece, a primera vista, que fué la fortuna la que favoreció al profesor Fleming y que éste, en realidad, tomó bien pequeña parte en el descubrimiento. Nada más lejos de la realidad; cualquier otro, sin las facultades de gran observador que él tenía y sus vastos conocimientos en el campo de los cultivos bacteriológicos, habría ciertamente tirado el cultivo contaminado, sin interesarse por él, como lo hizo Fleming, de manera extraordinaria. Utilizó un alambre de platino y, esterilizándolo al rojo en la llama de un mechero Bunsen, tomó unos esporos del moho y los hizo desarrollarse en un caldo nutritivo contenido en un tubo de ensayo. A medida que el moho crecía producía en el caldo una sustancia que el profesor designó "penicilina", derivado del nombre del moho, que ya dijimos había sido identificado como *Penicillium notatum*. Las experiencias realizadas sobre placas de ensayo demostraron que esta sustancia evitaba el crecimiento de determinadas bacterias.

Hasta aquí, el primer capítulo de la historia. Hay que dejar pasar diez años. Sugirió Fleming, pero nadie creyó entonces pudiera ser posible, desinfectar la misma corriente sanguínea sin perjudicar al paciente, y la extraordinaria labilidad de la solución de penicilina determinó que los primeros intentos para su aislamiento y purificación fallaran. Por ello, se emplearon solamente los extractos crudos para la separación de las bacterias insensibles de las sensibles en los cultivos mixtos. En 1939 el profesor Florey y el doctor Chain, de Oxford, iniciaron sus trabajos para el aislamiento y purificación de la penicilina, y, ayudados por un equipo de químicos, bacteriólogos, experimentadores y clínicos, después de un año de experiencias muy duras, y en muchos momentos desoladoras, obtuvieron un polvo amarillento de extraordinaria actividad, que creyeron era penicilina pura.

La mayor parte de nosotros hemos oído hablar de la historia dramática de las primeras experiencias satisfactorias con este nuevo medicamento; de cuántos pacientes, a las puertas de la muerte después de haber fracasado todos los demás medios, fueron arrancados de aquélla por la penicilina; con cuántas increíbles dificultades había que producir la penicilina; de cómo el profesor Florey y el doctor Heatley, principales descubridores de la técnica de extracción de la penicilina. Llegaron en avión a América con algo del moho para ayudar a fabricar el medicamento, toda vez que estando Inglaterra en aquellos momentos en una lucha muy intensa con sus enemigos, no existía posibilidad de que ninguna industria inglesa de productos químicos emprendiera la

fabricación en gran escala de penicilina. El rendimiento del moho era tan escaso que había que cultivar enormes cantidades de él para tener lo suficiente para un solo caso. Fué menester en muchas ocasiones, en la cura de enfermos, suspender el tratamiento a su mitad, por no disponer de producto, con la consiguiente muerte de pacientes que acusaban los mejores signos de recuperación. Esta fase ya se ha vencido, y en diferentes instalaciones, especialmente de Inglaterra, Estados Unidos y Canadá, se lleva a cabo la fabricación de penicilina en escala industrial. Aquella lamentación de un científico inglés, al visitar un museo donde existía una colección magnífica de mohos: "¡No sé para qué los hizo Dios!", ya no tendría sentido en la actualidad, después que la pequeña espora de *Penicillium notatum* saltó por la ventana del Hospital de Santa María para revolucionar la ciencia médica. Sin embargo, existe aún, ésta es nuestra opinión, un capítulo que escribir en la historia de la penicilina; es menester llegar a la producción ilimitada del medicamento, y esto no se logrará mientras no se sepa producirla sintéticamente; las grandes esperanzas que, con razón, en ella se han despertado hay que evitar se conviertan en desánimo si los pacientes, cuando la necesiten, no logran encontrarla. Hay que luchar, por tanto, por la producción en escala industrial de penicilina sintética. La pequeña espora ya hizo cuanto pudo; ahora, los investigadores deben unirse en la batalla de lograr industrialmente, por síntesis, obtener esta arma, empleada en cantidad tan pequeña y sin embargo en sus efectos tan grande, de defensa contra la muerte.

La dinámica de la acción bactericida de la penicilina y la significación terapéutica del nivel de penicilina en la sangre.- Las cantidades en que los estreptococos, neumococos, estafilococos, etc., son matados por la penicilina *in vitro* varían notablemente dentro de un reducido espacio de concentraciones de penicilina. Así, en el caso del C-203, raza de *Streptococcus* y *Pyogenos*, una concentración de 0,006 microgramos por centímetro cúbico tiene una definida, aun cuando baja, acción bactericida; mientras una proporción máxima de muertes se alcanza a 0,064 microgramos por centímetro cúbico. Por encima de este nivel, un incremento en la concentración de penicilina ocho mil veces superior, hasta 512 microgramos por centímetro cúbico, no tiene ningún efecto significativo sobre la cantidad de los organismos que mueren *in vitro*. Estos dos valores, la mínima concentración a la cual los organismos son matados, y la concentración a la cual la cantidad de muertes es máxima, comprende aparentemente el espacio útil, terapéuticamente,

de concentraciones de penicilina. Más altos niveles, aplicados al foco de infección, representan grandes pérdidas de penicilina, y más bajos niveles tienen muy poco, si es que tienen alguno, efecto terapéutico. El mantenimiento del máximo nivel efectivo en el sitio de la infección constituye el mejor uso de la penicilina, y la serie de inyecciones debe ser ajustada a asegurar la permanencia de este nivel en los tejidos líquidos. Si el nivel sanguíneo es permitido caer por bajo del nivel óptimo, la proporción a la cual los organismos son matados decrece correspondientemente; y si el nivel es permitido caer por bajo de la concentración efectiva mínima, los organismos pueden multiplicarse suficientemente en el espacio entre inyecciones para afectar al éxito del tratamiento. La proporción a la cual los organismos se multiplican *in vivo* es de manifiesta significación en este sentido. Así, si es demasiado largo el espacio entre inyecciones, resulta un perjuicio mucho mayor en las infecciones neumocócicas de ratones blancos que en la sífilis experimental de conejos. El efecto del método de administración sobre la eficacia terapéutica de la penicilina en infecciones experimentales es cuantitativamente consistente con el mecanismo de acción de la penicilina que acabamos de bosquejar. Uno anticiparía, a la vista de las consideraciones anteriores, que una sola inyección grande de penicilina en solución acuosa sería relativamente ineficaz. Desde que hay un nivel óptimo de penicilina más allá del cual un ulterior incremento no afecta a la proporción de acción bactericida, la única ventaja de la inyección grande es el tiempo prolongado durante el cual aquellos niveles efectivos son mantenidos; y en este respecto, dosis pequeñas repetidas de penicilina son mucho más económicas que unas pocas inyecciones grandes. Así, por ejemplo, la dosis total curativa de penicilina en sífilis experimental con una sola inyección fué mayor que 300.000 unidades por kilogramo de peso del animal; con ocho inyecciones a intervalos de cuatro horas, bastan 80.000 unidades por kilo; y con 50 inyecciones a cuatro horas de intervalo, un total de solamente 360 unidades por kilo son necesarias. Semejantemente, en infecciones neumocócicas de ratones blancos la dosis curativa en una inyección de penicilina G fué de 113 miligramos por kilo; en cuatro inyecciones a una hora de intervalo, de 6,8 miligramos por kilo; y con diez inyecciones, también espaciadas una hora, de 1,18 miligramos por kilo. La dosis curativa de penicilina en la sífilis experimental, en conejos, se ha determinado por Harry Eagle en el laboratorio de terapéutica experimental del servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, primero en diferentes tratamien-

tos, empleando penicilina en solución acuosa y después con una suspensión de penicilina en cera de abejas o aceite de cacahuet. En cada caso, la dosis curativa se ha encontrado de acuerdo con la tesis, que la acción terapéutica de la penicilina está primariamente determinada por la longitud del tiempo que ella permanece a niveles efectivos en los tejidos. En infecciones experimentales de ratones y conejos, el tiempo mínimo que el organismo debe ser expuesto a niveles efectivos de penicilina, en orden a efectuar la cura, ha sido encontrado; varía con el tamaño del inoculado, edad de la infección y proporción a la cual el organismo en ensayo es matado por la penicilina.

Efecto inhibitorio del 4' carboxifenilmetasulfonanilida sobre las pérdidas de penicilina, por eliminación renal.- Una de las más grandes desventajas de la penicilina como agente terapéutico es la rapidez con la cual el riñón, humano y animal, excreta la droga desde el plasma dentro de la orina. A causa de ello, dosis relativamente grandes deben ser suministradas al paciente cada pocas horas si se quiere mantener una concentración apreciable en el plasma. Para obtener más altas concentraciones de penicilina en el plasma mucho. más grandes cantidades son requeridas. El ácido para-amino-hipúrico aplicado simultáneamente con la penicilina se utilizó mucho para disminuir la excreción urinaria del medicamento, pero tenía el inconveniente de que debía el suministrado en grandes cantidades por continua infusión intravenosa. El compuesto 4'carboxifenilmetanosulfonanilida, llamado corrientemente *caronamida*, manifiesta Beyer ser un agente utilísimo en el decrecimiento de la excreción urinaria de la penicilina. Diferente al ácido para-amino-hipúrico, que contiene con la penicilina sobre la base de acción de masa en el mecanismo de transporte de aquella del epitelio tubular renal, la caronamida no aparece ser excretada por los tubitos renales y, por tanto, se cree suprime la eliminación de penicilina bloqueando el sistema de un específico enzima responsable del transporte de la misma a través de las celdillas tubulares. A causa de que la eliminación tubular no es aparentemente un factor en la excreción de la caronamiela, permanece ésta en la sangre un período de tiempo mucho más largo que el ácido para-amino-hipúrico. Por tanto, es posible administrar intermitentemente la caronamida con el fin de reducir la excreción de la penicilina. Para este propósito, la administración por vía bucal de la caronamida es efectiva. puesto que es rápidamente absorbida desde la región gastrointestinal. Los experimentos farmacológicos de Beyer demostraron que la administración intravenosa o bucal de caronamida su-

primaría la excreción tubular de penicilina cuando este agente antibiótico fuere también suministrado por vía intravenosa o bucal. Aunque estos experimentos claramente indican que una mayor actividad terapéutica pudiera ser esperada, el incremento actual en el efecto bacteriostático *in vivo*, producido por las prolongadas concentraciones de penicilina en el plasma, no queda determinado por esta clase de experimentos, que Beyer llevó a cabo usando perros. Fué, por tanto, considerado deseable realizar experimentos en los cuales a los animales se les infeccionaría con dosis mortales de microorganismos y se tratarían después con cantidades crecientes de penicilina, tanto sola como con caronamida. El número de supervivientes en los grupos de animales que habían recibido varias dosis de penicilina, con y sin la caronamida, nos ofrecía un medio de calcular la equivalencia en dosis bacteriostática de la penicilina sola y la penicilina con el medicamento. La relación de estos equivalentes en dosis de penicilina pudiera más tarde ser utilizada como una estimación de la ventaja bacteriostática *in vivo*, derivada de la supresión de la excreción de penicilina a causa de la administración de la caronamida. Realizados numerosos experimentos en esta forma, se llegó a la siguiente conclusión: que la acción bacteriostática *in vivo* puede ser lograda a mucha más baja dosis de penicilina si se combina este tratamiento con la administración bucal de caronamida. En adición a esto puede señalarse: que la administración de caronamida ocasiona niveles más altos de penicilina en el plasma del ratón, así como la permanencia en él más largo tiempo que cuando la misma cantidad de penicilina es administrada sola. Que la explicación de este efecto de la caronamida está en la supresión de la excreción tubular de la penicilina. Desde que la caronamida por sí propia no tiene acción bacteriostática comprobada y no causa cualquier subida de valor de la acción bacteriostática *in vivo* de la penicilina, no puede ser admitido que actúe sinérgicamente con este agente antibiótico. Se cree, por tanto, que la creciente efectividad de la penicilina administrada intramuscularmente resulta de la influencia de la caronamida sobre la duración y aumento de concentración de penicilina en el plasma y tejidos. Por tanto, la administración bucal del 4-carboxifenilmetanosulfonilida aumenta considerablemente la efectividad terapéutica de la penicilina administrada intramuscularmente a ratones infectados experimentalmente, ya con neumococos ya con *E. typhosa* (del grupo de bacterias de la tifoidea). El aumento fué de 6 a 16 veces en el caso del neumococos, y aproxima-

damente cuatro veces para el *E. typhosa*. Estos efectos pueden explicarse sobre la base de una más alta y prolongada concentración de penicilina en el plasma cuando la caronamida es administrada, y que no existe sinergia entre la caronamida y la penicilina. Este incremento en la concentración de penicilina en el plasma y decrecimiento de la excreción tubular tiene lugar para las cuatro clases de penicilina, y su modo de acción, la detención del mecanismo de transporte tubular en la excreción de penicilina. Como resumen de cuanto venimos exponiendo, señalamos que la caronamida proporcionará una considerable ventaja terapéutica en el uso de la penicilina, y que muy pronto ésta irá asociada con el empleo como auxiliar de aquélla. Recordaremos que la eliminación renal de la penicilina se efectúa a la vez por filtración glomerular y excreción tubular, y que las dos se combinan para dar lugar al serio inconveniente de su rápida eliminación por la orina. En el hombre se estima que el 20 por 100 del desagüe renal del plasma es filtrado por los glomérulos y, por tanto, el 80 por 100 de eliminación renal de la penicilina se efectúa por excreción tubular. Si conseguimos altas concentraciones en el plasma de determinadas sustancias, bastaría ello para reducir la excreción tubular de la penicilina, pues siendo estas sustancias excretadas por el mismo mecanismo de transporte tubular que la penicilina, intervendría la acción de masa, consiguiendo el efecto deseado. Este principio ya hemos indicado se aplicó en la práctica -caso del ácido para-amino-hipúrico-, pero ya señalamos los graves inconvenientes, desde un punto de vista práctico, de tener necesidad de emplear grandes cantidades del medicamento y su administración intravenosa. Entre las fórmulas estructurales de la caronamida y de la penicilina G hay, en apariencia, una cierta semejanza; no obstante, no debe fundamentarse en ella la importancia de la caronamida como auxiliar de la penicilina, pues aquélla inhibe la eliminación renal de otros tipos de penicilina, aun a más grande extensión que lo hace con la G, y, de otra parte, está demostrado que la caronamida inhibe asimismo la eliminación renal del ácido para-amino-hipúrico y de otras sustancias que no tienen estructuralmente relación alguna con ella. De antiguo se había estudiado el efecto de la caronamida sobre la actividad bacteriostática del sulfatiazol, interesante porque, como se sabe, en la clínica práctica, a veces son combinadas las terapéuticas de la penicilina y sulfonamida. Experiencias realizadas en el Departamento de Farmacología y Bacteriología de la División de investigación médica, Sharp and Dohme, Inc., utilizando como germen suspensiones diluidas de

Escherichia coli, en tubos de ensayo conteniendo un medio sintético con cantidad constante de caronamida y variables de sulfatiazol, para medir después de la incubación el crecimiento, por estimación de la densidad turbidométrica, mostraron que la caronamida tiene un débil efecto antagónico sobre la actividad bacteriostática del sulfatiazol, poniendo los cálculos de manifiesto sería preciso utilizar 1.000 miligramos de caronamida para antagonizar la acción de un miligramo de sulfatiazol. Esta cantidad (un miligramo) de sulfatiazol fué antagonizada por solamente 0,3 miligramos de para-amino-benzoato bajo las mismas condiciones. La inhibición de actividad de la sulfonamida causada por la caronamida es, por tanto, de pequeña significación práctica.

Carácter variable de la penicilina comercial.- Durante la guerra no se ha dado a conocer la información química respecto a la penicilina. La constitución química del medicamento apareció por primera vez. en la comunicación publicada en colaboración, en diciembre de 1945, por el Colegio Inglés y el Comité americano, ambos de investigaciones médicas, y en ella se suministraban datos relacionados con la existencia de cuatro tipos diferentes de este antibiótico. Ya indicamos que todos ellos son compuestos químicos que se distinguen uno de otro por los grupos laterales, unidos a una estructura nuclear común. Desde el primer momento se observó que las penicilinas de los diversos fabricantes diferían en las proporciones relativas de fracciones G, X, F y K; que la de un mismo fabricante podía también diferir a este respecto de tiempo en tiempo, y de que en realidad se presentaban cambios considerables en las proporciones relativas de estas especies presentes en la penicilina comercial, probablemente como, un fenómeno gradual, durante 1944. Anteriormente a esta fecha, la penicilina comercial era predominantemente penicilina G, o una mezcla de G y F. Después disminuyó considerablemente en el producto, de la mayor parte de los fabricantes, el contenido en G, aumentando relativamente las fracciones F y K, especialmente la última. Estos cambios en el contenido relativo de las especies de penicilina han tenido lugar por el empleo en la producción comercial de varias clases de *penicillium*, *notatum* o *penicillium chrysoqenum*, y también a causa de las distintas técnicas empleadas en el crecimiento del moho y purificación del producto final. Pero además de este cambio en el contenido relativo de fracciones de penicilina, también ha existido otro en el carácter de la misma, en el sentido de aumentar su pureza. Todos los industriales han prestado gran atención en la fabricación de penicilina a aumentar su pureza en unidades por

miligramo, con una correspondiente disminución en la cantidad de impurezas presentes. La penicilina de que se disponía al principio tenía una potencia aproximada de 200 unidades por miligramo, y ha ido aumentando hasta llegar al nivel actual de 900 a 1.400 unidades por miligramo. Dunham y Rake, entre tanto, habían indicado que la penicilina comercial de que se disponía contenía impurezas, de las que algunas poseían propiedades treponemicidas, y sugirieron que cuanto menos pura, dentro de ciertos límites, fuese la penicilina en unidades por miligramo, más eficaz resultaría en la profilaxis de la sífilis en los animales de experimentación. De la misma manera, Lewis había mostrado que la penicilina impura tenía un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las células del sarcoma en cultivos de tejidos, mientras que no era apreciable tal efecto con productos mucho más puros. Hobby advirtió a su vez que las penicilinas de baja potencia en unidades por miligramo son aparentemente más eficaces en las infecciones estreptocócicas de ratones que los productos más puros. Estos estudios sugieren, mucho más que prueban, que las impurezas que permanecen en la penicilina comercial, prescindiendo de la actividad atribuible a la penicilina, pueden, por sí mismas, ser terapéuticamente eficaces. En la actualidad comienza a aparecer información señalando que las distintas especies moleculares de penicilina varían de modo notable, y que no puede predecirse nada respecto a su actividad *in vitro* frente a una variedad de bacterias, deduciéndose de ello que en ciertas infecciones la actividad *in vitro* no puede ser una medida adecuada de la actividad *in vivo*. Resulta conveniente indicar que la potencia de la penicilina se expresa en números de su actividad *in vitro* frente a una clase especial de prueba de *staphylococcus aureus*, así como que los estudios de absorción y excreción se realizan por medio de ensayos biológicos frente a una variedad de organismos, generalmente el *Staphylococcus aureus* o el *sireptococcus pyolgenes*, y que hasta el momento actual estos dos orígenes de información se han relacionado con la actividad posible de la penicilina frente a otros organismos patógenos; por ejemplo, el *treponema pallidum*, y que de esto no es posible deducir consecuencias precisas.

En febrero de 1946 tuvo lugar en Washington una conferencia de investigadores dedicados a estudiar el efecto de la penicilina en la sífilis. La actividad relativa, en la sífilis experimental de los conejillos, de las penicilinas G, F, X y K, se sometió a una organizada investigación en diversos laboratorios. Se utilizaron penicilinas G y X cris-

talinas puras, y preparaciones impuras de F y K. Los conejos se infectaron con la clase Nichols de *treponema pallidum*, y se trataron seis semanas después de la inoculación, siguiendo un plan consistente en 24 inyecciones intramusculares dadas a intervalos de cuatro horas durante cuatro días. Cada fracción se comprobó estaba en el dominio 500-16.000 unidades por kilo de animal ensayado. En la semana siguiente a la conferencia llegó una información perturbadora. Uno de los investigadores, Chesney, que había estudiado por el método descrito la penicilina K, comunicaba que en su laboratorio las recaídas clínicas habían comenzado a aparecer, a los dos o tres meses de tratamiento, en un número notable de los conejos tratados con todos los tipos de dosados, incluso con la máxima dosis: 16.000 unidades por kilogramo de peso del animal. y análogamente se mani festaba a los pocos días su compañero Mahoney, que trabajaba en otro laboratorio igualmente con penicilina K. Mientras tanto, los laboratorios en que investigaban Earley, Fleming y Mahoney informaban que la dosis C. D. 50 de penicilina comercial (dosis requerida para curar el 50 por 100 de los animales tratados), empleada con un sistema de tratamiento casi idéntico al seguido con las penicilinas puras, estaba en el orden de 1.500 a 2.000 unidades por kilogramo de peso del animal. Fleming W. L., a quien se había encomendado el estudio de la penicilina G, informó también que las dosis C. D. 50 y C. D. 95 de G se aproximaban mucho a la de la penicilina comercial fabricada hacía dos años. Parecía, por tanto, que había, por lo menos, una diferencia décuple entre la actividad de la penicilina G y la de la K *in vivo*, y que las últimas especies de penicilina eran por lo menos relativamente ineficaces en la sífilis de los conejillos. No transcurrió mucho tiempo sin que Shaffer, de Detroit, indicara que en una sífilis temprana de hombre era menos eficaz un plan de tratamiento, comprendiendo la administración de 2,4 millones de unidades de penicilina comercial en quince días (enfermos tratados después de diciembre de 1944) que otro de 1,2 millones de unidades (la mitad) dados en la mitad de tiempo, siete y medio días (la mayor parte de éstos tratados antes de diciembre de 1944). En cada uno de los planes seguidos por Shaffer, la penicilina sódica se administró por vía intramuscular en disolución acuosa o de suero, cada tres horas, día y noche, durante el tiempo total especificado. Estos dos orígenes de información exigían un examen inmediato de los resultados obtenidos en el Hospital de Hopkins con 2,4 millones de unidades de penicilina comercial en quince días. Los resultados en 64 pacientes, con sífilis tem-

prana, tratados mediante este plan durante el período noviembre de 1944 a julio de 1945, se compararon con los de 106 pacientes escogidos al azar entre el material existente en toda la nación, y que fueron tratados con 1,2 millones de unidades en siete días y medio, entre junio de 1943 y marzo de 1944. Aunque el plan de 2,4 millones de unidades en quince días resultaba favorecido, por haber sido seguido un tiempo más corto que el de 1,2 millones de unidades durante siete días y medio, los resultados fueron mucho más pobres con el primero, tanto con respecto a la recaída como con relación a la serorresistencia. También la marcha de las curvas de respuesta serológica de las dos series indicaban que 2,4 millones de unidades en quince días daban resultados menos satisfactorios que la mitad de dosis en la mitad de tiempo. Además de contrastar esta paradoja quimioterápica la central de estadística de la Escuela de Higiene y Salud Pública de Hopkins, determinó sobre una amplia base nacional, y en una escala mucho mayor, la cantidad acumulada de recaídas y la cantidad acumulada de seronegatividad en 1.280 pacientes con sífilis temprana tratados con un plan idéntico (1,2 millones de penicilina comercial en siete días y medio), en tres períodos: *a*) Desde junio de 1943 a mayo de 1944; *b*) Desde mayo a octubre de 1944; y *e*) De noviembre de 1944 a febrero de 1946. En los pacientes tratados antes de mayo de 1944, la cantidad de recaídas fué notablemente menor, y la proporción de pacientes llegando a ser seronegativos, notablemente superior a la de los pacientes tratados desde esta fecha. Los resultados químicos, menos satisfactorios, obtenidos en la sífilis temprana desde mayo de 1944 sugirieron varias consideraciones:

1.^a Se ha producido un cambio repentino en la biología de la infección sífilítica, hipótesis que parece muy improbable.

2.^a Se ha desarrollado una raza de *T. pallidum* resistente a la penicilina. También parece improbable, puesto que la resistencia a la penicilina, lo mismo que la resistencia al arsénico-bismuto, no ha sido comprobada de modo convincente en ninguna de las clínicas colaboradoras de los Estados Unidos; y

3.^a Ha habido un cambio en el carácter de la penicilina comercial. Actualmente se sabe con toda certeza que es esto último lo ocurrido. El cambio ha tenido lugar en dos sentidos: *a*) Un cambio en las cantidades relativas de especies de penicilina con una probable disminución sustancial de la cantidad de penicilina G, y un igual aumento compensador en las cantidades de penicilina F y K, especialmente de

la última, presentes en la penicilina comercial; y *b*) El aumento de pureza de la penicilina en unidades por miligramo y la correspondiente disminución de impurezas, probablemente activas terapéuticamente. La demostración por Chesney y Mahoney de la ineficacia de la penicilina K en la sífilis experimental de los conejillos ha estimulado otros estudios inmediatos sobre el comportamiento farmacológico de distintas penicilinas en el cuerpo. Todos estos estudios han sido realizados por los investigadores de mayor fama en Inglaterra y en los Estados Unidos y concuerdan al indicar que la penicilina K da niveles de sangre mucho menores y mucho menos sostenidos que las otras tres penicilinas: G, F o X. También están de acuerdo en señalar, sobre la base de la cantidad de penicilina recuperable en la orina, que la penicilina K, en contraste con las otras tres, se destruye mucho en el cuerpo. De otra parte, conforme con estas observaciones, Eagie y Muselman han indicado que la penicilina K es 1/6 a 1/15 tan eficaz en las infecciones neumocócicas y estreptocócicas de los ratones como las penicilinas G, F y X; y Hobby, empleando una preparación diferente y un método distinto de administración, ha encontrado que K es la mitad de activa que G en el tratamiento de las infecciones estreptocócicas de los ratones. Parece pues inmediata la conclusión de que ciertas especies comerciales de penicilina producidas en los últimos meses son menos eficaces para el tratamiento de la sífilis que lo eran las preparaciones de que se disponía hace dos años. Es probable que algunos de los efectos terapéuticos disminuidos sean debidos al aumento en penicilina K de las preparaciones comerciales de muchos fabricantes. La existencia de otros factores, tales como la disminución de la cantidad de impurezas, probablemente activas terapéuticamente, debe también ser considerada. La influencia de estos factores está actualmente en estudio en varios laboratorios de Inglaterra y Estados Unidos.

En resumen, la penicilina comercial no es una sustancia sencilla sino una mezcla de varias. Por lo menos, se han identificado cuatro especies diferentes de penicilina que químicamente difieren en las cadenas laterales, unidas a la estructura nuclear básica: son las penicilinas G, X, F y K.

En una misma industria puede variar, de tiempo en tiempo, el contenido relativo de G, X, F y K en la penicilina fabricada. En los últimos tiempos, algunas penicilinas comerciales contienen una proporción sustancial de penicilina K.

La penicilina K es relativamente ineficaz en el tratamiento de va-

rias infecciones, según se ha comprobado experimentalmente. La ineficacia parece ser debida al hecho de su destrucción rápida en el cuerpo. La penicilina comercial sufrió también un cambio en el sentido de aumentar la pureza (en unidades por miligramo) con una disminución consiguiente de impurezas que probablemente pueden poseer actividad terapéutica.

Hemos creído oportuno llamar la atención sobre extremo tan interesante, para hacer ver cómo las industrias en que se prepare la penicilina deben cooperar en los trabajos de investigación para corregir los muchos inconvenientes que en la actualidad se encuentran todavía en la fabricación del producto comercial.

Métodos de ensayo de la penicilina.,-En todos los métodos bacteriológicos de ensayo lo desconocido debe compararse con un tipo; las variaciones en la naturaleza de los constituyentes del medio, las pequeñas diferencias en los detalles de manejo o técnica y otros factores pueden tener influencia considerable sobre los resultados. Los familiarizados con los ensayos de penicilina saben que se encuentran frecuentemente diferencias en los resultados obtenidos a partir de una misma muestra, incluso en el mismo laboratorio. Sometiendo al tipo exactamente al mismo tratamiento que el problema, los factores variables afectan generalmente lo mismo y con la misma amplitud a uno que a otro. Debe tenerse siempre el mayor cuidado en la pesada y medida de las muestras tipo y problema y en sus diluciones. Dada la gran actividad de la penicilina frente a los organismos de prueba, la comparación hay que realizarla a diluciones muy elevadas. En el método de dilución en serie se comparan, tipo y problema, a una concentración aproximada de 0,5 unidades por centímetro cúbico, aproximadamente equivalente a 0,0003 miligramos de penicilina por centímetro cúbico. Si, por ejemplo, el problema es una solución conteniendo 20.00.0 unidades por centímetro cúbico, se ensayará a una dilución de uno en cuarenta mil, lo que indica que pequeños errores en la medida ocasionarán grandes errores en los resultados, Si en vez de este método de dilución en serie se utiliza el de placa cilíndrica, la dilución puede ser todavía mayor, aumentando las probabilidades de error.

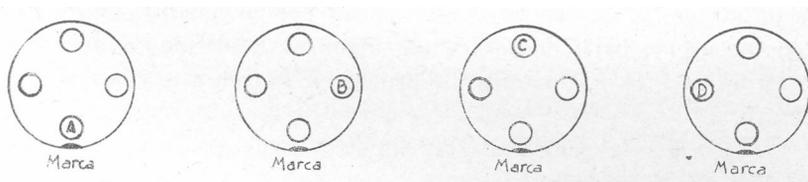
El principio del método de dilución en serie consiste en la comparación de los volúmenes de disolución problema y de una disolución tipo de penicilina que justamente inhiba el crecimiento de un cultivo de caldo de una clase conveniente de estafilococos, generalmente el *staphylococcus aureus*. El caldo debe permitir diferenciar entre cantidades de

penicilina que varíen en no más de un 10 por 100. Se preparan dos soluciones: a) Una disolución tipo de penicilina que contenga cinco unidades por centímetro cúbico; y b) Una disolución esterilizada de la muestra que va a probarse a concentración que permita esperar contenga aproximadamente la misma proporción de penicilina. El disolvente para cada solución será una solución reguladora esterilizada de fosfato a un pH 7. Las soluciones se diluyen con caldo esterilizado hasta una concentración de 0,5 unidades por centímetro cúbico, añadiendo cantidades crecientes de cada una a las dos series de tubos que contienen caldo esterilizado, una serie para el problema y otra para el tipo. Cada tubo puede contener 20 centímetros cúbicos de caldo esterilizado y volúmenes convenientes, de las diluciones con caldo; de las soluciones tipo y problema se agregan por veces en cantidad de 0,1 centímetro cúbico hasta un total de 0,8 a 1,5 c. c. El volumen final de 20 c. c. se forma teniendo en cuenta la cantidad particular de dilución de caldo que se le añade. Los tubos se inoculan con un cultivo de *Staphylococcus aureus* y se incuban a 37° C. durante quince a dieciocho horas. Se examinan y comparan los grados de dilución en los tubos que denotan el crecimiento mínimo, lo que indica la presencia de un ligero depósito que desde el fondo se levanta cuando los tubos se sacuden. Si el método se aplica a una disolución de penicilina de concentración completamente desconocida hay que hacer una prueba preliminar sustancialmente en la misma forma que se ha indicado al determinar las diluciones que son necesarias para obtener una disolución de 0,5 unidades por centímetro cúbico aproximadamente.

En el método de la placa cilíndrica necesita disponerse de un gran número de placas Petri, todas del mismo diámetro y de fondo plano. La composición del medio tiene un importante efecto sobre la nitidez de la circunferencia del anillo. El medio puede prepararse a partir de agar, cloruro sódico, peptona y agua, en proporciones convenientes, se ajusta a un pH 6,8-7, filtrándolo y después vertiéndolo en frascos convenientemente tapados con algodón en rama esterilizado, que se almacenan en un refrigerador hasta que sea preciso utilizarlos.

Siembra de las placas.-El organismo de prueba es el *Staphylococcus aureus*, generalmente la dase H de Oxford, núm. 6.571 de la colección nacional de cultivos, si bien actualmente suelen los distintos laboratorios emplear sus propias estirpes. Se conserva la clase principal en caldos ordinarios nutritivos de agar, haciéndose el menor número posible de subcultivos. Las placas se llenan previamente hasta una

altura de 3 a 5 milímetros y se siembran con los organismos de prueba, vertiendo sobre la superficie de la placa de agar ya preparada, utilizando la pipeta Pasteur, tres centímetros cúbicos de un cultivo de caldo del organismo incubado durante dieciséis a veinticuatro horas. Se balancean convenientemente las placas hasta obtener una distribución uniforme y completa, se las filtra y se secan después durante una a dos horas, a 37°C., en un incubador, quitando las tapas o reemplazándolas por una cubierta porosa. Las placas así preparadas son almacenadas durante unos días en un refrigerador. Las placas, una vez vertido el caldo y balanceadas para obtener una distribución uniforme, se colocan algo inclinadas con el fin de lograr la acumulación, en una zona pequeña del borde, del caldo sobrante, pudiendo de tal forma aspirarlo con una pipeta estéril y después se marca el lado por donde se aspiró el inoculado, ya que en él la zona de inhibición es propensa a variaciones que no sirven para predecir nada. Para evitar este efecto, si hay en cada placa cuatro cilindritos A, B, C y D y se emplean por cada muestra cuatro placas, deben colocarse los cilindritos de la muestra en rotación con respecto a la marca de cada una de las placas. En la primera placa se coloca en el cilindro A una dilución particular del problema; en la placa segunda, en el cilindro B, y así sucesivamente.



Dimensiones de los cilindros.-Los cilindros son de vidrio, porcelana o aluminio; tienen una altura de 8-10 milímetros aproximadamente y un diámetro interno de 5 milímetros. El borde inferior del cilindro está biselado suavemente hacia el interior, y así, cortando la superficie del agar, se logra un cierre perfecto entre cilindro y agar; los cilindros deben calentarse ligeramente antes de emplearlos, con la finalidad de que el calor sea suficiente para romper la superficie del agar; no conviene que el cilindro penetre demasiado, pues podrían formarse falsamente pequeños cilindros de inhibición.

Así quedan las placas preparadas para recibir las disoluciones de prueba: la muestra que va a examinarse se diluye con solución reguladora de fosfato 0,1 M, de pH 7, hasta concentraciones aproximadamente de 0,5, 1, 1,5 y 2 unidades por centímetro cúbico, y con el

mismo disolvente se prepara también una disolución tipo de potencia comparable. Estas diluciones dan diámetros satisfactorios del anillo. La disolución reguladora de fosfato no necesita estar esterilizada ni tampoco las disoluciones de prueba, toda vez que las bacterias o células que el líquido pueda llevar quedan retenidas en el cilindro; sin embargo, no es aconsejable una gran contaminación, pues si las bacterias son destructoras de la penicilina, ésta se iría inactivando en el transcurso del ensayo. Por medio de una pipeta Pasteur se pasan las disoluciones a los cilindros, cuidando de evitar la formación de burbujas de aire en la cubeta, lo que daría lugar a la no difusión de la penicilina en el medio. No es fundamental el volumen de la disolución añadida, y la costumbre es llenar simplemente los cilindros hasta la parte alta. Una placa tan sólo no es suficiente para asegurar la exactitud de la prueba. La media de los diámetros de los anillos de cuatro placas, por lo menos, para cada muestra debe ser calculada. Otra precaución más es que debe comprobarse una muestra de prueba de la dilución final, diluida todavía a 1:1. Así, por ejemplo, si la muestra Original que hay que ensayar contiene aproximadamente mil unidades por centímetro cúbico, debe diluirse hasta que contenga dos unidades por centímetro cúbico, dando la disolución A. Esta, a su vez, debe diluirse para dar la disolución B, que contiene una unidad por centímetro cúbico. Las concentraciones bajas de disolventes orgánicos, tales como el éter, cloroformo, etc., en las muestras de prueba no afectan a la exactitud del ensayo.

Incubación.-Cuando todos los cilindros se han llenado con la muestra tipo y los problemas, se incuban a 37° durante la noche, y entonces se inician por separado dos procesos: a) La penicilina se difunde desde la disolución hacia el exterior atravesando el agar; y b) Las bacterias comienzan a crecer. En diez horas aproximadamente rodea a los cilindros una zona circular, clara, que pone de manifiesto cómo la penicilina ha inhibido el crecimiento de las bacterias. Fuera de esta área las bacterias crecen rápidamente, formando como una capa densa sobre el agar; los anillos de inhibición aumentan ligeramente a medida que el período de incubación avanza; éste, a fines de comparación, debe ser siempre el mismo. Para leer las placas hay que darles vuelta y medir con calibradores los diámetros; pero cuando es preciso leer muchos números, este proceso es demasiado laborioso. Un método excelente consiste en colocar las placas Petri sobre un vidrio ahumado, que lleva una escala claramente iluminada en el centro: sin fatigarse, se pueden

hacer numerosas lecturas. Aún se tiende a dar mayores facilidades proyectando la imagen del anillo sobre una pantalla graduada.

La curva tipo.-Esta curva es la traducción gráfica de la relación entre el diámetro del anillo y la concentración de las disoluciones tipo. Se parte para ello de tres a cuatro placas, cada una con cuatro cilindros conteniendo disoluciones del tipo de concentraciones 2-1-0,5-0,25 unidades por centímetro cúbico, utilizando la solución reguladora de fosfato pH-7. Estas placas se preparan al mismo tiempo que aquellas otras en que se examina la muestra problema, y se incuban conforme hemos indicado. La gráfica correspondiente relaciona los diámetros de los anillos (ordenadas) con la concentración (abscisas). En aquellos laboratorios en que continuamente se realizan ensayos de penicilina debe construirse diariamente la curva tipo, y si los ensayos no se realizan tan frecuentemente, preparar una curva para cada grupo de prueba. Es preciso tener presente que el diámetro del anillo no es directamente proporcional a la concentración de penicilina, sino al logaritmo de la concentración. Aparecen en la literatura técnica informes asegurando no deben tomarse en consideración las pequeñas variaciones en el diámetro del anillo. Esto nos parece equivocado, toda vez que una diferencia en el diámetro del anillo de un milímetro, por ejemplo, a la concentración de 0,5 unidades por centímetro cúbico, puede suponer una diferencia de potencia del orden del 25 por 100.

Corrección de las variaciones.- Aunque corrientemente se emplea una curva tipo para leer la concentración de la muestra problema, hay un perfeccionamiento que asegura mayor exactitud. Cuando diariamente se construyen las curvas en los laboratorios en que se realizan los ensayos de penicilina, pueden presentarse variaciones ligeras siempre, y durante un período de tiempo, el diámetro del anillo para la concentración de una unidad por centímetro cúbico variar hasta 2 ó 3 milímetros; y con concentraciones superiores, la variación puede aún ser mayor.

No hay que suponer que la placa de prueba dé resultados exactamente comparables a los obtenidos a partir de placas empleadas para la curva tipo, y si se desea exactitud hay que aplicar una corrección. Un cilindro que contenga una dilución tipo, por ejemplo, una unidad por centímetro cúbico, se coloca en cada placa con diluciones diferentes de la muestra problema. Supongamos que en el día en que se obtiene la curva, el diámetro del anillo con una dilución de la muestra problema es 22 milímetros, mientras que la cubeta que contiene la dilución tipo

de una unidad por centímetro cúbico da en la misma placa un diámetro del anillo de 20 milímetros en lugar de 20,4 milímetros que es el que, según la curva tipo, correspondería a esta concentración. La concentración que corresponde a un diámetro del anillo de 22 milímetros es, según la gráfica, de 1,25 unidades por centímetro cúbico; pero la concentración correspondiente a un diámetro de 20 milímetros es 0,75. La verdadera concentración del problema es, por tanto,

$$\frac{1 \times 1,25}{0,75} = 1,66 \text{ unidades por centímetro cúbico.}$$

Heatley ha suministrado particularidades de un examen estadístico de los resultados obtenidos por el método de placa-cilindro. Cuando se hicieron ensayos por cuadruplicado, sólo uno por cada veinte difería del valor verdadero en más del $\pm 17,6$ por 100, mientras que los ensayos hechos por triplicado y duplicado mostraron límites más amplios de error, a saber, $\pm 20,3$ por 100 y $\pm 24,9$ por 100, respectivamente. Schmith y Mayer son de opinión de que el error es de 15 a 20 por 100. Suponiendo que se utiliza una curva tipo y que cada cilindro de cada placa contiene una disolución tipo, el error probable no excede de ± 10 por 100.

Procedimientos nefelométricos.-El ensayo de la penicilina por los métodos nefelométricos es parecido al de los métodos de dilución en serie. Se incuba durante un tiempo dado una dilución de penicilina en caldo nutritivo, inoculada con un organismo de prueba, y se mide fotoeléctricamente el crecimiento bacteriano. Como organismo de prueba se utiliza el *Staphylococcus aureus*. Mc. Maham recomienda emplear un medio compuesto de caldo nutritivo Difco Bacto (16 gramos), extracto de levadura (4 gramos), completado con agua a un litro. Se omite la glucosa, pues se supone no da resultados satisfactorios. Para la prueba se escogen tubos de ensayo uniformes de 18 por 140 milímetros y se colocan en bastidores, en filas de a nueve. Con rigurosas precauciones asépticas se lleva, mediante una pipeta, el medio a cada tubo; en cantidades tales como 9,6, 9,5, 9,4 y 9,3 centímetros cúbicos, etcétera, para cada conjunto de tubos. Se prepara en el momento una disolución a partir de la penicilina tipo en una mezcla reguladora de fosfato. esterilizado, empleando cantidad suficiente para dar una disolución final que contenga 0,5 unidades por centímetro cúbico. Para asegurar la esterilización de la disolución debe hacérsela pasar a través de un filtro Seitz. Se añaden después cantidades de este tipo a una serie de los tubos que contienen el medio nutritivo hasta alcanzar un volumen final

en cada tubo de 9,6 centímetros cúbicos; por tanto, en el primer tubo no habrá penicilina. De modo análogo se preparan muestras de los problemas en mezcla reguladora de fosfato esterilizada, de tal manera que la concentración final sea próxima a las 0,5 unidades por centímetro cúbico, añadiendo las cantidades necesarias a una segunda serie de tubos conteniendo el caldo. Es muy práctico tener un tubo central en el cual se vierten 9,3 c.c. de caldo y 0,7 c.c. de dilución de penicilina, toda vez que da una mejor comprobación de la densidad de los otros. La prueba se realiza añadiendo a cada tubo 0,4 c. c. de un cultivo reciente de dieciocho horas de *Staphylococcus aureus*, incubando los tubos a 37°C. durante cuatro horas, o sumergiéndolos parcialmente en un baño de agua a la misma temperatura durante igual tiempo, procedimiento que según se afirma da mejores resultados. Al sacar del incubador los tubos se exponen al vapor libre, en un autoclave, durante diez minutos, con lo cual se detiene el crecimiento y disminuye el peligro de que se extienda la infección mientras se mide la densidad óptica del contenido de los tubos. Una vez enfriados, se mide con un colorímetro fotoeléctrico, provisto de filtro rojo, la opacidad de cada tubo. A partir de los resultados suministrados por los tubos de disolución tipo se construye una gráfica en la que se llevan como ordenadas las densidades y como abscisas las unidades de penicilina. La densidad óptica de los problemas se lleva sobre ella, dándonos la curva las unidades de penicilina. Los métodos nefelométricos son menos costosos que los de placa, que precisan gran número de placas Petri y cilindros; pero el ahorro se reduce parcialmente para los laboratorios pequeños con el elevado gasto inicial del nefelómetro. Mientras que la prueba nefelométrica se realiza en pocas horas, el método de placa-cilindro precisa veinticuatro horas; sin embargo, la esterilización absoluta que el primer método requiere hace su empleo sólo conveniente para técnicos especializados.

Foster y Woodruff recomiendan emplear como organismo de prueba, en lugar del *Staphylococcus aureus*, el *B. subtilis*, que crece más rápidamente que el primero; esto exige que las placas sembradas con él se almacenen en un refrigerador hasta que sea preciso emplearlas, y que la incubación durante la prueba se efectúe a 30°C. en vez de a 37°C. Tiene este empleo del *B. subtilis* la ventaja de poder obtenerse los resultados en tiempo más corto: diez horas, y que el organismo es más sensible a la penicilina que el *aureus*, pudiendo sembrarse las placas a temperatura superior, afirmándose que es más neta la definición del anillo y la curva tipo más uniforme. De otra parte, la curva

tiene tendencia a aplanarse y dar por lo mismo resultados menos exactos. Los resultados de los ensayos en los que se emplean organismos de prueba distintos serán sólo comparables si la sensibilidad de dichos organismos para cada una de las cuatro variedades de penicilina que puedan existir en el producto comercial es la misma. Esta sensibilidad uniforme no es probable tenga lugar, y si una de las muestras contiene más de una variedad de penicilina, los resultados del ensayo dependerán completamente de las sensibilidades relativas de los organismos de prueba para cada variedad presente.

Métodos químicos de ensayo.- Se ha sostenido durante bastante tiempo que el ensayo químico de la penicilina no era practicable; pero en la actualidad se reconoce que esto es sólo verdad cuando se trata de penicilina relativamente impura, de potencia aproximada a 300 unidades por miligramo. Más tarde se desarrolló un método basado en la inactivación de la penicilina por la penicilinasa, con la consiguiente liberación del ácido peniciloico, que directamente puede valorarse. Diez centímetros cúbicos de una disolución de la muestra problema, conteniendo de 5.000 a 20.000 unidades de penicilina, se ajustan a un pH -8. Se agrega disolución de penicilinasa, manteniendo el pH a 6,8, y añade disolución de hidróxido sódico, 0,02 N. Cuando el pH se hace constante, la penicilina se ha inactivado completamente, habiéndose liberado todo el ácido. Se completa la valoración pasando el pH otra vez a 8. Grandes cantidades de sustancia reguladora interfieren naturalmente la prueba; pero con las muestras comerciales de penicilina de alta calidad de que ahora se dispone se han encontrado resultados de exactitud de hasta el 98 por 100. No nos parece aventurado afirmar que con la mejora de la técnica y de los detalles, este método conseguirá reemplazar al ensayo biológico. Toda vez que la descomposición hidrolítica que da el ácido peniciloico puede producirse también con un ácido, sugerimos la idea de un ensayo químico basado en la hidrólisis ácida y en la titulación de retorno.

Determinación colorimétrica.- Se forma un compuesto colorante por reacción de la penicilina con el N-(1-naftil-4-azobenceno)-etilendiamina, y se ha dado a conocer un método basado en ella para la determinación colorimétrica de la penicilina. Se asegura que el método es más exacto que los microbiológicos corrientes, y que es aplicable a todas las variedades de penicilina y a todas las preparaciones comerciales de la misma. También recientemente se ha dado a conocer un micrométodo basado en la combinación con el 2-metoxi-6-cloro-9-

(β -aminoetil)-amino-acridina. Se afirma que de esta manera pueden determinarse cantidades de 0,0625 a 0,625 μg .

Frecuencia de la dosis.-La curva indicadora de la desaparición de los medicamentos en el organismo es frecuentemente de modo aproximado exponencial; la concentración desciende rápidamente al principio y después cada vez más lentamente. La disminución se mide convenientemente por el tiempo de hemirreducción, que es el que tarda la concentración en descender a la mitad de su valor inicial. Si administramos intravenosamente penicilina, el tiempo de hemirreducción se mide en minutos; en cambio, para las sulfodrogas o los salicilatos, en horas; para la digital, en días, y para el mercurio, en semanas. Si deseamos, por tanto, que la concentración se mantenga casi constante, la frecuencia de la dosis no debe nunca ser inferior a dicho tiempo de hemirreducción. Naturalmente que también pudieran administrarse, durante intervalos más largos, dosis mayores, y de esta forma mantener la concentración por encima del nivel eficaz; pero esto equivale a derrochar el medicamento y, generalmente, a producir efectos tóxicos. Cuanto más frecuentes sean las dosis, más constante será la concentración, pero también mayor el trabajo, dependiendo por tanto la frecuencia óptima del equilibrio de estos dos factores. Lo ideal sería la administración continua, así desde el punto de vista de la economía del medicamento como de la constancia de la concentración; y ella puede lograrse bien sirviéndose de un aparato que produzca un flujo constante de solución, bien mediante la liberación, más o menos constante, del medicamento desde un depósito más o menos insoluble. Ya anteriormente hemos tratado de los dispositivos que retrasan la desaparición del medicamento y que poseen dos ventajas: disminuir la cantidad necesaria y hacer más fácil el logro de una concentración constante. El método apropiado depende de la forma o motivo de la desaparición. Por ejemplo, la acetilcolina es destruida por la colinesterasa, y así, su desaparición puede ser diferida mediante una sustancia que inhiba a esta enzima, tal como la eserina. Cuando un medicamento se excreta en la orina, como sucede a la penicilina, puede retrasarse su desaparición administrando otros medicamentos que excretándose del mismo modo sobrecargan el mecanismo de excreción; así sucede, como en otro lugar manifestamos, con el ácido p-amino-hipúrico en la penicilina. Al administrar de modo continuo o con frecuencia dosis reducidas de un medicamento se va gradualmente acumulando en el cuerpo y llegan a igualarse el tiempo de hemiacumulación y el de hemirreducción. Cuan-

do, como en el caso de la penicilina, el tiempo de hemirreducción es muy corto, la concentración se eleva rápidamente al nivel eficaz; pero cuando el tiempo de hemirreducción es más largo la concentración puede elevarse demasiado lentamente, y es necesario administrar grandes dosis al principio y luego reducirlas cuando se ha alcanzado la concentración eficaz. Esta técnica es la seguida con la digital, salicilatos, sulfonamidas y muchos otros medicamentos administrados de modo general. La dosis necesaria para producir en la sangre una concentración inicial dada depende del volumen de distribución. El colorante azul Evans se usa para medir el volumen de plasma que iguala a su volumen de distribución. Con los cloruros, bromuros y tiocianatos, el volumen de distribución es, aproximadamente, igual al del líquido extracelular. Muchas sustancias, tales como el alcohol, la urea o la sulfanilamida se distribuyen por igual en toda el agua del organismo. Algunos medicamentos, tales como la mepacrina, se concentran rápidamente en determinados tejidos, y el aparente volumen de distribución es mucho mayor que el volumen total del organismo. Sin embargo, la importancia de estos hechos es principalmente teórica y la dosis inicial apropiada se determina empíricamente.

Vamos a poner fin a este modestísimo estudio sobre la penicilina, que no responde, y bien lo sentimos, a lo que deberíamos ofrecer a esta Real Academia de Farmacia, que nos acoge tan bondadosamente en su seno, y en el que no hay otro mérito que el de haber efectuado un delicado y penoso trabajo de selección para recoger todo lo más saliente publicado sobre la materia en los Estados Unidos, Inglaterra, Canadá, Argentina y España.

De una manera general, todos los descubrimientos, incluso los más revolucionarios, deben mucho a los sucesos que les han precedido. El aeroplano, inventado por los hermanos Wright en el estudio de las posibilidades de vuelo de una máquina más pesada que el aire, llegó a tener realidad gracias al descubrimiento previo del motor de combustión interna. La penicilina llegó a ser descubierta merced al desarrollo de la ciencia bacteriológica y al continuo progreso de la química y de la medicina. Ciertamente que muchos discuten todavía la casualidad de su descubrimiento, y se extienden sobre la serie de coincidencias que condujeron a él, olvidándose de lo más importante, el hombre que examinaba la placa contaminada por la espora errante de un moho, que otros muchos seguramente, con anterioridad, habrían arrojado para librarse de cosa tan molesta. Ya Pasteur hizo notar que la fortuna fa-

vorece a las mentes preparadas. Los años de estudio y de investigación son, en definitiva, los que hacen posibles descubrimientos como el de la penicilina. Por todas partes nos rodean los microbios: en el aire que respiramos, en los alimentos que comemos, en el agua que bebemos; y a pesar de ello, no hace aún un siglo que comenzó a pensarse que algunos de estos microbios eran portadores de graves enfermedades. Muchos, por fortuna, resultan utilísimos para la humanidad. Así, el alcohol y los vinos son el producto de la fermentación de los azúcares de los frutos ocasionada por microorganismos. Muchas de las sustancias que la planta toma del suelo son devueltas al campo merced a los microbios que originan la putrefacción de las plantas muertas. En el hombre mismo tiene lugar una putrefacción de tipo análogo, que ocasiona la llamada "sepsis", que el gran Pasteur descubrió ser originada por microbios, y cuyo descubrimiento desarrolló más tarde Lord Lister, hijo del que sacó el microscopio de la situación de inferioridad en que se encontraba al papel principal que hoy tiene en el laboratorio. Lord Lister era cirujano, y con uno de los microscopios de su padre se pasó mucho tiempo estudiando los tejidos inflamados, preocupado de las malas condiciones en que tenía que trabajar y que ocasionaban, a veces, un desenlace fatal en operaciones por lo demás muy triviales. Pensaba acertadamente al apreciar la verdad de lo dicho por Pasteur, que la tendencia del cirujano debía ser evitar que los microbios tuvieran acceso a las heridas operadas, y que el camino a seguir para lograrlo era matar los microbios antes que penetraran en el cuerpo y ejercieran su acción perjudicial. Lister intentó primeramente reducir el número de microbio que pudieran aproximarse, y lo logró mediante la limpieza de las heridas, y después matar los microbios restantes, utilizando el mejor de los antisépticos de que entonces se disponía, ácido fénico, no ofreciendo duda que llevó a cabo una reforma completa en los métodos quirúrgicos de sus días. Limpieza de los instrumentos, vendas, las mismas salas de operaciones tratadas completamente con ácido fénico, todo lo que ha abierto el camino a la cirugía moderna, y que aún actualmente se aplica, con el único cambio real de sustitución del calor al antiséptico, y así, en la actualidad, en las salas de operaciones con aire adecuado y la esterilización por el calor de los vendajes, instrumentos, guantes y batas puede estarse seguro de que la herida tratada por el cirujano no se infectará, sin necesidad de emplear ácido fénico o cualquier otro antiséptico. El ácido fénico tenía el gran inconveniente de ser mucho más destructor de las células del cuerpo que de

los microbios, mientras el último antibiótico descubierto, la penicilina, destruye rapidísimamente los microbios sin ejercer acción alguna perjudicial sobre los tejidos del cuerpo. Como vemos, Lister, aplicando el descubrimiento de Pasteur, tuvo éxito destruyendo los microbios y evitando de tal manera la infección de las heridas operadas, pero no logró un éxito parecido en la cura de heridas ya infectadas, toda vez que el ácido fénico, antiséptico de que disponía, era venenoso en extremo. Se investigó muchísimo en el campo de los antisépticos no venenosos, y, en 1909, Pablo Ehrlich descubrió el Salvarsán, primera sustancia que reunía tal propiedad. Ehrlich había empleado en el tratamiento de determinadas enfermedades tropicales el "atoxil", medicamento arsenical, que fracasó completamente por ser muy venenoso y destruir el nervio del ojo, ocasionando la ceguera. Estudiando su estructura química llegó Ehrlich al salvarsán, también arsenical, de efecto en el tratamiento de la sífilis mucho mayor que el atoxil y mucho menos venenoso. Propiamente hablando, el salvarsán no es un antiséptico perfecto, ya que solamente es útil en el tratamiento de la sífilis y de un reducido número de enfermedades ocasionadas por organismos análogos; pero en el tratamiento de la sífilis se lograron resultados tan satisfactorios que rápidamente sustituyó por completo al mercurio. Se llegó, pues, a disponer de un antiséptico más venenoso para los microbios que para las células del cuerpo, y durante veinte años el salvarsán estuvo solo en este aspecto.

Desde aquellos tiempos en que Lister tuvo éxito, como ya indicamos, evitando la infección de las heridas operadas, se logró una gran mejora en los métodos por él utilizados, siendo la más importante la sustitución del ácido fénico por el calor. Generalmente, en los tiempos de paz, las heridas ya infectadas no forman parte del trabajo del cirujano; no constituyen, por tanto, un problema acuciante y por lo mismo se progresa muy poco en el campo de su tratamiento. Pero la guerra iniciada en 1914 puso en manos de los cirujanos miles de combatientes cuyas heridas se habían infectado, y una corta experiencia de las condiciones de la lucha fué suficiente para descartar toda ilusión de que esta sepsis podría curarse por antisepsis química. Ante la urgencia del problema se introdujeron muchas nuevas sustancias, pero todas fracasaron; la mayor parte, por ser demasiado venenosas, y otras, como los antisépticos de mercurio, que van bien en varias heridas, por lo fácilmente que son destruidos en otras por el pus y algunas sustancias. De otra parte, el progreso de la cirugía, siguiendo las directrices de Lister, no era apropiado para su empleo en el campo; la

esterilización al calor, excelente en un hospital bien equipado, no era de fácil realización en el terreno. Había que tratar de otra forma la herida séptica, y Sir Almroth Wright, director entonces de los laboratorios del hospital general de Boulogne, que tenía en su equipo al futuro profesor Fleming, el descubridor de la penicilina, se ocupó de este problema. Se partió para el nuevo tratamiento del principio de no ser necesario un antiséptico si se trataba la herida de tal manera que diera posibilidad al cuerpo de vencer la infección por sí mismo. Esto se hizo lavando la herida con una disolución salina que teniendo un efecto absorbente sobre la misma llevaría los líquidos frescos desde los tejidos subyacentes, eliminándolos de la superficie dañada. Esto no solamente serviría para lavar la herida, sino que suministraría también las sustancias defensivas, que se encuentran normalmente en la sangre, al lugar donde fueren necesarias. Al propio tiempo, los cirujanos empezaron a adoptar formas más drásticas de tratamiento, y la combinación de estos dos procedimientos dió un resultado satisfactorio. Terminó la guerra y se redujeron los casos de este tipo, y con ello no sólo la necesidad urgente sino también la oportunidad de una solución. Declinó gran parte del interés por estos estudios, que la guerra había provocado; sin embargo, la escuela de Sir Almroth Wright continuó investigando la sepsis. Un vistazo a la tragedia de la primera guerra mundial nos hace ver cómo muchas de las vidas perdidas y de las incapacidades permanentes producidas podían haberse evitado de disponer entonces de un antiséptico como la penicilina. Sin embargo, no perdamos de vista que si la penicilina se hubiera introducido en el tiempo de Lister, ciertamente habría sido un fracaso en el estudio científico de los microbios, pues no estaban entonces la medicina y la bacteriología en fase de desarrollo para reconocer y comprender las posibilidades de la penicilina. Prácticamente, no se habría hecho nada sobre la naturaleza de los microbios en una herida séptica; algunos de ellos habrían sido sensibles a la penicilina, y entonces los éxitos se tendrían casi por milagrosos; pero también podrían haber pertenecido al grupo de microbios insensibles a la penicilina, y en tal caso sólo se registrarían fracasos, con lo cual, como nadie sería capaz de comprender la razón de ellos se descartaría la penicilina, y probablemente el ácido fólico volvería a reemplazarla.

Resumiendo; vemos cómo aprendimos de Pasteur que la putrefacción se debe a los microbios; cómo Lister al matarlos evitaba que tuvieran acceso a sus heridas operadas; cómo fracasó en sus intentos de

destruirlos una vez que habían entrado en la herida, así como en detener su crecimiento, debido a que los productos químicos a su disposición eran muy venenosos. Cómo este problema no se vencería hasta el descubrimiento de la penicilina; y por último, cómo Ehrlich había demostrado con el salvarsán que podía existir un agente quimioterápico no venenoso.

Es sabido que la inmunidad natural es el proceso mediante el cual el cuerpo vence a los microbios perjudiciales, con los que se pone en contacto, y que solamente cuando esta inmunidad natural fracasa sobreviene la infección. Pues bien: Florey, profesor de Patología en la Universidad de Sheffield, llevado de su interés por la inmunidad natural, comenzó una investigación sobre el descubrimiento de Fleming en 1922 -la lisozima-, existente en las lágrimas, en la saliva, en la secreción bronquial, etc., que es un fermento que defiende la conjuntiva, al encontrarse en las lágrimas en la mayor cantidad, presentándonos un caso bien patente de inmunidad natural. En el curso de su extenso trabajo, asociado con un bioquímico, el doctor Chain, consideró interesante realizar una investigación sistemática sobre las sustancias producidas por microorganismos que fueran capaces de destruir a los microbios perjudiciales, escogiendo la penicilina como la materia de estudio que más prometía, siendo la razón principal, sin duda, que ella podría destruir el estafilococo, que, como es sabido, no es atacado por el grupo de las sulfonamidas.

No podemos detallar la marcha y el éxito de sus magníficas investigaciones, ni tampoco las enormes dificultades con que luchó para obtener el producto en grandes cantidades, siendo la principal que muchos de los microbios corrientes en el aire pueden destruirla y, por tanto, que no basta en la fabricación de la penicilina el cuidado ordinario que pueda tenerse en una industria corriente, sino que es preciso, para evitar la contaminación, proceder lo mismo que en un laboratorio bacteriológico, ya que un solo microbio es suficiente para destruir en pocos días toda la producción de penicilina de la fábrica,

Casi nos parece increíble el poder de acción que la penicilina, absolutamente pura, tiene sobre los microbios peligrosos; decir que puede destruir al estafilococo cuando una parte de penicilina se diluye en cincuenta millones, no será tan claro como manifestar que esto equivale a una gota de penicilina pura en 2.500 litros. En poder ya de esta maravillosa sustancia, queda abierto, sin embargo, un vasto campo a los investigadores, y en él corresponderá el principal papel a la clase

farmacéutica y a esta Real Academia de Farmacia. Es menester despertar en nuestro país un gran interés por el estudio de los mohos, que están llamados a ocupar un lugar muy preferente en la industria de los medicamentos. Investigar muy especialmente estos mohos como productores de antibióticos para comprobar su efecto destructor sobre los microbios, a la vez que su falta de acción sobre los tejidos y las células de la sangre; e investigar con fe, ya que no es probable que la primera sustancia de esta clase descubierta sea la mejor.

Hay tres terribles enfermedades -cólera, tifus y peste- sobre las cuales la penicilina no tiene efecto. Tal vez un día se encuentre un producto químico destructor de estos microbios; hoy no lo tenemos. Pero, afortunadamente, esas tres enfermedades pueden evitarse, y se evitan por inmunización.

Establecida la infección, para muchas terribles enfermedades la, penicilina es única, y no hay nada mejor. Evita la reproducción de los microbios y, sin ser venenosa, capacita al cuerpo para destruirlos.

¿Quiere esto decir que nos conformemos y no investiguemos más?

De ninguna manera. Hemos de seguir trabajando con el mismo entusiasmo y la misma fe, como si la penicilina no existiera, con la esperanza de que el futuro nos proporcione un perfeccionamiento de la misma o una sustancia completamente nueva, aún mejor que ella, que no disminuirá la grandeza de su conquista, pero sí será un paso más en la contribución de los hombres de ciencia al bienestar de sus hermanos.

En ese camino de trabajo, dentro de las grandes limitaciones de mis fuerzas, me tendrá siempre a su lado, como el más modesto de sus miembros, la Real Academia de Farmacia, a la que una vez más en este día hago ofrenda de mi admiración, mi gratitud y mi respeto.

He dicho.

CONTESTACIÓN

POR EL

EXCMO, SR. D. **LUIS BLAS y ÁLVAREZ**

EXCMO. SR.; EXCMOS. SRES; SEÑORAS y SEÑORES:

SEGÚN el precepto estatutario que obliga a uno de los miembros de esta Real Academia a contestar el discurso de ingreso de los nuevos académicos, tengo el honor de cumplir esta obligación, que, además, en este caso, constituye para mí un motivo de particular satisfacción por las relaciones de amistad que desde hace años me unen con el nuevo académico, Excmo. Sr. D. José María Fernández-Ladreda y Menéndez-Valdés.

Costumbre es en estos actos recordar la figura del predecesor del nuevo académico; pero hoy, y como ya ha indicado el doctor Fernández-Ladreda, ninguna honra fúnebre se precisa hacer, afortunadamente; su plaza y sillón no estaban vacíos por muerte alguna, pues se trata de una vacante de nueva creación. Llega, por tanto, el doctor Fernández-Ladreda a nuestra Real Academia sin tristezas de recuerdos de ausencia, y los negros crespones de los funerales están completamente sustituidos por los blancos tejidos que adornan los desposorios, Fiesta especial de júbilo y alegría es la que hoy corresponde a esta solemne recepción.

La biografía del nuevo académico, para muchos, es de sobra conocida. Asturiano de origen, es, además de artillero, doctor en Ciencias Químicas, catedrático de la Universidad Central, presidente honorario del Instituto de Estudios Asturianos, consejero del Instituto de Investigaciones Científicas, etc., etc. Durante su vida científica ha sido pensionado múltiples veces: en la Universidad de Columbia (Norteamérica), Bureau of Standard (Washington), Laboratorio Teddington (In-

glatterra), Laboratorios Poulenc- Freres (Francia), etc., y ha dirigido diversas fábricas, tales como la de Armas de repetición (Coruña), Armas automáticas (Oviedo), Pólvoras y explosivos (Cayes), Metales y aleaciones ligeras (Lugones), Laboratorio del Taller de Precisión de Artillería (Madrid), etc.

Sus libros y publicaciones científicas son muy numerosos, destacando entre los primeros *Pólvoras y explosivos modernos*, *Química teórica y experimental*, *Análisis químico de hierros y aceros*, *Carbón, Aire y agua y Recuperación de explosivos*. La lista de otras publicaciones científicas aparecidas en revistas nacionales y extranjeras haría interminable esta relación. En la actualidad, el doctor Fernández-Ladreda es académico electo de la Real de Ciencias exactas, físicas y naturales, catedrático de Química Industrial en la Universidad de Madrid, vocal del Patronato Juan de la Cierva, presidente honorario del Colegio de Farmacéuticos de Asturias, presidente del Instituto de Mecánica elástica y, ... renuncio a seguir enumerando sus cargos y méritos para no herir la modestia de nuestro nuevo compañero de Academia.

Mi amistad y relación con el doctor Fernández-Ladreda se remonta a aquellos tiempos en que juntos estudiábamos las asignaturas del doctorado en Ciencias Químicas; él ya era en aquella época comandante de Artillería, director de la Fábrica de Lugones y una destacada autoridad científica en diversas ramas de la química industrial. Desde entonces, por extraña casualidad y curiosa coincidencia, los dos hemos tenido gustos parecidos en el desarrollo de nuestras vidas. Él artillero, general de división ahora, catedrático de Química Industrial, eminente autoridad en Química de Guerra y una de las figuras más destacadas de la Ciencia Química española; quien os habla, farmacéutico, catedrático de Química Técnica, aficionado a la Química de guerra y hasta comandante honorífico de Artillería en la pasada cruzada. Es un paralelismo curioso, aunque, como todo paralelismo, con la debida separación entre las dos rectas de nuestras vidas; la distancia que nos separa puede compararse gráficamente con la que media entre un general y un comandante,

El doctor Fernández-Ladreda ingresa hoy en esta Real Academia leyendo su magnífico discurso sobre un tema de enorme actualidad científica y gran interés farmacéutico: *Los antibióticos*; y como no es mi propósito hacer una glosa del fondo de su contenido científico, séame permitido presentar un breve psicoanálisis de su forma.

El tema básico de todo su discurso es la simbiosis y la antibiosis,

es decir, la paz y la guerra entre esos minúsculos seres que juntos viven y se desarrollan en los medios naturales de cultivo, Tema eminentemente bélico cual corresponde a la vocación principal de su autor.

Habéis oído de sus labios la relación histórica de las principales armas terapéuticas que el hombre ha empleado en el transcurrir del tiempo para la lucha contra la enfermedad, hasta la última gran guerra, en que, simultáneamente con el descubrimiento de nuevas armas de lucha, surgió el "arma amarilla, si no es pura, de defensa contra la muerte."

Sin querer, en todo el discurso del doctor Fernández-Ladreda se pone de relieve la actividad militar de nuestro general. Primero, en la parte histórica, y luego, en la visión conjunta de la asepsia y la anti-sepsia; más que una lección de higiene, es una lección de táctica militar aplicada a la lucha del hombre contra los diminutos seres que pueden asaltar su, fortaleza por la brecha de una herida. Más tarde, cuando entra de lleno en el estudio de la penicilina, se adivina en todo el trabajo al artillero, que con deleite estudia la nueva arma de exquisita precisión que ha de permitirle la inverosímil proeza de herir solamente al agresor sin perjuicio alguno para las células vecinas del organismo atacado. Para él, el fenol de Lister y los viejos desinfectantes son algo comparable a los proyectiles que se arrojan sobre las poblaciones sin objetivo determinado, los cuales matan y destrozan todo lo que en su proximidad encuentran, sin distinguir amigos de enemigos; por el contrario, la penicilina y los modernos antibióticos son proyectiles obedientes que sólo saben destruir y atacar los gérmenes patógenos sin perjudicar jamás al ser humano que los soporta; son el ideal de los proyectiles, algo así como esas minas magnéticas de profundidad que sólo explotan cuando en sus cercanías hallan barcos con poderosas estructuras metálicas, y sin embargo quedan en reposo cuando las débiles barcas de madera de los pescadores navegan por sus proximidades.

Cuando, en otro capítulo de su discurso, nos hablaba de las dosis óptimas y continuas a emplear en el caso de la penicilina, también se mostraba su personalidad militar de un modo acentuado. Recordar cómo insistía en la innecesidad de emplear dosis macizas y discontinuas del medicamento, sino, por el contrario, recomendaba su empleo a pequeñas dosis, lo necesario nada más y su administración continua, para evitar el despilfarro de tan costoso medicamento. Cuando le escuchábamos, alguno habrá querido recordar ese casi dogma del arte militar

que obliga a los jefes, en los combates, al ahorro máximo de las municiones.

Aquella espora errante que impurificó el cultivo de bacterias de Fleming en el Hospital de Santa María, de Londres, el año 1929, dió lugar a uno de los descubrimientos más sensacionales de este siglo: el aislar la penicilina y abrir un nuevo campo de investigación extraordinariamente amplió en el grupo de los medicamentos antibióticos. Pero del estudio del por qué de esto, deducimos que las guerras no son sólo patrimonio de los hombres, y, además, lo que es más sorprendente: que los métodos de guerra humana ya eran conocidos y practicados por los pequeños seres desde que el Creador los sacó de la nada. En los microscópicos abismos donde pululan las bacterias, hongos, etc., también existen continuas guerras y enconadas luchas por la existencia; sus armas, mucho más refinadas que las de los hombres, están dotadas de gigantesca actividad, y sus métodos de lucha diríamos, por paradoja, que se parecen a los de los hombres. El bloqueo químico, por ejemplo, es idéntico a lo que en el arte militar se llama sitio de una fortaleza. Aquel viejo aforismo militar de que "plaza sitiada, plaza tomada" se viene practicando desde los orígenes de la Creación en las continuas luchas de los hongos contra las bacterias; los hongos no las matan sino que las inmovilizan, impiden su reproducción y desarrollo; y esto, en la vida animal, es sinónimo de muerte, pues la única defensa de estos microscópicos seres es solamente eso, su enorme y casi lujuriosa proliferación.

Los antibióticos han transformado profundamente el concepto terapéutico de las medicinas. Antiguamente, toda la terapéutica en la lucha contra la invasión microbiana se polarizaba a estimular o ayudar las propias defensas humanas. La perspicacia de los antiguos definía la enfermedad infecciosa por los cuatro síntomas de calor, rubor, tumor y dolor; y en efecto, éstos eran la expresión visible de la gran batalla celular que se estaba librando en esos momentos de indecisión de la lucha. Luego en el pus, inmenso osario de combatientes, se amontonaban leucocitos y bacterias, toxinas y antitoxinas, armas deshechas y anuladas después de la derrota. La vieja terapéutica empleaba, por ejemplo, los antitérmicos para disminuir la temperatura, pero no atacaba los gérmenes, de cuyas toxinas protestaba el organismo con su elevación térmica. Ahora, los antibióticos son atacantes directos del microorganismo que causa la elevación de temperatura, y el éxito es inmensamente superior, pero también esto nos descubre que aquel viejo

aforismo militar de que "la mejor defensa es el ataque", era ya conocido y practicado por los hongos muchos siglos antes que el hombre lo pusiera en práctica.

No quiero prolongar más, por culpa mía, la duración de este acto; mis compañeros están ya impacientes por felicitaros. Excmo. Sr. don José María Fernández-Ladreda: la Real Academia de Farmacia os da su sincera y amistosa bienvenida.

He dicho.