

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS.

**DETERMINACION DE LA POTENCIA DE ALGUNOS
ANTIBIOTICOS POR METODOS MICROBIOLOGICOS
TURBIDIMETRICOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO

PRESENTA

INDRA MENEZ ESPINOSA.

6 0 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres:

Sr. Prof. Guillermo Ménez Servín,

Sra. Profa. Evangelina F. de Ménez,

con cariño.

★

A mis hermanos:

Dr. Omar,

Profa. Adu Mirza,

Lic. Nereo Guillermo y

Profa. Ma. del Carmen

65381

INDICE.

I.—INTRODUCCION.

Antibióticos.

Modo de acción de los antibióticos.

Tetraciclinas: oxitetraciclina, tetraciclina.

Triacetiloleandomicina.

Neomicina.

Control de los antibióticos.

II.—MATERIALES Y METODOS.

Determinación de la potencia de oxitetraciclina (terramicina).

Determinación de la potencia de tetraciclina.

Determinación de la potencia de triacetiloleandomicina.

Determinación de la potencia de neomicina.

III.—RESULTADOS Y DISCUSION.

IV.—RESUMEN Y CONCLUSIONES.

V.—BIBLIOGRAFIA.

I.—INTRODUCCION.

El advenimiento de los antibióticos como agentes terapéuticos eficaces frente a numerosas enfermedades, durante la década del 40, promovió un gran impulso al desarrollo de la industria Químico-farmacéutica, que primeramente manifestado en Estados Unidos, se generalizó en las naciones más importantes del mundo en un breve lapso.

Hasta entonces los antibióticos fueron conocidos solamente de extractos crudos o líquidos fermentados por biosíntesis de microorganismos; más raramente de extractos de los mismos microorganismos.

Los antibióticos son conocidos si no en forma pura, sí por sus efectos desde hace muchos años; pero sólo recientemente asumen la posición dominante en Medicina Clínica y en la industria farmacéutica.

El antagonismo biológico entre microorganismos, fué descrito por primera vez, a mediados del siglo XIX, como resultado de los estudios de Pasteur y Jouvvert en 1877.

Años más tarde, Tyndall, 1881, describe cómo soluciones turbias por el crecimiento de bacterias, eran clarificadas cuando especies de *Penicillium* crecían simultáneamente sobre la superficie del líquido. Cornil y Babes, en 1885 establecieron que: "si

el estudio de antagonismo mutuo entre bacterias, fuera lo suficientemente avanzado, una enfermedad causada por una bacteria probablemente se podría tratar por otra bacteria". En este mismo año, Castani fué el primero que intentó utilizar este fenómeno para el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas.

Las primeras técnicas para el estudio y aislamiento de microorganismos, se debe a Garré, en 1887 (método de las estrías alternas y de las estrías cruzadas).

También en 1887, Emmerich realizó los primeros estudios experimentales del antagonismo microbiano en animales de laboratorio. También introdujo la piojanasa en medicina, con la esperanza de lograr el control de la difteria.

En 1889, Villemin introdujo el término "antibiosis".

En 1912 se publicó un trabajo para emplear el "principio soluble" contenido en el filtrado de un cultivo en caldo, de *B. Mesentericus*, en el control de la tuberculosis experimental.

Dubos, en 1939, demuestra que de los cultivos en medio líquido de *Bacillus brevis*, se obtenía en forma cristalina un principio activo llamado tirotricina, compuesto de gramidicina y tirocidina; podía emplearse en el tratamiento de algunas infecciones; su empleo en terapéutica quedó limitado a causa de sus propiedades tóxicas.

En 1929, Fleming descubrió que en caldo de cultivo de *Penicillium notatum*, existía un principio activo con manifiesto antagonismo bacteriano, al cual llamó penicilina. Fleming y sus colaboradores, utilizaron esta substancia durante diez años para el aislamiento y diferenciación de bacterias y raras veces para curar heridas por aplicaciones tóxicas.

Este descubrimiento dió lugar a que en Oxford, en 1940, Chain, Florey y colaboradores, lograran la obtención de la penicilina en mayor proporción y la utilizaran en terapéutica. Posteriormente con la ayuda económica de Inglaterra y Estados Unidos, se logró la producción de la penicilina en escala industrial y su implantación en terapéutica.

Waksman y colaboradores, en 1944, publicaron sus investigaciones sobre actinomices antagonistas, obteniendo primero la actinomicina y luego la estreptomycinina, la neomicina y la cardicidina.

Entre 1946 y 1953, se han descubierto y producido rápidamente en gran escala, los llamados antibióticos de amplio espectro: cloranfenicol, clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, etc.

Las sustancias aisladas y estudiadas con propiedades antibióticas, posiblemente van más allá de las 4,000 que Welch indica; de éstas, la mayoría han sido eliminadas por tóxicas y otras por poseer escasa actividad antibiótica.

ANTIBIOTICOS.—El término antibiótico se aplica, por lo general, al producto químico metabólico de un microorganismo que en cantidades extremadamente pequeñas tiene la propiedad de inhibir o destruir a otros microorganismos.

A las sustancias antimicrobianas elaboradas por plantas superiores y que también tienen esta propiedad, se les designa como fitoncidas. Otro concepto, es no establecer esta diferencia respecto al origen, sino aplicar el término antibiótico a las sustancias que tengan la propiedad de inhibir microorganismos en dosis muy pequeñas, independientemente de que procedan de microorganismos, plantas superiores o animales.

El término antibiótico se aplica a las sustancias, producidas por microorganismos, que son bacteriostáticas, fungistáticas, bactericidas o fungicidas; esto es, que detienen el crecimiento de las bacterias y de los hongos, o los matan. La mayoría de estas sustancias son también tóxicas para formas de vida más elevadas y sólo unas cuantas sustancias son eficaces para proteger a los animales contra los microorganismos patógenos.

Los antibióticos se caracterizan por la especificidad de su acción. Sólo algunos impiden el desarrollo de gran número de especies bacterianas, y aun son menos las que actúan contra los hongos superiores. Una clasificación de la acción antibiótica se basa en el método de tinción de Gram.

Las bacterias Gram-positivas son, por lo general, las más resistentes. Sin embargo, hay muchas excepciones y, a pesar de su uso general, puede dudarse de la importancia de esta clasificación.

La facultad de un microorganismo para producir uno o más antibióticos, es un carácter de cepa más que de especie; ciertas cepas de un organismo dado elaboran determinado antibiótico y otras no pueden hacerlo; algunas cepas sintetizan un antibiótico; por ejemplo: algunas cepas de *Streptomyces griseus* forman estreptomycinina; otras producen griseína, estrepticina o candicidina; y las hay incapaces de producir ningún antibiótico. El mismo cultivo puede producir más de una sustancia activa. La misma cepa de *Streptomyces fradiae*, por ejemplo, produce un agente antibacteriano, la neomicina, y un agente antifungal, por diferentes cepas en más de una forma; así la estreptomycinina y la manosidoestreptomycinina son producidas ambas, por el *Streptomyces griseus*.

MODO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS.—El mecanismo de acción de los antibióticos sobre las células microbianas, todavía no se conoce con certeza.

Cuando los antibióticos intervienen en una o más reacciones metabólicas de la célula, alterando el metabolismo, se les considera como bioquímicamente activos. Cuando destruyen la integridad estructural de la célula, se les designa como superficte activos. Sin embargo, puede haber agentes que actúen primero por acción física y después por mecanismos bioquímicos.

Pueden impedir la síntesis de algún metabolito esencial para la célula bacteriana, como por ejemplo: algún factor de crecimiento. Algunos pueden alterar el funcionamiento y utilización del hierro en sistemas enzimáticos que lo contengan.

Desde el punto de vista clínico, es posible que cada agente pueda exhibir un número de reacciones que alteran o bloquean alguna fase esencial en el metabolismo patógeno sin afectar, en forma apreciable, los tejidos y funciones del huésped, contribuyendo de este modo a la eficiencia terapéutica.

Waksman resume en los siguientes puntos el modo de acción de los antibióticos:

1).—Los antibióticos interfieren con algunos de los procesos metabólicos de la célula microbiana, al substituir a algunas de las sustancias que están relacionadas estructuralmente con los materiales nutritivos normales de la célula y pueden ejercer, de esta manera, un efecto inhibitor específico. Estas sustancias son tomadas por la célula y bloquean los procesos naturales del crecimiento.

2).—Los antibióticos afectan a las células al interferir con la utilización de algunos de los productos intermediarios del

metabolismo. La estreptomicina, por ejemplo, tiene la capacidad de bloquear el metabolismo de ciertos nucleótidos de las bacterias.

3).—Ciertos antibióticos interfieren con varios sistemas enzimáticos, especialmente los relacionados con mecanismos respiratorios celulares. Estas enzimas se relacionan no solamente con la toma de oxígeno y producción de ácido por las células, sino también con la síntesis de metabolitos esenciales y coenzimas. La fosforilación que acompaña a la oxidación de la glucosa, es otro ejemplo de mecanismo enzimático que puede ser inhibido por los antibióticos.

4).—Un antibiótico puede impedir la síntesis de algún metabolito esencial para la célula bacteriana. Por ejemplo, la producción y utilización de un factor de crecimiento.

5).—Un antibiótico puede combinarse con un grupo sulfhidrilo esencial para la multiplicación celular.

6).—Puede mostrar interferencia con la utilización del hierro o el funcionamiento de sistemas enzimáticos que lo contengan.

7).—El antibiótico puede actuar como detergente y afectar la tensión superficial de las células bacterianas.

8).—La actividad de un antibiótico puede ser una función con grupos sulfhidrilos o con substancias que contengan dicha microbiana, adsorción por varios sistemas enzimáticos, reacción con grupos sulfhidrilos o con substancias que contengan dicho grupo.

9).—La prolongación de la fase "lag", la reducción de la intensidad del crecimiento, la disminución de la fase estaciona-

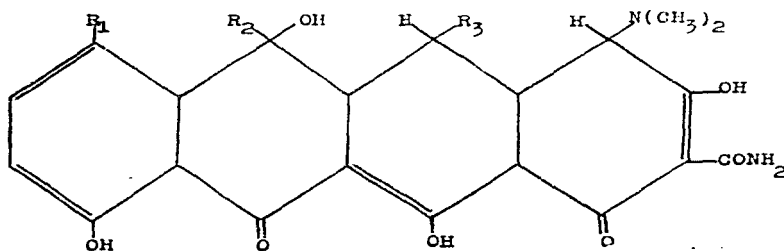
ria y la aceleración de la muerte de las bacterias, son otras tantas explicaciones para el mecanismo de acción de los antibióticos.

Los factores que pueden afectar la actividad antimicrobiana de una sustancia particular, pueden ser: pH del medio, estabilidad, grado de solubilidad, poder de penetración, naturaleza química, etc., del agente quimioterápico; actividad metabólica del organismo; desarrollo de barreras que obstaculicen el contacto directo del antibiótico y del organismo patógeno; situación o localización de éste último; presencia de sustancias interferentes que pueden inactivar a los antibióticos; concentración del antibiótico.

Muchas de estas explicaciones son, en realidad, simples especulaciones sin base experimental. Otros mecanismos, en cambio, han sido probados por lo menos en alguna de sus fases; pero no siempre se ha aclarado si la acción antimicrobiana es efecto directo de uno solo de estos factores o de la acción combinada de varios factores que actúan simultáneamente.

Los antibióticos, además de emplearse como agentes quimioterápicos, tienen otras aplicaciones en el campo de nutriólogía veterinaria, bacteriología industrial y fitopatología.

TETRACICLINAS.—Esta familia de antibióticos producida por cierta especie de *Streptomyces* se puede representar por la estructura general:



Algunos miembros de esta familia se exponen en la tabla siguiente:

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
5-Oxitetraciclina	H	CH	OH
Tetraciclina	H	CH ₃	OH
7-Clorotetraciclina	Cl	CH ₃	H

OXITETRACICLINA.—Este antibiótico es la terramicina producida por *Streptomyces Rimosus*.

Propiedades físico químicas:—La oxitetraciclina es una sustancia cristalina de color amarillo.

La oxitetraciclina es anfótera y soluble en soluciones tanto ácidas como básicas. Para su aplicación clínica se emplea la forma anfótera, el clórhidrato y las sales cálcicas de oxitetraciclina.

La oxitetraciclina no pierde potencia si se calienta durante cuatro días a 100°C.

Propiedades microbiológicas:—La oxitetraciclina es el antibiótico que posee el más extenso espectro antimicrobiano comprobado clínicamente. Es efectivo contra bacterias y cocos gram-positivos y gram-negativos, tanto aerobios como anaerobios; *Mycobacterium Tuberculosis*; *Actinomyces*, las *Rickettsias*, las espiroquetas y ciertos virus, protozoarios y parásitos.

TETRACICLINA.—Este antibiótico es producido por *Streptomyces Viridifaciens*.

Propiedades físico químicas:—Es soluble en agua, moderadamente soluble en metanol y etanol; insoluble en éter y en solventes orgánicos.

Se le conoce también con los nombres de ciclomicina, bristaciclina, hostiaciclina, omegamicina, tetradecina, purociclina.

Propiedades microbiológicas:—Tiene un amplio espectro, con un rango similar al de la oxitetraciclina.

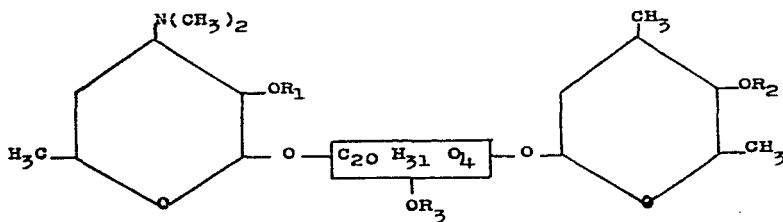
TRIACETILOLEANDOMICINA.—Este antibiótico es producido por *Streptomyces Antibioticus*.

Químicamente representa una variante de la oleandomicina, en el que el hidrógeno de los oxidrilos (-OH) es remplazado por grupos acetilo (CH₃CO-).

Al convertir la oleandomicina en triacetiloleandomicina (TAO), aumenta la estabilidad y disminuye la solubilidad en el agua.

La substitución de los hidrógenos de los grupos oxidrilo en la oleandomicina, por otros grupos, dá como resultado varios compuestos, tales como tripropianoleandomicina (TPO); tributiriloleandomicina (TBO); diacetiloleandomicina (2-3 DAO), (1-3 DAO), (1-2 DAO) y la monoacetiloleandomicina (3 MAO; 2 MAO; 1 MAO).

La estructura química general de estos compuestos es la siguiente:



	O	2-3	1-3	1-2	3	2	1	TPG	TBG	
R1	H-	Ac-	H-	Ac-	Ac-	H-	H-	Ac-	Pr-	Bu-
R2	H-	Ac-	Ac-	H-	Ac-	H-	Ac-	H-	Pr-	Bu-
R3	H-	Ac-	Ac-	Ac-	H-	Ac-	H-	H-	Pr-	Bu-

Ac: $\text{CH}_3\text{CO}-$

Pr: $\text{CH}_3\text{CH}_2-\text{CO}-$

Bu: $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$

En general, los grupos acetilo son introducidos de acuerdo a las relativas reactividades: $R_1 > R_2 > R_3$

Los diferentes compuestos tienen variados espectros antimicrobianos.

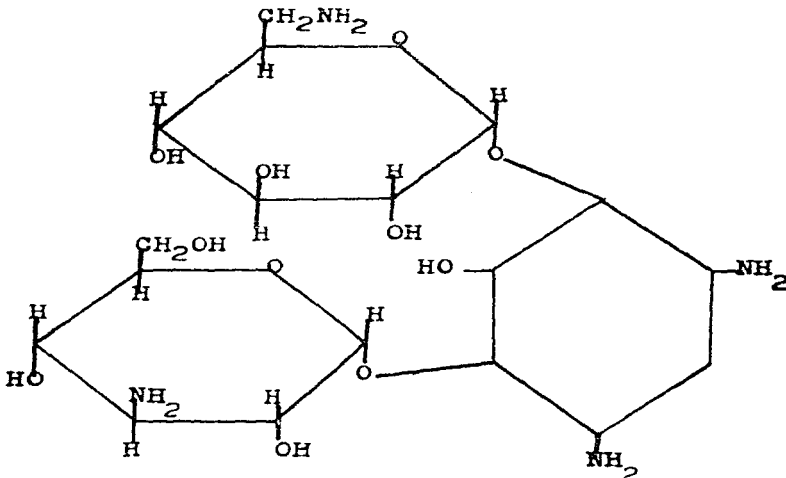
Propiedades físico químicas:—La oleandomicina es un compuesto básico cristalino, blanco, es muy poco soluble en agua, pero se disuelve en la mayoría de los solventes orgánicos comunes. Los compuestos cristalizados de soluciones acuosas de metanol o soluciones acuosas de acetona, libres de solvente, funden a una temperatura de 110°C . con descomposición.

La oleandomicina es soluble en medios ácidos y forma sales cristalinas con los metales y ácidos orgánicos.

NEOMICINA.—La neomicina es producida por *Streptomyces fradiae* y otras especies de *Streptomyces*. La cepa original de *S. fradiae*, aislada por Wakerman y Lechevalier en 1948, produce dos sustancias isómeras: la neomicina B y la neomicina C.

En la neomicina comercial probablemente predomina la neomicina B, ordinariamente en forma de sulfato, polvo blanco amorfo. Las sales inorgánicas de neomicina no han sido aún cristalizadas.

La fórmula de la neomicina es:



Propiedades físico químicas:—Es un antibiótico básico soluble en el agua, insoluble en los disolventes orgánicos, excepto en el metanol.

Es moderadamente estable en pH de 2.0 a 9.0.

Propiedades microbiológicas:—La neomicina es activa contra las bacterias gram-positivas, gram-negativas y ácido-re-

sistentes. También es activa contra ciertos protozoarios; pero no ataca a las rickettsias, los hongos ni los virus.

Las cepas sensibles a la neomicina no desarrollan prontamente resistencia al antibiótico.

CONTROL DE LOS ANTIBIOTICOS.

Para el control de los antibióticos son cuatro las pruebas que generalmente se efectúan:

- 1.—Potencia.
- 2.—Esterilidad.
- 3.—Toxicidad.
- 4.—Presencia de pirógenos.

La potencia de los antibióticos puede determinarse por:

- I.—Métodos fisicoquímicos.
- II.—Métodos microbiológicos.

Entre los primeros se tienen las técnicas por cromatografía, espectrofotometría, fluorometría y técnicas generales.

Entre los segundos se encuentran técnicas por dilución, en medios líquidos y en medios sólidos; por difusión, entre los que podemos citar el de las copas o cilindros, el de la difusión vertical, el de los discos de papel; por respuesta metabólica y por turbidimetría.

IMPORTANCIA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ANTIBIOTICOS.—Cada una de las etapas en los procesos de elaboración de los antibióticos, requieren un control y una valoración de ellos. Otro aspecto desde el cual la valoración de los antibióticos es de aplicación continua, es el estudio farmacológico de estas sustancias para poder establecer los ni-

veles hemáticos conseguidos con determinadas dosificaciones, o a las cifras alcanzadas en la excreción de las mismas. La elección de la terapia antimicrobiana más adecuada ante un agente infeccioso aislado, suele realizarse por una valoración semicuantitativa por algunos de los procedimientos microbiológicos que existen.

El interés biológico que suscitan los antibióticos, se debe a la inhibición o muerte de los microorganismos afectados, tanto in-vivo como in-vitro, por lo que resulta fundamental establecer relaciones sencillas entre tales propiedades y la cantidad presente en las muestras a dosificar. Como característica notoria está el hecho de que su acción se hace sentir en cantidades ínfimas que raramente los procedimientos fisico-químicos pueden intentar competir en sensibilidad.

Una limitación de índole general que afecta a estos métodos es su falta de especificidad, ya que numerosos agentes inhibitorios pueden producir efectos similares sobre un microorganismo dado.

Los métodos turbidimétricos se basan en la valoración de la turbiedad desarrollada por el germen de prueba en presencia de una determinada concentración del antibiótico, en tubos con medio líquido de cultivo.

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos, en la determinación de la potencia, por métodos microbiológicos turbidimétricos, de los siguientes antibióticos: Oxitetraciclina, Tetraciclina, Oleandomicina y Neomicina.

El control de estos antibióticos se refiere a su valoración en productos farmacéuticos, todos ellos de los Laboratorios PFIZER.

Las técnicas desarrolladas en los métodos que se exponen, presentan varias similitudes entre sí, resultando fáciles de efectuar y, además, proporcionan resultados satisfactorios.

II MATERIALES Y METODOS

II.—MATERIALES Y METODOS.

MEDIOS DE CULTIVO:

Medio de cultivo sólido (A):

Este medio tiene la siguiente composición:

Polipeptona	5.0 g/ litro.
Extracto de carne	3.0
Agar	15.0

pH 6.8

Medio de cultivo sólido (B):

Este medio tiene la siguiente composición:

Peptona	6.0 g/ litro.
Tripticasa	4.0
Extracto de levadura	3.0
Extracto de carne	1.5
Glucosa	1.0
Agar	15.0

pH 6.6

Medio de cultivo líquido:

Este medio tiene la siguiente composición:

Peptona	5.0 g/ litro.
Extracto de levadura	1.5
Extracto de carne	1.5
Cloruro de sodio	3.5
Glucosa	1.0
Fosfato dibásico de potasio	1.32
Fosfato monobásico de potasio	368
pH 7.0	

SOLUCIONES BUFFER:

Solución buffer 1:

Fosfato monobásico de potasio	4.5 g
Agua destilada	1 litro.
pH 4.5	

Solución buffer 2:

Fosfato dibásico de potasio	17.0 g/ litro.
Fosfato monobásico de potasio	0.5
pH 8.0	

GERMENES DE PRUEBA:

- Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.
- M. pyogenes*, var. *aureus* ATCC 6835.

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE OXITETRACICLINA (TERRAMICINA).

TECNICA.—Preparación del inóculo de prueba.—Se transfiere el cultivo de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 a una botella Roux que contenga 100 ml. de medio de cultivo sólido (A), estéril; se incuba durante 16 horas a una temperatura de 37°C. Después de este período de incubación una vez desarrollado el germen, se lava, con 20 ml. de solución salina fisiológica, estéril, el cultivo de la botella Roux, suspendiéndolo en un matraz que contenga 150 ml. de solución salina fisiológica estéril. Esta suspensión concentrada se diluye con agua destilada estéril, ajustando tal suspensión a que dé una transmisión de luz de 40% a una longitud de onda de 650 micrones, en un espectrofotocolorímetro "Spectronic 20".

Preparación de la solución patrón.—Se disuelve la cantidad necesaria de oxitetraciclina, de potencia conocida, en ácido clorhídrico 0.2 N, para tener una solución patrón con una concentración de terramicina de 2.5 microgramos por milímetro.

Serie patrón.—En tubos de ensayo de 13 x 100 mm estériles, se ponen en series de cuatro tubos, 0.20, 0.18, 0.14, 0.10 y 0.06 ml. de solución patrón que equivalen a 0.500, 0.450, 0.350, 0.250 y 0.150 mcg. respectivamente.

Preparación de la solución de las muestras incógnitas.—Se disuelven las muestras en ácido clorhídrico 0.2 N, efectuando las diluciones necesarias hasta obtener una concentración de 2.5 mcg / ml.

Serie incógnita.—En series de ocho tubos se colocan 0.14 y 0.10 ml. de la solución incógnita.

A cada una de estas series de tubos se les pone, por medio de una pipeta automática, 7 ml. de medio de cultivo líquido estéril y que ha sido previamente inoculado, agregando 3 ml. de inóculo por cada 100 ml. de medio. Una vez llenos todos los tubos se incuban durante 3 horas en baño de agua, a una temperatura constante de 37°C.

Una vez transcurrido este período de incubación, a cada tubo se le pone una gota de solución de formol (1 : 3), para evitar que el germen siga proliferando.

La turbiedad producida por la mayor o menor proliferación del germen, de acuerdo con las diferentes concentraciones del antibiótico, se mide en el "Spectronic 20". Por medio de un blanco (7 ml. de medio de cultivo líquido inoculado, pero sin proliferación del microorganismo), se ajusta el aparato a 100% de transmisión de luz a una longitud de onda de 400 micrones; se procede a hacer las lecturas de todas las series de tubos con la diferente turbiedad desarrollada.

Cálculo de la potencia.—Con las lecturas obtenidas de la serie patrón, se traza en papel milimétrico una curva de referencia; y de las lecturas obtenidas de la serie incógnita se estima la potencia de las muestras por analizar. Para efectuar los cálculos se aplica la fórmula general:

$$\frac{\text{microgramos} \times \text{dilución}}{\text{muestra} \times \text{alícuota}} : \text{potencia}$$

La manera de colocar las series: patrón e incógnita, en los tubos, se muestra en el diagrama:

Serie incógnita.					Serie patrón			
0.20	0.18	0.14	0.10	0.06	0.14	0.14	0.10	0.10

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE TETRACICLINA.

Para efectuar esta valoración se sigue la misma técnica que para la determinación de terramicina, con la única variante de que tanto la solución patrón como las soluciones incógnitas se hacen con solución buffer (1) que tenga un pH de 4.5.

Para obtener el valor de la potencia de tetraciclina en las muestras analizadas, se procede como en el caso de la terramicina, de acuerdo con las lecturas obtenidas en la escala del aparato para medir la turbiedad; se traza en papel milimétrico la curva de referencia; con los valores obtenidos de la serie incógnita y efectuando los cálculos correspondientes, aplicando la fórmula general para el caso, se procede a estimar la potencia de las muestras analizadas.

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE TRIACETILOLEANDOMICINA.

Para efectuar esta determinación, se sigue la misma técnica que en las determinaciones descritas anteriormente.

La solución patrón y las soluciones incógnitas, se disuelven en una solución de alcohol isopropílico al 80%, para tener una solución con una concentración del antibiótico de 200 mcg./ml.

Serie patrón.—En tubos de 13 x 100 mm. estériles, en series de cuatro tubos, se colocan 0.20, 0.17, 0.15, 0.10 y 0.05 ml. de la solución patrón, que corresponden a 40, 34, 30, 20 y 10 mcg. respectivamente.

Serie incógnita.—En series de ocho tubos se colocan 0.15 y 0.10 ml. de la solución incógnita.

Los siguientes pasos para obtener la potencia de las muestras analizadas, son los mismos que en los casos de la terramicina y la tetraciclina. Se efectúan los cálculos correspondientes aplicando la fórmula general.

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE NEOMICINA.

TECNICA.—Preparación del inóculo de prueba.—Se transfiere el cultivo de una cepa de *M. pyogenes* var. *aureus* ATCC 6835, a una botella Roux que contenga 100 ml. de medio de cultivo sólido (B) estéril; se incuba durante 16 horas a una temperatura de 37°C. Después se lava con 20 ml. de solución salina fisiológica estéril y se suspenden en 150 ml. de solución salina fisiológica estéril y se suspende en 150 ml. de solución salina fisiológica estéril, ajustándola a que dé una transmisión de luz de 40% a una longitud de onda de 650 micrones.

Preparación de la solución patrón.—Se hace una solución patrón de sulfato de neomicina de potencia conocida, disolviéndolo en solución buffer No. 2, para tener una solución de una concentración de 25 mcg./ml. del antibiótico.

Preparación de la solución de las muestras incógnitas.—La solución se prepara a una concentración de 25 microgramos por mililitro, disolviendo las muestras en solución buffer No. 2.

Serie patrón.—Se prepara poniendo en series de cuatro tubos, estériles, 0.20, 0.18, 0.14, 0.10 y 0.06 ml. de la solución patrón, los cuales equivalen a 5.0, 4.5, 3.5, 2.5 y 1.5 mcg., respectivamente.

Serie incógnita.—En series de ocho tubos se colocan 0.14 y 0.10 ml. de la solución incógnita.

Las series de tubos se llenan con 7 ml. de medio de cultivo líquido previamente inoculado, agregando 3 ml. de inóculo por cada 100 ml. de medio. Se incuban durante 4 horas a una temperatura de 37°C. Una vez transcurrido este período, se siguen los mismos pasos ya descritos con anterioridad en las otras determinaciones para estimar la potencia de las muestras analizadas.

III RESULTADOS Y DISCUSION

III.—RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados obtenidos en la determinación de la potencia de los antibióticos mencionados, se exponen a continuación, así como las tablas y gráficas correspondientes a cada uno.

Las valoraciones se efectuaron en productos farmacéuticos y materias primas de los laboratorios Pfizer de México.

Los resultados obtenidos por estas técnicas, en las condiciones especificadas y fijas, proporcionan resultados satisfactorios.

Estos métodos son fáciles de efectuar. La técnica a seguir es la misma para todos, con algunas variantes tales como: microorganismo de prueba; variaciones en las concentraciones de la serie patrón y de las series incógnitas; tiempo de incubación. La temperatura óptima para el desarrollo de los gérmenes de prueba, es la misma en todos los casos.

Para hacer las respectivas soluciones de las muestras analizadas, se toma en cuenta la presentación farmacéutica de los productos, ya sean: polvos, soluciones, suspensiones, etc.

TABLA N°. 1.—Lectura de la transmisión de luz, de la distinta turbiedad desarrollada por KI. pneumoniae, en la determinación de terramicina.

ml.	00.20	00.18	00.14	00.10	00.06
mcg.	00.50	00.45	00.35	00.25	00.15
Serie patrón	86.00	82.00	68.00	55.00	44.00
	86.00	80.00	68.00	57.00	45.00
	86.00	80.00	69.00	57.00	44.00
	86.00	79.00	69.00	56.00	43.00
Promedio	86.00	80.25	68.50	56.25	44.00
ml.	00.14	00.14	00.10	00.10	
	69.00	71.00	57.00	56.00	
	71.00	71.00	58.00	58.00	
	70.00	69.00	58.00	57.00	a
	71.00	72.00	58.00	58.00	
Promedio	70.25	70.75	57.75	56.25	
ml.	00.14	00.14	00.10	00.10	
	73.00	74.00	58.00	59.00	
	74.00	72.00	59.00	61.00	b
	73.00	73.00	59.00	58.00	
	73.00	73.00	58.00	59.00	
Promedio	73.25	73.25	58.50	59.25	
ml.	00.14	00.14	00.10	00.10	
	65.00	64.00	54.00	54.00	
	65.00	66.00	54.00	55.00	c
	66.00	65.00	54.00	55.00	
	66.00	65.00	54.00	55.00	
Promedio	65.50	65.00	54.00	54.75	

TABLA No. 2.—Lecturas de la transmisión de luz, de la distinta turbiedad desarrollada por *Kl. pneumoniae*, en la determinación de tetraciclina.

ml.	00.20	00.18	00.14	00.10	00.06
mcg.	00.50	00.45	00.35	00.25	00.15
Serie patrón	81.00	77.00	67.00	59.00	49.00
	82.00	76.00	67.00	59.00	49.00
	81.00	79.00	67.00	58.00	49.00
	83.00	76.00	67.00	60.00	49.00
Promedio	81.75	77.00	67.00	59.00	49.00
ml.	00.14	00.14	00.10	00.10	
	67.00	66.00	59.00	58.00	
	69.00	67.00	59.00	59.00	a
	67.00	68.00	58.00	59.00	
	67.00	67.00	58.00	59.00	
Promedio	67.50	67.00	58.50	58.75	
ml.	00.14	00.14	00.10	00.10	
	66.00	67.00	58.00	58.00	
	66.00	65.00	58.00	56.00	b
	66.00	66.00	57.00	56.00	
	66.00	67.00	58.00	57.00	
Promedio	66.00	66.25	57.75	56.75	

TABLA No. 3.—Lecturas de la transmisión de luz, de la distinta turbiedad desarrollada por *Kl. pneumoniae*, en la determinación de triacetiloleandomicina.

ml.	00.20	00.17	00.15	00.10	00.05
mcg.	40.00	34.00	30.00	20.00	10.00
Serie patrón	73.00	66.00	58.00	49.00	37.00
	71.00	63.00	58.00	49.00	38.00
	70.00	66.00	59.00	50.00	37.00
	71.00	63.00	59.00	50.00	37.00
Promedio	71.25	64.50	58.50	49.50	37.25
ml.	00.15	00.15	00.10	00.10	
	61.00	61.00	53.00	53.00	
	61.00	60.00	53.00	54.00	a
	60.00	60.00	51.00	53.00	
	63.00	60.00	52.00	54.00	
Promedio	61.75	60.25	52.25	53.50	
ml.	00.15	00.15	00.10	00.10	
	65.00	67.00	55.00	57.00	
	65.00	66.00	57.00	57.00	
	65.00	66.00	56.00	57.00	b
	65.00	67.00	56.00	58.00	
Promedio	65.00	66.50	56.00	57.25	
ml.	00.15	00.15	00.10	00.10	
	61.00	63.00	51.00	51.00	
	62.00	63.00	52.00	51.00	c
	61.00	63.00	53.00	51.00	
	61.00	63.00	51.00	51.00	
Promedio	61.25	63.00	51.75	51.00	

TABLA No. 4.—Lecturas de la transmisión de luz, de la distinta turbiedad desarrollada por *M. pyogenes* var. *aureus*, en la determinación de Neomicina.

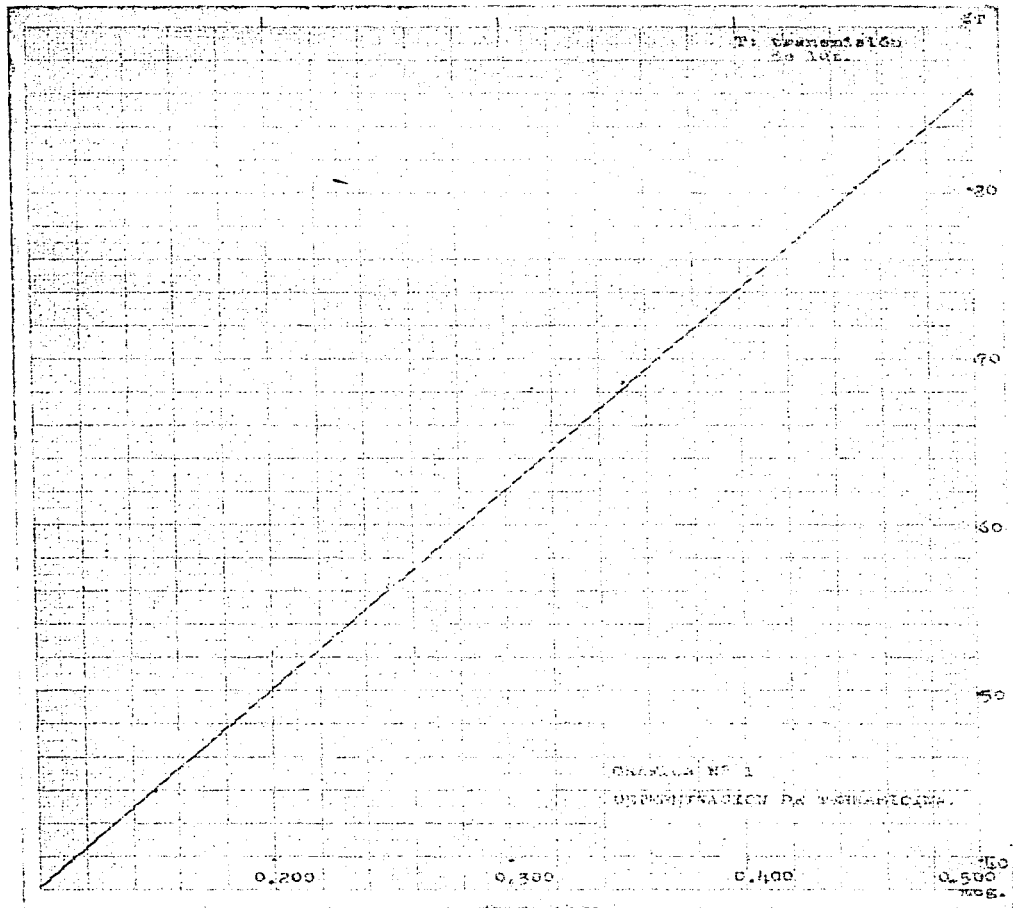
ml.	00.20	00.18	00.14	00.10	00.06
mcg.	5.00	4.5	3.5	2.5	1.5
	86.00	83.00	75.00	68.00	60.00
	88.00	82.00	76.00	65.00	60.00
	86.00	82.00	74.00	65.00	60.00
	89.00	84.00	75.00	67.00	60.00
Promedio	87.25	82.75	75.00	66.25	60.00
ml.	00.14	00.14	00.10	00.10	
	74.00	73.00	67.00	66.00	
	75.00	75.00	69.00	66.00	
	74.00	77.00	67.00	65.00	
	78.00	77.00	67.00	65.00	
Promedio	75.50	75.50	67.50	65.50	

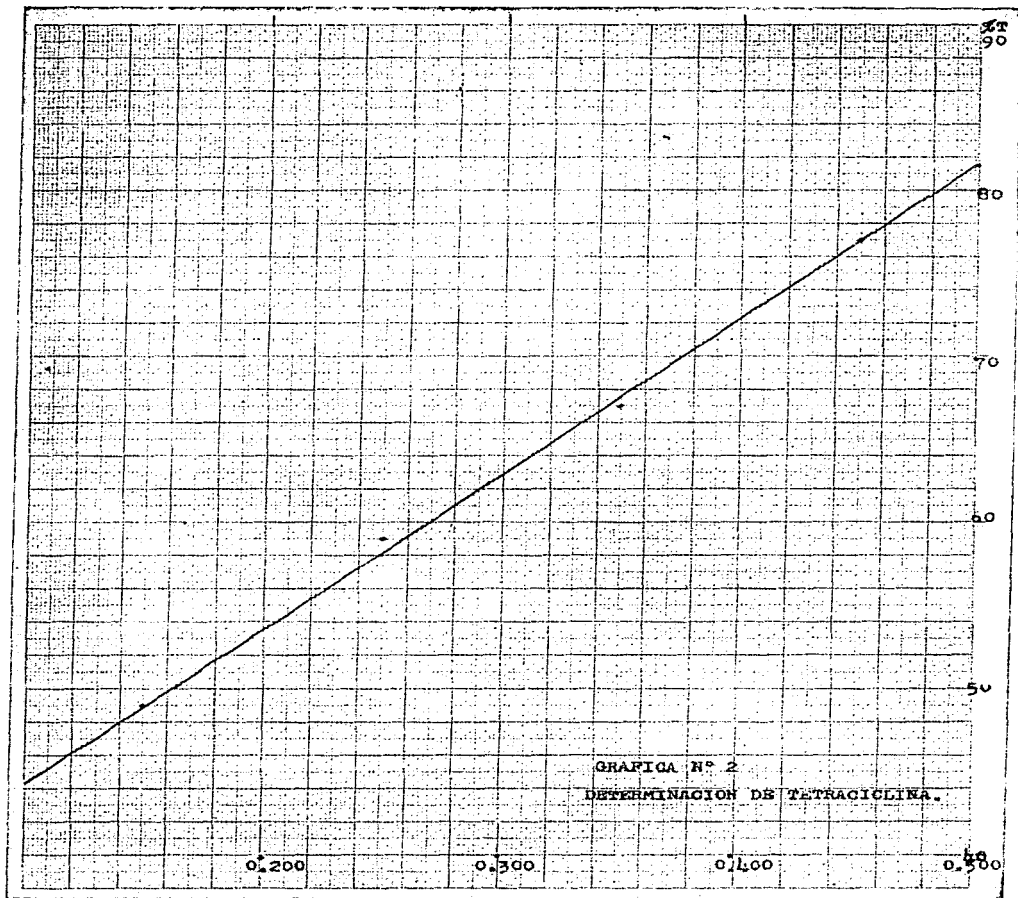
TABLA No. 5.—Resultados obtenidos en la valoración de los antibióticos

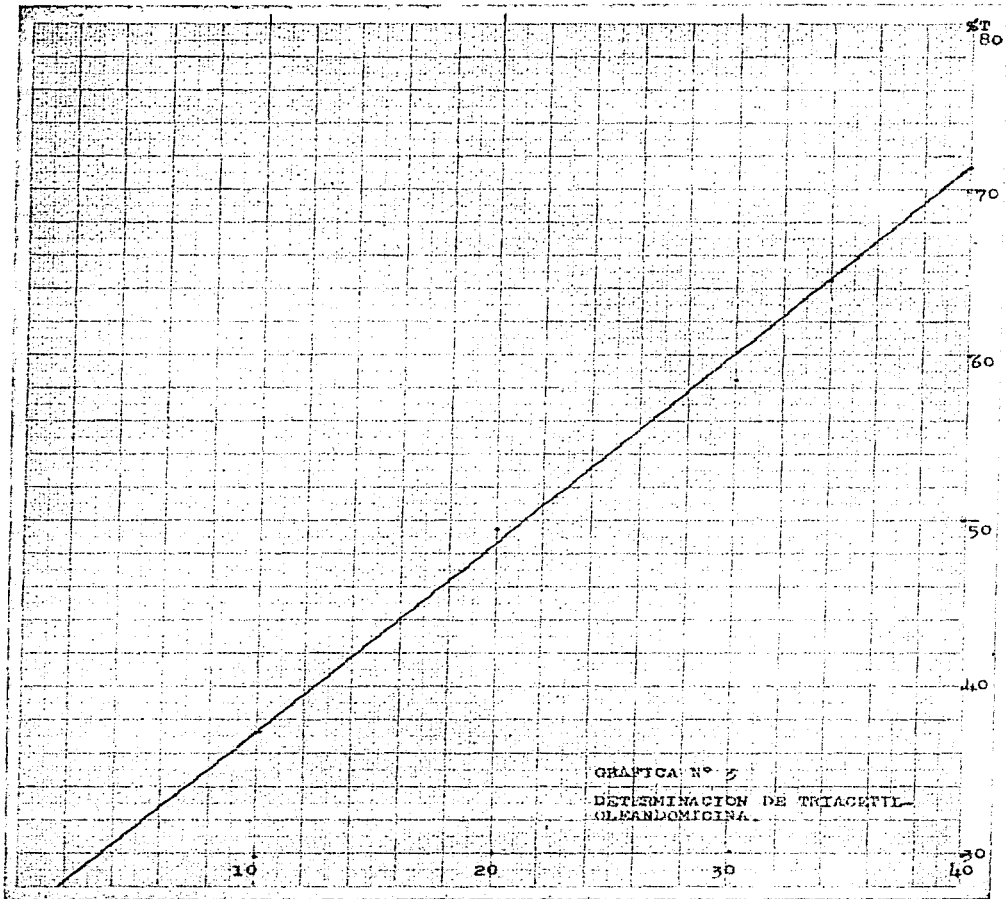
Producto	Terramicina		Tetraciclina		Triacetiloleand
	P. E.	P. T.	P. E.	P. T.	P. E.
Terramicina Intravenosa	185.0 mg/g	179.0 mg/g			
Terramicina Intramuscular Preconstituída	55.0 mg/ml	55.0 mg/ml			
Terramicina Jarabe	28.6 mg/ml	27.6 mg/ml			
Tetraciclina N.S.			984.0 mg/g	975.0 mg/g	
Sigmamicina TAO Jarabe			23.9 mg/ml	23.5 mg/ml	9.9 mg/ml
Sigmamicina TAO Cápsulas					286.8 mg/g
TAO N. S.					929.0 mg/g
Diapec					
Potencia Encontrada:	P. E.				
Potencia Teórica:	P. T.				

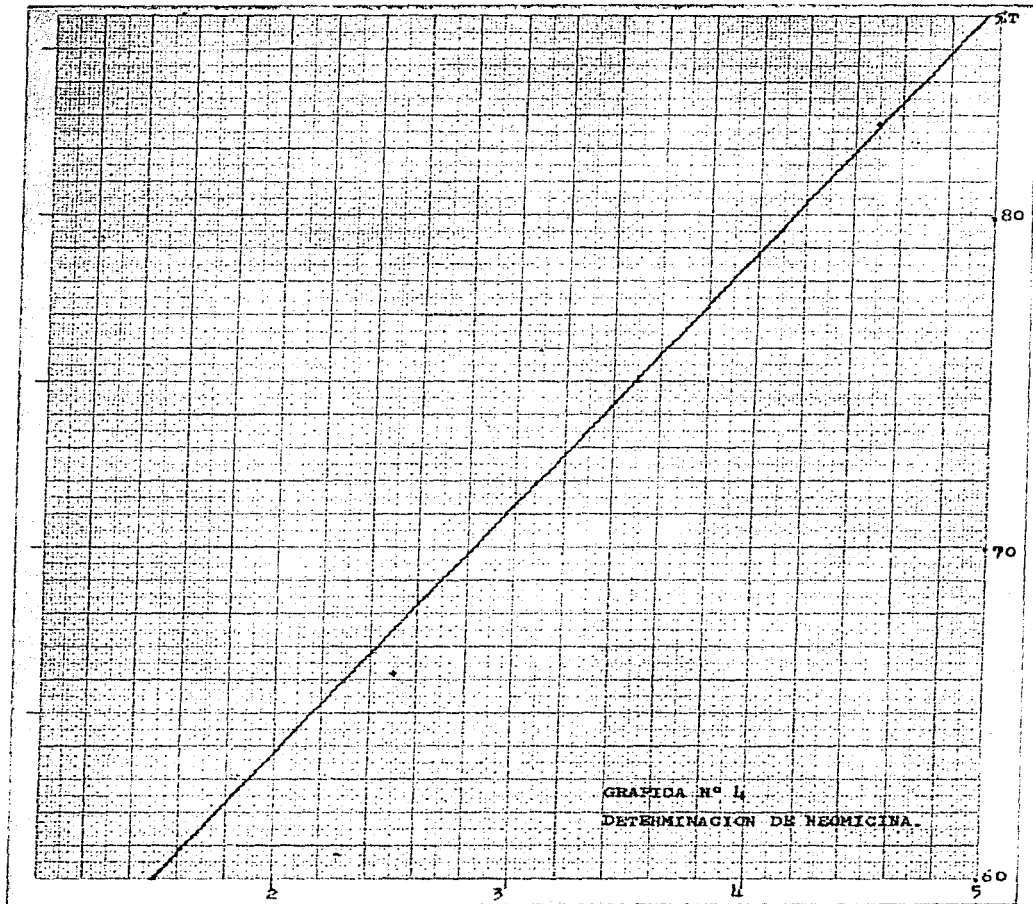
LA No. 5.—Resultados obtenidos en la valoración de los antibióticos.

	Tetraciclina		Triacetiloleandomicina		Neomicina	
	P. E.	P. T.	P. E.	P. T.	P. E.	P. T.
0 mg/g						
0 mg/ml						
6 mg/ml						
	954.0 mg/g	975.0 mg/g				
	23.9 mg/ml	23.5 mg/ml	9.9 mg/ml	8.3 mg/ml		
			286.8 mg/g	275.0 mg/g		
			929.0 mg/g	800.0 mg/g		
					8 mg/ml	7.6 mg/ml









IV RESUMEN Y CONCLUSIONES

IV.—RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Los métodos microbiológicos turbidimétricos, consisten esencialmente en preparar una serie de tubos con medio de cultivo líquido que contengan, además, una diferente concentración del antibiótico por determinar (patrón de referencia). Las muestras se diluyen de tal modo, que su concentración produzca una turbiedad semejante a la de los valores centrales de la serie patrón.

El medio de cultivo se inocula en masa, con el germen de prueba adecuado, antes de ser repartido en los tubos que ya contengan las soluciones del antibiótico; y se incuban en un baño de agua a una temperatura óptima (37°C .), que permite, en el término de unas cuantas horas, (3 a 4), observar una gradación en las turbiedades que puede ser medida mediante un aparato adecuado. A donde hay mayor cantidad de antibiótico, el germen es más inhibido y la turbiedad menor. Donde hay menor concentración del antibiótico, el microorganismo prolifera acentuadamente, por lo que la turbiedad registrada es mayor.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se mide la turbiedad producida y con estos valores se traza en papel milimétrico una curva patrón, colocando en la absisa las distintas concentraciones de la serie de referencia y en la ordenada los valores obtenidos por la turbiedad producida por el germen de prueba. Las lecturas de la turbiedad de las muestras analizadas se relacionan con la curva de referencia. Se efectúan los cálculos correspondientes, para obtener el valor de la potencia del antibiótico analizado.

TABLA No. 6.—Resumen de las técnicas empleadas.

Antb.	Germen de prueba	conc. de la sol. patrón mcg/ml.	Temperatura de incubación.	Horas	Resultado.
TM	Kl. pneumoniae.	2.5	37°C.	3	Satisf.
TTC	"	"	"	"	"
TAO	"	200	"	"	"
NM	Staph. aureus.	25	"	4	"

TM: Terramicina.

TTS: Tetraciclina.

TAO: Triacetiloleandomicina.

NM: Neomicina.

CONCLUSIONES.

La técnica expuesta para la determinación de terramicina, tetraciclina y triacetiloleandomicina, es la que proporciona resultados más exactos, debido a que los valores de la turbiedad producida por el microorganismo de prueba, al ser inhibida su proliferación por el antibiótico, son proporcionales a las distintas concentraciones de la serie de referencia.

En tanto, en la técnica para la determinación de neomicina, los valores de la turbiedad desarrollada por el microorganismo de prueba, presentan intervalos muy pequeños entre sí, aun cuando las concentraciones de la serie patrón estén en intervalos relativamente mayores, ocasionando, por lo tanto, una menor exactitud en los resultados.

En estos métodos, factores tales como: temperatura y tiempo de incubación; pH del medio de cultivo; condiciones de limpieza y esterilidad en que se efectúa el trabajo; etc., pueden hacer variar los resultados obtenidos, por lo que es imprescindible efectuar, al mismo tiempo y en idénticas condiciones, la serie patrón y las muestras.

Dentro de los procedimientos biológicos, los métodos turbidimétricos permiten alcanzar mayor exactitud y reproducibilidad en los resultados, siempre que se opere en condiciones especificadas y fijas.

Son los métodos más sensibles que permiten determinar la potencia, utilizando cantidades muy pequeñas del antibiótico.

Con esta técnica el período de incubación es muy breve, en contraposición con otros métodos biológicos en que, por lo menos, hay que esperar de un día a otro para poder obtener los resultados.

Presentan la desventaja de asumir mucho trabajo, a causa de la manipulación de gran número de tubos y que exige que se lleve a cabo en condiciones de gran limpieza y que sean estériles.

Los métodos turbidimétricos no pueden emplearse si se trata de analizar los antibióticos en soluciones muy turbias o que estén contaminadas con algún microorganismo. Aunque un fuerte inóculo con el organismo de prueba y lo breve del período de incubación, disminuye mucho los riesgos de interferencias bacterianas indeseables.

V BIBLIOGRAFIA

V.—BIBLIOGRAFIA.

- ABRAHAM E. P. y NEWTON G. G. F. Química y clasificación de antibióticos. BRIT. MED. BULL. 16; 3- 10; 1960.
- BROWNLEE C. Antibióticos (con referencia en particular al modo de acción). ANN. REV. MICROBIOL. 5; 197-208; 1951.
- CARTER H. C. y FORD J. H. Bioquímica de los antibióticos. ANN. REV. BIOCHEM. 19; 487-516; 1950.
- CELMER W. D. ELS H. y MURAL K. Derivados de la oleandomicina. Preparación y características. ANTIBIOTICS ANNUAL. New York Medical Encyclopedia. 456-482; 1957 - 1958.
- CHAIN E. B. Química y bioquímica de los antibióticos. ANN REV. BIOCHEM. 27; 122 - 167. 1958.
- DOWLING H. F. Tetraciclina. ANTIBIOTICS ANNUAL. New York Medical Encyclopedia Inc. 1957 - 1958.
- ENGLISH A. R. y BRIDE T. J. Triacetiloleandomicina. Estudio biológico. ANTIB & CHEM. 8; 429; 1958.
- ELS H., MURAL K. CELMER W. D. Oleandomicina. AM. CHEM SOC. 15 N; 1956.
- GARROD L.P. y PAMELA M. WATERWORTH. Comparación de las cuatro tetraciclinas. ANTIBIOT. ANNU. 1959-1960.
- GAVIN J. J. Análisis microbiológico. Los métodos de difusión. APPL. MICROBIOL. 5; 235 - 243; 1957.

- GROVE D. C. y RANDALL W. A. Métodos para ensayo de antibióticos. Manual de laboratorio. Med. Encycl. Inc. 1955.
- JONES W. F. y FINLAND M. Combinaciones de antibióticos. Tetraciclina, eritromicina y oleandomicina, y combinaciones de tetraciclina con cada uno de estos agentes. Comparaciones de las actividades in vitro y acción antibacteriológica después de una administración oral. NEW ENGLAND J. MED. **257**; 481; 1957.
- JESLYN D. A. y GILBRAITH M. Un método turbidimétrico para el ensayo de antibióticos. J. BACTERIOL. **59**; 11 - 16; 1950.
- LEPPER M. H. Aureomicina. Medical Encyclopedia. N. Y. 1956.
- McCORMICK J.R.L.S; JOLONDER N. O., HIRCH U., HENSEN E. R. y DOERCHUK A. P. Una nueva familia de antibióticos: las tetraciclinas. J. AM. CHEM SOC. **79**; 4562 - 4561; 1956.
- MUSSELMAN M. M. Terramicina (oxitetraciclina). Medical Encyclopedia Inc. N. Y. 1956.
- PRATT R. y DUPRENOY J. Antibióticos. J. B. Lippincot Co. Filadelfia 1949.
- PRESCOTT S. C. y DUNN C. G. Microbiología industrial. McGraw Hill Book Co. N. Y. 1959.
- SANCHEZ MARROQUIN A. Principios de microbiología industrial. Editorial Química, S. A. 1961.
- THE MERCK INDEX OF CHEMICAL AND DRUGS. Merck and. Co. Inc. Pringting. 1960.
- THE FARMACOPEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA. Mack Printing Co. Easton. 1960.

WELCH H; RANDALL W. A., REEDY R. J. y OSWALD E. J.
Variaciones en la actividad antimicrobiana de las tetraciclina.
ANTIB & CHEM. 4; 471 - 745; 1954.

WYSS O., SMITH N. G., HOBBY G. L., OGINSKY E. Y. y
PRATT R. Simposium sobre el modo de acción de los antibióticos.
BACT. REVS. 17; 17 - 49; 1953.