

## Ensayo sobre preparación de penicilina cruda y su purificación

Por F. MODERN, E. M. de SOSA y R. ILLA

---

En el primer trabajo que publicamos, sobre algunos medios de cultivo para la preparación de penicilina <sup>(1)</sup> comprobamos, que en los medios líquidos usuales sólo obteníamos alrededor de 4 unidades Oxford (U. Ox.). Otros autores, Abraham y Chain <sup>(2)</sup> encuentran con el medio sintético de Czapek, también sólo un promedio de 4 U. Ox.

Sembrando en medios semi-sólidos (loc. cit.) llegamos a obtener hasta 50 U. Ox. Pero este método para la producción en gran escala resulta difícil y demanda una técnica larga y para el tratamiento local resulta irritante por las substancias que solubilizan el afrecho. Por este motivo, decidimos ensayar otros medios líquidos, que nos dieran por lo menos el mismo valor que los cultivos en medios semi-sólidos.

Las plantas industriales para preparar penicilina en Estados Unidos, usan el método de cultivos en superficie o el desarrollo en tanques con cepas especiales. Para este último procedimiento <sup>(3)</sup>, se usa una cepa de *Penicillium notatum*, cuya característica es la de desarrollar en profundidad.

Nosotros usamos frascos asimétricos de Povitzky de 2 litros de capacidad y pudimos comprobar, que obteníamos buen rendimiento con 500 cm<sup>3</sup> en cada frasco.

Para purificar la penicilina cruda, comenzamos aplicando el método de Challinor y Mac Naughton <sup>(4)</sup>, modificándolo luego y adaptándolo de acuerdo con las existencias de disolventes disponibles en el país. Usamos para la concentración final el cloroformo que permite reducir 10 veces el volumen y con una purificación apreciable. Para la purificación final de la penicilina por adsorción, no usamos la cromatografía por no disponer del óxido de aluminio Brokman y aunque en parte este método se ha abandonado, Catch, Cook y Heilbron <sup>(5)</sup> consiguen una penicilina de 500 U. Ox. por miligramo,

Presentado para publicar el 3 de octubre de 1944.

haciendo la cromatografía por un carbonato alcalino térreo con un gel silíceo agregado.

Tratamos de obtener una penicilina purificada de más de 100 U. Ox. por miligramo por el momento, ya que según Goghil (<sup>6</sup>) puede usarse por vía venosa siempre que contenga entre 100 y 500 U. Ox. por miligramo. Paralelamente hemos hecho ensayos de inocuidad con buen resultado, en la penicilina purificada por nosotros, como se verá más adelante. El mismo autor antes citado, emplea como penicilina patrón para las mediciones un producto muy purificado que contiene 1650 U. Ox. por miligramo.

#### MEDIOS USADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA PENICILINA CRUDA

En todos los medios líquidos usamos el agua de maceración de maíz (corn-steep) (\*) ensayando la dilución óptima y la influencia del pH inicial. Uno de los medios que usamos frecuentemente y con el que se consigue buen valor contiene las siguientes sustancias: 200 cm<sup>3</sup> de agua de maceración de maíz diluída al  $\frac{1}{4}$  con agua (concentración inicial del agua de maceración, 17°Bé), 1 cm<sup>3</sup> de PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> al 10 %, 1 cm<sup>3</sup> SO<sub>4</sub>Mg, 7 H<sub>2</sub>O al 5 %, 0,5 cm<sup>3</sup> de Cl<sub>2</sub>Zn al 1 %, 0,2 cm<sup>3</sup> mejorador II, 0,2 cm<sup>3</sup> mejorador III, 5 cm<sup>3</sup> de hidrolizado de caseína y 4 gr de lactosa. En nuestro primer trabajo indicamos la fórmula de los mejoradores y la preparación del hidrolizado de caseína. Se hicieron ensayos con agua de maceración diluída  $\frac{1}{8}$  con agua, pero los mejores resultados se obtuvieron con la dilución  $\frac{1}{4}$  y a pH 5,5 en vez de pH 7,0. Sin embargo, con este medio nunca se obtienen rendimientos de más de 20 U. Ox. por centímetro cúbico a los nueve días de incubación a 24°C. Otro medio muy usado y que da un valor superior al anterior es una modificación del medio de Hoby y que contiene SO<sub>4</sub>Mg crist. NO<sub>3</sub>Na, ClK, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, SO<sub>4</sub>Fe, SO<sub>4</sub>Zn, glicerina, lactosa y una pequeña proporción de agua de maceración de maíz (14 gr a 25°Be en 3,5 litros del medio).

Si bien con este medio y cepas de pocos repiques se obtienen hasta 30 U. Ox. es un medio apto para el tratamiento local con penicilina cruda, no siendo irritante. Con este medio, se obtuvieron los mejores resultados clínicos en los ensayos realizados por el Dr. Tabanera y que los comunica aparte.

Para la aplicación local previamente se hizo isotónica con cloruro de sodio, se llevó a pH 7,0 - 7,2 con ácido fosfórico y luego se filtró por bujía o por filtro Seitz.

(\*) Agradecemos a la Refinería de Maíz S. R. L. el envío del agua de maceración.

Por filtración por bujía se pierde un 10 % del valor primitivo, en cambio por filtro Seitz mantiene íntegramente su valor.

Conservada en cámara fría, estudiamos la curva de atenuación de la penicilina cruda, comprobando que a los 10 días había perdido el 20 % de su valor primitivo.

Entregamos en general para la aplicación local penicilina cruda de más de 20 U. Ox. por  $\text{cm}^3$ , cantidad suficiente si se siguen las indicaciones del British Medical Journal (7).

Otro medio que dió un resultado muy bueno y que es mejor para la obtención de penicilina en escala industrial es el siguiente: A 600  $\text{cm}^3$  de agua de maceración de maíz a 25°Be., se le agregan 8400  $\text{cm}^3$  de agua destilada y se lleva a pH 5.5 con NaOH al 50 %. Además contiene 60  $\text{cm}^3$  de hidrolizado de caseína, 3  $\text{cm}^3$  del mejorador II y 3  $\text{cm}^3$  del mejorador III, 240 gr de lactosa, 0,5 gr de  $\text{SO}_4 \text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1 gr de  $\text{PO}_4 \text{HK}_2$  y 0,1 gr de  $\text{Cl}_2 \text{Zn}$ .

Con la cepa enviada por Fleming (\*) se obtuvo un medio rico en penicilina con más de 60 U. Ox. por  $\text{cm}^3$ .

#### CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE *PENICILLIUM NOTATUM*

Las cepas de *penicillium notatum* fueron siempre sembradas en un medio compuesto por mosto de malta y agar de acuerdo con la técnica que nos indicó el Dr. Sordelli.

A una parte de malta verde molida, se le agregó 4 partes de agua caliente a 60°C, manteniendo esta temperatura por espacio de 3 horas, luego se llevó a pH 5,6 se le agregó 1,5 % de agar y esterilizó a 115° durante 20 minutos. Sembrando el *penicillium* en agar inclinado con este medio se observa a las 24 horas (a 24°C) puntos blancos en la superficie. A las 48 horas todo el agar está cubierto de una película blanca (micelio) y a las 72 horas el aspecto bien verde indica la presencia de esporas.

En general, después del 5° al 7° repique, la cepa se atenúa y es necesario comenzar de nuevo con cepas liofilizadas o conservadas en arena o humus, en presencia de anhídrido fosfórico y vacío.

Hemos estudiado diferentes líquidos para suspender los esporos antes de la siembra: agua de levadura, solución fisiológica, los medios antes descritos y por último agua destilada. Los mejores resultados los obtuvimos suspendiendo los esporos en agua destilada. En fin el estudio de este problema corresponde a un micólogo ya

(\*) Agradecemos al Sr. Millington-Drake y Dr. Scholsberg el habernos entregado la cepa cedida por el Dr. Fleming.

que en la rutina diaria deberá proveer en cada caso, una cepa buena productora de penicilina y que quizá pueda ser activada artificialmente.

Entre nosotros el Dr. Negroni está abocado a este problema y por procedimientos especiales ha obtenido medios ricos en penicilina.

#### ENSAYOS SOBRE LA ADSORCIÓN DE LA PENICILINA CRUDA

Empleamos diferentes adsorbentes comenzando con el gel  $\text{Al}(\text{OH})_3$  que se usa en la preparación de vacuna antidiftérica. Se trató de hacer la adsorción entre pH 4 y 5 y luego la elución a pH 6.5 y 7.5 con mezclas Buffer. Se empleó un  $\text{Al}(\text{OH})_3$  que contenía 0,1 mg/cm<sup>3</sup> y se hicieron las siguientes mezclas:

Pen. cruda	10 cm <sup>3</sup>	+ 0.5 sol. $\text{Al}(\text{OH})_3$	
»	»	+ 1.0	»
»	»	+ 2.0	»
»	»	+ 4	»

Idéntica operación se hizo a pH 4 y después de una agitación de media hora se centrifugó y el precipitado se eluyó con mezcla buffer de fosfatos a pH 6.5

En estas condiciones no se adsorbe la penicilina cruda obteniéndose sólo una adsorción parcial de las impurezas.

Ensayamos la adsorción con carbón activo al 10 %, 5 % y 2,5 % a pH 7. El líquido sobrenadante da menos de  $\frac{1}{3}$  del valor primitivo, pero en ningún caso se consiguió eludir el resto adsorbido en el carbón y llevado a pH 3.8. Tampoco obtuvimos buenos resultados tratando de eluir la penicilina adsorbida en el carbón con disolventes orgánicos. Si bien en estos casos, la elución es mayor, queda casi el 50 % fijado. Sin embargo, es posible que este último método modificando las variables del sistema pueda utilizarse en el futuro.

Una forma de reducir el volumen primitivo y que nos dió en algunos casos buen resultado, consiste en evaporar a baja temperatura la penicilina cruda reduciendo su volumen al  $\frac{1}{10}$ .

#### PURIFICACIÓN QUÍMICA DE LA PENICILINA

Hicimos diferentes ensayos de purificación química de la penicilina partiendo de una penicilina cruda de 15 U. Ox. por cm<sup>3</sup> y otros de más de 30 U. Ox. por cm<sup>3</sup>. Seguimos técnicas someramente descritas por diferentes autores y que figuran en principio de este

trabajo. La penicilina cruda a 0°C, fué acidificada con ácido fosfórico a pH 2.0-2.2 y luego se le agregó igual volumen de acetato de amilo que previamente fué enfriado a -10°C.

Se agitó con el agitador ultrarrápido de Blendorf, separando la emulsión que se forma con centrífuga de Scharples. Esta primera operación presenta algunas dificultades pues la emulsión es persistente y a veces se hace engorrosa la separación de los dos líquidos. Luego con Ba (OH)<sub>2</sub> N/5 y agua enfriado se extrajo a pH 6 la penicilina del acetato de amilo, pasando al agua al estado de penicilina de bario. Operando rápidamente se consigue hasta esta etapa recuperar el 100 por 100 del valor por primitivo. Partimos de una penicilina que contenía 1.07 U.Ox. por mg. Al estado de penicilina de bario, después del pasaje por acetato de amilo se obtienen ya 40 U. Ox./mg., es decir una purificación de casi 40 veces. A continuación se hicieron 2 pasajes por éter siguiendo el método anterior y reduciendo los volúmenes cada vez. En estos primeros ensayos recuperamos al final el 50 % de las unidades primitivas y sólo llegamos a una pureza de 60 U. Ox./mg.

Con el objeto de emplear menos acetato de amilo y éter, tratamos de concentrar la penicilina cruda por adsorción y por evaporación a baja temperatura antes de comenzar su purificación química. Se consigue concentrar al  $\frac{1}{10}$  el volumen primitivo empleando un concentrador a bajo vacío (Crouvelle). El inconveniente mayor estriba en la formación de espuma durante esta operación y pérdidas en las unidades que en muchos casos sobrepasan al 20 % del valor original. Además, la primera emulsión con acetato de amilo es muy persistente, teniendo que pasar los líquidos varias veces por la centrífuga para separarlos completamente. Antes de concentrar al vacío, conviene que la penicilina cruda tenga un pH de 6.5. Ensayando una purificación química con penicilina cruda de mayor valor inicial ( $\pm 30$  U.Ox./cm<sup>3</sup>), encontramos sobre 18.000 unidades después de extraída con acetato de amilo y éter, 11.000 unidades, es decir que recuperamos el 61 % del valor primitivo.

Con este simple procedimiento se consiguió obtener una penicilina que contenía 120 U.Ox./mg al estado de sal de bario. Se transformó luego en penicilina sódica por el agregado de un exceso de SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y filtración de sulfato bórico formado. Se consigue aun reducir el volumen y aumentar su purificación extrayendo la penicilina a pH 2.0-2.2 con el 10 % de cloroformo y seguida de una elución en agua a pH 6.0.

La técnica seguida fué la siguiente: Por cada litro de penicilina

ya purificada por extracción con acetato de amilo y éter y que contenía 120 U.Ox./mg se le agregaron 100 cm<sup>3</sup> de cloroformo a pH 2.0-2.2 (operación a menos de 4°C). Al cloroformo luego se le agregó medio volumen de agua (50 cm<sup>3</sup>) a pH 6 con bicarbonato de sodio saturado de anhídrido carbónico. En esta forma pasa la penicilina cuantitativamente al agua al estado de sal de sodio. La liofilización se hace a continuación de la reducción del volumen en la forma indicada anteriormente.

Como el acetato de amilo es una producción limitada en el país y no pudiéndose utilizar en la preparación industrial por los grandes volúmenes requeridos, ensayamos el acetato de butilo cedido gentilmente por el Dr. Ladislao Retti de «Atanor». El acetato de butilo es menos costoso y la producción cubriría la demanda de los fabricantes de penicilina.

Siguiendo aproximadamente las técnicas antes descritas, con una extracción con acetato de butilo, una de éter y finalmente una purificación y concentración con cloroformo partiendo de 750 cm<sup>3</sup> de penicilina cruda, obtuvimos un volumen de 10 cm<sup>3</sup> con un contenido de 1175 U.Ox./cm<sup>3</sup>. La pureza era de más de 120 U.Ox./mg de extracto seco y como partimos de 13.000 unidades y recuperamos 11.750 unidades, corresponde a un rendimiento excepcional del 90 % de las unidades originarias. No se nos escapa que este rendimiento es exageradamente elevado y en la práctica industrial difícilmente alcanzable.

Con esta penicilina purificada hicimos un ensayo exploratriz de inocuidad, empleando 50.000 unidades por kilogramo ratón, en vez de 100.000; inyectados 5 ratones por vía intravenosa no murió ninguno en las 48 horas.

Dejamos para más adelante el ensayo de pirógenos ya que estas muestras no fueron tomadas en condiciones para este ensayo.

Para la medición se siguió la técnica descrita por Schmidt y Moyer (<sup>s</sup>), y a falta de penicilina patrón en las mediciones se utilizó una penicilina de fabricación norteamericana que contenía 375 U.Ox./mg.

#### RESUMEN

En el trabajo presentado se describen los medios usados para la preparación de penicilina que dan rendimientos que oscilan entre 20 y más de 60 U.Ox./cm<sup>3</sup>, estudiando cuidadosamente la influencia de las diferentes sustancias que lo integran.

Después de muchos ensayos se llega a la obtención de un caldo

que sistemáticamente da más de 60 U.Ox./cm<sup>3</sup>. Entre los elementos más importantes que integran este medio de cultivo del penicillium notatum figuran el agua de maceración de maíz (corn-steep) y el hidrolizado de caseína.

Las cepas de penicillium notatum hay que conservarlas cuidadosamente desecadas al vacío o en agar mosto, utilizando siembras con pocos repiques. La cepa que nos entregó el Sr. Millington Drake, de parte del Dr. Fleming dieron óptimos resultados.

El proceso de purificación de la penicilina cruda es laborioso y delicado y quedan limitados a la distribución entre distintos solventes orgánicos (acetato de amilo, éter y cloroformo) y a los métodos de adsorción.

Pudimos así obtener una penicilina que contenía más de 120 unidades por miligramo de extracto seco y que sometida a la prueba de toxicidad en ratones, resultó ser inocua. Como el acetato de amilo es de producción limitada y costoso en el país y no pudiéndose utilizar en escala industrial, ensayamos el acetato de butilo con excelentes resultados. Este último disolvente cubriría con exceso la demanda de los fabricantes de penicilina.

Por último se describe un método para purificar y concentrar la penicilina utilizando como último disolvente el cloroformo.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) MODERN, F., ILLA, R., ARZENO, M. — *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 1944, **20**, 100.
- (2) ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. — *Brit. Exp. Path.*, 1942, **23**, 103.
- (3) ELFER, A. — *The Scientific Monthly*, 1944, 405.
- (4) CHALLINOR, S. W. y MAC NAUGHTON, J. J. — *Path. Bact.*, 1943, **55**, 441.
- (5) CATCH, J. R., COOK, A. H. y HEILBRON, I. M. — *Nature*, 1942, **150**, 633.
- (6) COGHILL, R. — *Chemical and Engineering News*, 1944, **22**, 522.
- (7) ALSTON, J. M. — *Brit. Med. J.*, 1944, **1**, 654.
- (8) SCHMIDT, W., MOYER, A. — *J. Bact.*, 1944, **47**, 199.