Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio sobre polipétidos funguistáticos producidos por una cepa de Bacillus subtilis

Burachik, Moisés

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Burachik, Moisés. (1963). Estudio sobre polipétidos funguistáticos producidos por una cepa de Bacillus subtilis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1162_Burachik.pdf

Cita tipo Chicago:
Burachik, Moisés. "Estudio sobre polipétidos funguistáticos producidos por una cepa de Bacillus subtilis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1162_Burachik.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio sobre polipéptidos funguistáticos producidos por una cepa de *Bacillus subtilis*

Moisés Burachik

Resumen de la

Tesis presentada para optar al

Título de Doctor en Química

11 2

Año 1963

Padrino de tesis

Profesor Dr.Alejandro C. Paladini

El objeto del trabajo fué la purificación y el estudio químico y biológico de un preparado funguistático producido por una cepa de **Bacillus subtilis**, derivada de la productora de bacilomicina A.

Para dar una conveniente ubicación a los materiales en estudio dentro del panorama de los péptidos antibióticos de origen bacteriano, al cual pertenecen, se realizó una somera descripción de un gran número de sustancias de esta naturaleza que han sido halladas. En la misma se informó sobre los problemas que presenta la química de esta clase particular de péptidos activos, y permitió también formular un contexto de conclusiones más o menos generales que fueron discutidas (Capítulo I).

La obtención de la cepa productora y del material antibiótico, así como los métodos para la evaluación de la actividad de este último, fueron luego descriptos (Capítulos II y III), desarrollándose enseguida las experiencias de purificación (Capítulo IV), que hubo razonables motivos para emprender con las técnicas de distribución en contracorriente. Estas experiencias, además de involucrar un amplio examen de las características de partición del antibiótico, resultaron en el aislamiento de tres péptidos similares en varias de sus propiedades químicas, pero que presentaban diferente actividad biológica, como mostraron los estudios a que fueron sometidos posteriormente (Capítulos V y VI).

Por cromatografía sobre papel de los productos de hidrólisis ácida total de los tres péptidos así obtenidos, se identificaron en todos los casos los mismos aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, serina y tirosina. El análisis cuantitativo demostró que en los tres péptidos la relación molar entre los aminoácidos era la misma: 3:1:1:1:1 , en el orden arriba indicado. Las recuperaciones obtenidas fueron del 80 al 92 % del peso; lo axiguo del material disponible y su no absoluta pureza, no permitieron mejorarlas. Esto deja abierta la posibilidad de que existan en las moléculas de estos péptidos, otros fragmentos no detectados en este estudio.

No se observaron entre estos péptidos, diferencias en lo que respecta al grado de bloqueo por grupos amida de los carboxilos no comprometidos en uniones peptídicas. Se halló prácticamente la misma cantidad de nitrógeno amídico por unidad de masa.

Las medidas de la extinción á 275 mμ , permitieron calcular los pesos moleculares correspondientes a un residuo de tirosina por mol de péptido. Estos valores, y los obtenidos a partir de la medición del nitrógeno amídico, concordaron con los que pueden deducirse de la composición en aminoácidos. Para las tres fracciones resultaron ser algo superiores á 1000.

La ausencia de derivados N-dinitrofenil sustituídos en el producto de reacción con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB), in-

dica que ninguno de los tres péptidos posee grupos amino libres; esto coincide con la imposibilidad de revelarlos sobre papel con ninhidrina. La disminución de la intensidad de la mancha de tirosina en los cromatogramas de los hidrolizados de dichos productos de reacción con FDNB, sugiere la formación de un derivado O-sustituído de la tirosina.

Los espectros antibióticos de los tres péptidos, demostraron ser significativamente diferentes. Es interesante destacar que la fracción III, menos activa sobre la mayoría de los microorganismos probados, inhibió al Trichophyton tonsurans a menor concentración que las otras dos fracciones. La fracción II resultó particularmente activa sobre Penicillium chrysogenum, y la I inhibió el desarrollo de una cepa de Corynebacterium diphteriae.

Determinaciones realizadas con otras fracciones purificadas, aisladas en los estudios preliminares, indican la existencia de alguna correlación entre el poder hemolítico y la actividad antibiótica, en el sentido de que un aumento de ésta, es acompañado por un incremento de aquél.

Con excepción de los valores del coeficiente de partición, ningún otro de los criterios experimentales utilizados en este trabajo permitió establecer alguna distinción entre las propiedades químicas de los tres péptidos, que pudiera servir de base para explicar su diferente actividad biológica. Estas observaciones sugieren que esas diferencias pueden residir en la estructura.

Si bien los resultados del análisis cuantitativo de aminoácidos , la ausencia de residuo N-terminal y los valores concordantes hallados para el peso molecular, son consistentes con adjudicar a los materiales estudiados un grado de pureza razonablemente elevado, es necesario indicar que ellos no se comportaron como estrictamente puros en las distribuciones que condujeron a su aislamiento. Ello, al mismo tiempo que reproduce una situación muy frecuente en la resolución de péptidos antibióticos de origen bacteriano, demuestra hasta qué punto llegan las exigencias que deben satisfacer los métodos de fraccionamiento, para alcanzar el adecuado poder resolutivo.

Todos los datos obtenidos coinciden en ubicar estos antibió - ticos dentro del grupo de las bacilomicinas, con las que concuerdan en las propiedades físicas, químicas y biológicas estudiadas.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio sobre polipéptidos funguistáticos producidos por una cepa de Bacillus subtilis

Moisés Burachik

Tesis presentada para optar al

Título de Doctor en Química

Año 1963

T 112

Padrino de tesis

Profesor Dr. Alejandro C. Paladini

I N D I C E

I. ANTIBIOTICOS POLIPEPTIDICOS DE ORIGEN BACTERIANO... pág. 1

1.- Introducción 1

2.- Antibióticos activos sobre Eubacteriales y micobacteria 2

3.- Antibióticos activos sobre hongos 30

4.- Conclusiones 37

II. PRODUCCION DEL MATERIAL ANTIBIOTICO ESTUDIADO 41

1.- Introducción 41

2.- Cepa utilizada 42

3.- Preparación 43

III. ENSAYOS BIOLOGICOS 46

1.- Actividad antibiótica 46

2.- Actividad hemolítica 51

IV. PURIFICACION DEL MATERIAL ANTIBIOTICO 52

1.- Introducción 52

2.- Experiencias preliminares de distribución en contracorriente 53

3.- Fraccionamiento 69

V. ESTUDIO QUIMICO DE LAS FRACCIONES ACTIVAS OBTENIDAS 75

1.- Hidrólisis total y cromatografía sobre papel 75

2.- Análisis cuantitativo de aminoácidos 76

3.- Aminoácido N-terminal 79

4.- Determinación de Nitrógeno amídico 81

5.- Espectro de absorción ultravioleta 82

VI. ESTUDIO BIOLOGICO DE LAS FRACCIONES ACTIVAS ..... pág. 84

VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES 86

VIII. BIBLIOGRAFIA 89

P R O L O G O

A mediados del año 1959 , el Profesor Alejandro C. Paladini, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de esta Universidad, me ofreció la oportunidad de realizar bajo su dirección, el estudio de un preparado antifúnguico producido por una cepa de Bacillus subtilis, la bacilomicina A. Este antibiótico había sido descubierto 10 años antes por el Ing. Agr. Augusto P. Cercós, en el entonces Instituto de Microbiología Agrícola (de la Dirección Nacional de Investigaciones Agropecuarias, hoy organizado dentro del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), donde entre los años 1955 y 1957 tuve la grata oportunidad de trabajar, bajo su conducción, en algunas cuestiones vinculadas a la búsqueda y estudio de nuevos antibióticos.

El para mí muy afortunado ofrecimiento del Profesor Paladini fué inmediatamente aceptado, y me dediqué enseguida a la preparación del material necesario y al estudio de algunas cuestiones previas. Me encontraba revistando en la Sección Antibióticos del Instituto Nacional de Microbiología, y el pertinente acuerdo para la realización de este trabajo fué otorgado por el entonces Director de este Instituto, Dr. Ignacio Pirosky, a quien quedo muy especialmente reconocido por su cálido apoyo y por las numerosas facilidades brindadas a lo largo de la tarea.

La preparación del material activo impuro, y la ejecución de las mediciones de la actividad antibiótica, fué realizada en la mencionada Sección Antibióticos del Instituto Nacional de Microbiología; la purificación y el estudio químico, que dieron comienzo con el año 1960, fueron efectuados en la Cátedra de Química Biológica I de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de esta Universidad, con el permanente asesoramiento y la estrecha colaboración del Profesor Paladini, padrino de esta tesis, en quien encontré un verdadero maestro, y a quien deseo transmitir mi profundo agradecimiento.

A la Dra. Nélida A. Leardini, agradezco su consecuente y eficaz colaboración, decisiva en la realización de algunas importantes partes de este estudio.

Quiero agradecer especialmente al Ing. Agr. Cercós, no sólo la provisión de algunos materiales críticos (las cepas), sino también, y en particular, la formulación de valiosas sugestiones hechas durante la tarea.

Finalmente, a todo el personal de la Sección Antibióticos del Instituto Nacional de Microbiología, muy especialmente al Sr. Cándido V. del Prado y a la Sra. Elvira V. de Parma, agradezco su eficaz e inteligente asistencia técnica.-

---

C A P I T U L O I

ANTIBIOTICOS POLIPEPTIDICOS DE ORIGEN BACTERIANO

1.- INTRODUCCION

Por muchos motivos, los antibióticos constituyen un capítulo particularmente interesante de la química de las sustancias naturales.

Sin considerar las obvias razones de índole práctica, que tan poderoso impacto han hecho en la terapéutica de muchas enfermedades causadas por microorganismos y en otros campos de aplicaciones no médicas de los antibióticos, el frecuente hallazgo de estructuras y enlaces químicos "no usuales", el estudio de sus relaciones biosintéticas y de los mecanismos de su acción, representan poderosos estímulos para investigaciones que han afectado a fundamentales aspectos de la microbiología, la química orgánica y aún la ingeniería.

Una de las características que más llaman la atención cuando se intenta trazar un panorama general en este campo, es la enorme diversidad de estructuras que se han hallado poseyendo actividad antibiótica (Bu'lock, 1961). Como una consecuencia de esta diversidad, que se presenta además con todos los grados posibles de complicación, se ha invertido un considerable esfuerzo en encontrar analogías estructurales y biosintéticas, que permitan realizar un agrupamiento racional de las sustancias activas.

No es propósito de esta introducción catalogar la totalidad de las estructuras conocidas hasta ahora. Sin embargo, para dar una co-

herente ubicación a las sustancias que han sido el objeto de este trabajo, será conveniente describir, aunque someramente, los conocimientos en un sector particular: el caracterizado por la naturaleza peptídica y el origen bacteriano. Aún la descripción de este sector, no se ha pretendido hacerla totalmente inclusiva, fundamentalmente por dos motivos: en primer lugar, las referencias parten desde los mismos comienzos de la microbiología experimental, a mediados del siglo pasado, en que la posibilidad de investigar la naturaleza de los agentes era remota (Florey, 1949); además, en numerosos casos, las sustancias involucradas han sido sólo muy primitivamente caracterizadas, y no se encuentra que su estudio se haya profundizado con posterioridad.

El desarrollo de esta descripción se ha dividido en dos partes: la de los polipéptidos de origen bacteriano de acción antibiótica sobre Eubacteriales y micobacteria, y la de los que tienen acción predominantemente antifúnguica.

2.- ANTIBIOTICOS ACTIVOS SOBRE EUBACTERIALES Y MICOBACTERIA

Alveína: En 1949, Gilliver estudió las propiedades antibacterianas de 165 cepas de distintas especies de bacilos esporulados. Por ese tiempo, alrededor de veinte antibióticos aparentemente diferentes habían sido obtenidos de varias especies del género Bacillus. De cultivos de una cepa de B.alvei, aislada en ese estudio, Gilliver, Holmes y Abraham (1949) extrajeron y purificaron, utilizando una técnica de distribución en contracorriente, un antibiótico activo sobre bacterias, que denominaron alveína. El análisis de la distribución en contracorriente les permitió inferir que la mayor porción de actividad estaba asociada a una sola sustancia, aunque un segundo compuesto activo estaba presente en una proporción menor que el 5% a -

proximadamente.

La alveína fué caracterizada como un polipéptido fuertemente básico, en cuyo hidrolizado se identificaron alanina, cistina, leucina, lisina, serina, treonina y valina.

Los autores observaron que la producción de alveína por B.alvei estaba de alguna manera condicionada al medio de cultivo utilizado, pues la misma cepa, en un medio diferente, producía por lo menos otra sustancia antibacteriana distinta.

Otra de las cepas aisladas por Gilliver en su tarea de selección, esta vez de Bacillus laterosporus, produce un antibiótico peptídico activo sobre bacterias Gram positivas y micobacteria, que fué estudiado por Barnes (1948). Fué denominado laterosporina.

- - -

Bacilisina: Por lo menos tres compuestos antibióticos fueron caracterizados por Newton (1949), producidos por una cepa de Bacillus subtilis aislada de un cultivo contaminado de Mycobacterium tuberculosis. Dos de ellos, bacilipinas A y B, parecen ácidos dibásicos nitrogenados no saturados. El tercero, bacilisina, es un péptido neutro, activo sobre bacterias Gram positivas y micobacteria; en su hidrolizado se identificaron alanina, fenilalanina, leucina y tirosina.

- - -

Bacitracina: Las bacitracinas, descubiertas por Johnson, Anker y Meleney en 1945, son un interesante grupo de antibióticos producidos por una cepa primitivamente descripta como de B.subtilis. Su nombre deriva del apellido de una pequeña paciente, Tracy, de cuya infección en una fractura fué aislada la cepa productora.

La producción de un antibiótico denominado ayfivina, por una cepa de Bacillus licheniformis, fué descripta en 1949 por Arriagada y col.

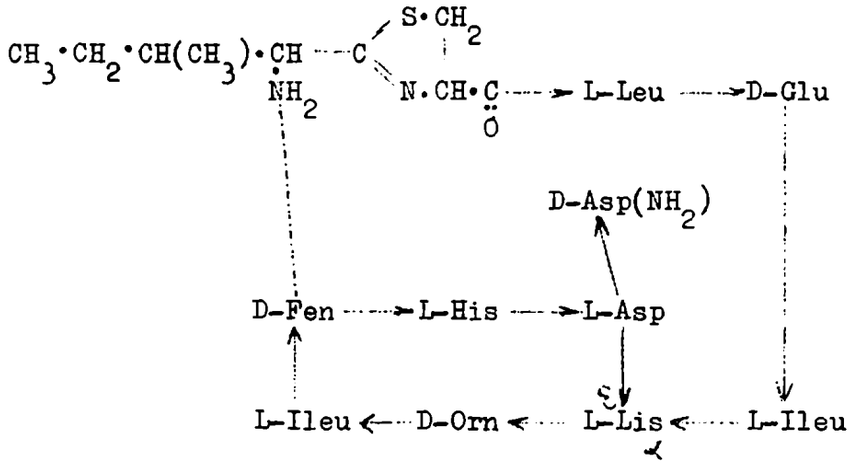
(1949 b), y por Hills, Belton y Blatchley. Estos autores (Sharp, Arriagada, Newton y Abraham, 1949; Arriagada, Florey, Jennings y Wallmarck, 1949 a) observaron que consistía de una mezcla de polipéptidos de características generales muy similares a las de las bacitracinas. En 1949, la cepa productora de bacitracina fué correctamente clasificada como de B.licheniformis (Meleney y Johnson, 1949) y en 1950, la comparación de ambas preparaciones antibióticas por métodos de distribución en contracorriente permitió concluir que eran idénticas, abandonándose entonces el nombre ayfivina (Newton y Abraham, 1950).

Poco tiempo después de su descubrimiento, el complejo bacitracina alcanzó considerable difusión clínica, fué producido en escala comercial y brindó enseguida un atractivo campo para numerosas investigaciones, en parte estimuladas por la eventual posibilidad de separar la actividad antibacteriana de la nefrotoxicidad que tenían las preparaciones en uso.

La aplicación de los métodos de distribución en contracorriente, que presentó sutiles problemas en cuanto a poder resolutivo, inestabilidad de la potencia antibiótica y transformaciones de estructuras durante los ensayos, permitió resolver las preparaciones comerciales en varios componentes activos; aunque la composición variaba ligeramente en diferentes muestras, y probablemente algunos componentes eran el resultado de transformaciones producidas durante el análisis, el péptido principal, bacitracina A, pudo ser obtenido como una entidad homogénea (Newton y Abraham, 1950; Barry, Gregory y Craig, 1948; Craig, Gregory y Barry, 1949 a; Craig, Weisiger, Hausmann y Harfenist, 1952).

El cúmulo de informaciones obtenidas luego por tres grupos independientes de investigadores, permitieron proponer una probable estructura de la bacitracina A, (Porath, 1954; Lockart, Abraham y Newton, 1955; Hausmann, Weisiger y Craig, 1955; Craig, Konigsberg y Hill, 1958), que si bien era la que mejor las representaba, dejaba

aún algunas cuestiones sin resolver.



Bacitracina A

La línea punteada simboliza el hecho de que algunas secuencias no coincidentes con esta estructura pueden deberse a migraciones con formación de la secuencia fenilalanina·isoleucina; la forma en que D-Asp(NH_2) se une al ciclo no se ha confirmado y sólo recientemente se han dado evidencias de que la unión Asp·ε(NH_2)Lis se hace a través del aspartil-β carboxilo (Stoffel y Craig, 1961). Aparte de estas observaciones, la estructura de la bacitracina A presenta algunas singularidades importantes:

a) El ciclo tiazolínico ha sido bien confirmado. Hay razones para suponer que tal estructura, que constituye un sistema de alta energía, puede dar cuenta de la labilidad que presentan las bacitracinas. Si bien la formación de este ciclo se ha calificado como un ejemplo de la divergencia que existe entre las estructuras de los péptidos de origen microbiano y las que se dan en proteínas, también ha sido postulado que tales sistemas quizás no sean muy diferentes de los que existen en los sitios activos descriptos en ciertas enzimas (Linderström-Lang y Jacobsen, 1941; Basford y Huennekens, 1955). De todas maneras, ciclos tiazólicos, que pueden haberse formado por oxidación de tiazolinas, han sido hallados en otros dos antibióticos: micrococ-

cina, una sustancia compleja cuya estructura ha sido recientemente estudiada (Mijovic y Walker, 1960, 1961), producida por una cepa de Micrococcus y por Bacillus pumilus, y bottromicina (Waisvisz, van der Hoeven, van Peppen y Zwennis, 1957; Waisvisz, van der Hoeven y Nijenhuis, 1957), producida por Streptomyces bottropensis. Más aún, peculiares estructuras cíclicas de alta reactividad, alrededor de átomos de azufre, han sido observadas en las penicilinas y una familia de cefalosporinas, y el conjunto de estas indicaciones adquiere especial interés cuando se tiene en cuenta que ellas y las bacitracinas, tienen análoga acción antibacteriana (espectro) y hasta una comprobada similitud en el modo de acción (interferencia en la biosíntesis de pared celular, y acumulación de uridin-nucleótidos similares) (Abraham y Newton, 1958).

Que el ciclo tiazolínico presente en las bacitracinas está relacionado con la actividad, lo indica el hecho de que la bacitracina F, derivado inactivo obtenido cuando los componentes A ó B se colocan un tiempo en solución neutra ó ligeramente alcalina, difiere de éstas en que dicho ciclo se ha oxidado a uno tiazólico, aunque también hay una oxidación de la isoleucina N-terminal, que es precisamente un sustituyente en este ciclo (Konigsberg y Craig, 1962).

b) Un importante papel en la estructura de la bacitrana A, es jugado por la isoleucina N-terminal. En medio ácido, la actividad antibiótica se pierde reversiblemente, y pudo demostrarse (Konigsberg, Hill y Craig, 1961) que la transformación resulta de una epimerización de este residuo N-terminal. Dicha transformación es probablemente única en el campo de los péptidos antibióticos, en el sentido de que es capaz de dar, en forma controlada, la inversión de un centro asimétrico en una molécula de peso molecular 1430, con una abrupta disminución concomitante de la actividad. Esta modificación no afecta la capacidad de la bacitracina de atravesar membranas, y demuestra hasta qué punto puede ser delicado el tipo de especificidad estructural que se requiere para la actividad.

Cuando los métodos de separación son llevados a un mayor nivel de poder resolutivo (Craig, King y Konigsberg, 1960), es posible observar que la denominada bacitracina A es, en realidad, una mezcla de los dos isómeros.

c) Ha sido confirmada también, la nada usual disposición de lisina en el ciclo; sus dos grupos $-NH_2$ están comprometidos en uniones peptídicas, y ello permite la formación de una cadena lineal adherida al ciclo. En proteínas, el ε-NH_2 de lisina está normalmente libre, pero péptidos en que ello no ocurre se han obtenido también de la pared celular de bacterias y actinomicetes (Cummins y Harris, 1956, 1958; Powell y Strange, 1957).

Los conocimientos sobre la estructura de las otras bacitracinas son más confusos. La bacitracina B es mucho menos estable que la A, y difiere de ella por tener un residuo adicional de valina. Es probablemente heterogénea: Craig, King y Konigsberg (1960) han sugerido que es una mezcla de isómeros resultantes de la distinta configuración óptica de un carbono α de la isoleucina N-terminal (como en A), y también de isómeros secuenciales, que tienen alternativamente isoleucina y valina como aminoácido N-terminal.

Interesantes avances han sido hechos también en lo que respecta a la biosíntesis de las bacitracinas por B.licheniformis. Ha sido demostrado que la "bacitracina" es un componente de la espora del microorganismo: hay una distintiva similitud entre la composición en aminoácidos del antibiótico y la de la pared de la espora; se ha comprobado una incorporación activa de bacitracina a la espora durante la pre-esporulación, y se ha sugerido que este proceso, que puede diferenciarse de una probable oclusión o adsorción, involucra al péptido como unidad estructural primaria de la pared de la espora (Bernlohr y Sievert, 1962; Bernlohr y Novelli, 1960).

- - -

Brevina: En 1953, Barnes y Newton llaman la atención sobre el hecho de que, si bien muchos investigadores se habían ocupado de las gramicidinas y las tirocidinas, muy poco se conocía respecto de otros antibióticos producidos por organismos de la especie Bacillus brevis. Informan allí sobre la producción, extracción y purificación parcial de brevina, un antibiótico producido por una cepa de esta especie, que es diferente a los anteriormente mencionados. Se trata de un polipéptido en cuyo hidrolizado se hallaron ácido aspártico, glicina, serina y tirosina; una sustancia básica y una fracción éter-soluble, también presentes, no pudieron ser identificadas. Es activo sobre bacterias Gram positivas y micobacteria.

- - -

Brevolina: Kawamata y Motomura, en 1954, informaron el aislamiento de un antibiótico producido por una cepa de B.brevis, que se mostró activo sobre bacterias Gram positivas y negativas y micobacteria. Reconocieron su naturaleza peptídica y lo denominaron brevolina. La sustancia fué purificada posteriormente por Motomura (1955; 1956), quien identificó en su hidrolizado ácido: arginina, glicina, ácido glutámico, histidina, leucina, ornitina, serina, tirosina y valina; no se observaron grupos α-NH_2 libres capaces de reaccionar con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB).

- - -

Cereína B_2: Un antibiótico producido por una cepa de Bacillus cereus, cereína B_2, ha sido purificado por cromatografía de adsorción y distribución en contracorriente y encontrado homogéneo en estos sistemas (Borowski, Kryński, K-Borowska y Wasielewska, 1956). Preparaciones purificadas por cromatografía sobre papel, dan aminoácidos por hidrólisis ácida, tres de los cuales no se han identificado. Es activo sobre bacterias Gram negativas y se estima que su peso molecular es bajo.

- - -

Licheniformina: En los años 1946 y 1947, Callow, Glover, Hart y Hills (Callow y Hart, 1946; Callow, Glover y Hart, 1947; Callow, Glover, Hart y Hills, 1947) publicaron informes preliminares sobre un antibiótico producido por ciertas cepas de B.licheniformis, que mostraba actividad sobre bacterias Gram positivas y negativas y micobacteria, tanto in vitro como in vivo. Preparaciones no satisfactoriamente purificadas parecían tener naturaleza peptídica; su administración prolongada causaba lesiones renales en los animales de experimentación y, como en el caso de las bacitracinas, se encaró su purificación para discernir si esta toxicidad era inherente o separable de la actividad. El problema tenía además otra faceta de interés, ya que la misma especie bacteriana era productora de bacitracinas.

La purificación fué llevada a cabo por Callow y Work (1952), quienes utilizando datos de cromatografía sobre papel, pudieron diseñar un adecuado esquema de fraccionamiento por distribución en contracorriente en escala preparativa. Este esquema resultó en el aislamiento de tres péptidos, las licheniforminas A, B y C, de muy similares pesos moleculares (entre 3800 y 4800), rotación óptica y composición en aminoácidos, pero de distinta actividad antibiótica y toxicidad. Cinco cepas diferentes probaron producir preparaciones que se comportaban de manera enteramente similar, a condición de que se usara un medio de cultivo con lactato y elevada relación nitrógeno/carbono; en medios con glucosa y baja relación nitrógeno/carbono, las mismas cepas producían bacitracinas.

Las licheniforminas A y B contienen arginina, ácido aspártico, fenilalanina, glicina, lisina, prolina, serina y valina; el componente C, con los mismos aminoácidos y además ácido glutámico, es menos activo que ellas sobre Mycobacterium phlei. Se presume que los tres componentes tienen estructura cíclica y, aunque se muestran homogéneos por cromatografía sobre papel y distribución en contracorriente en dos sistemas de solventes, esta homogeneidad debe considerarse con reservas.

- - -

Marcescina: Es un polipéptido termoestable producido por cepas de Serratia marcescens (Fuller y Horton, 1950). Muy activo sobre bacterias Gram positivas, no pudo obtenerse puro. En algunas cepas productoras de este antibiótico, se ha comprobado la biosíntesis de ácido serratámico, que presenta la curiosa estructura peptídica: N-(D-3 hidroxidecanoil)-L-serina, confirmada por síntesis (Cartwright, 1957). El ácido serratámico no muestra actividad antibiótica, pero se ha sugerido (Cartwright, 1955) que puede estar relacionado con la marcescina, de la cual sería un producto de degradación.

La presencia de 3-hidroxidecanoico ligado al grupo amino de un aminoácido ha sido también hallada en viscosina, lipopéptido antibiótico producido por Pseudomonas viscosa (Toki y Ohno, 1955).

- - -

Nisina: En 1933, Whitehead y Riddet observaron en establecimientos dedicados a la manufactura del queso, que en algunos casos, la leche que no era inmediatamente procesada inhibía el desarrollo de los cultivos "starters", adicionados con el objeto de generar la acidez necesaria para la separación del coágulo. A esta observación siguió el aislamiento de varias cepas de Streptococcus sp. (Whitehead, 1933; Mattick y Hirsch, 1944, 1946, 1947) que eran capaces de producir sustancias de fuerte poder inhibitorio sobre bacterias Gram positivas, y en las que se reconoció la naturaleza peptídica; Mattick y Hirsch (Mattick y Hirsch, 1944; Hirsch, 1951), que describieron la producción del antibiótico por una cepa de Streptococcus lactis (grupo N de Lancefield), propusieron denominarlo nisina.

Entre 1945 y 1949, dos firmas comerciales prepararon nisina utilizando esta cepa, pues el antibiótico encontraba una interesante aplicación en las industrias de productos lácteos y de panificación, en el control de las fermentaciones secundarias indeseables causadas principalmente por Clostridia (Schaller, 1960). Poco después, (Hirsch,

1951; Berridge, 1952), las propiedades biológicas de diferentes preparaciones de este antibiótico y el análisis de sus curvas de solubilidad sugirieron la posibilidad de que se tratara de un material heterogéneo, y quedó pronto firmemente establecido por métodos de distribución en contracorriente (Bavin, Beach, Falconer y Friedmann, 1952; Berridge, Newton y Abraham, 1952) que el nombre nisina debía ser considerado como la denominación colectiva de un número de polipéptidos íntimamente relacionados, un ejemplo similar al que ofrecían otros antibióticos peptídicos de origen bacteriano.

En 1952, Berridge, Newton y Abraham demostraron que los polipéptidos activos principales que constituían la nisina, obtenidos por distribución en contracorriente, son similares en su composición en aminoácidos, y llamaron la atención sobre su alto contenido en azufre. Además de metionina, que es un constituyente normal en proteínas, aparecieron también lantionina y una considerable cantidad de cistationina. Aunque lantionina se observa muy infrecuentemente en proteínas (hidrolizados de lana, por ejemplo), está presente en el antibiótico subtilina; cistationina, en cambio, ha sido aislada del micelio de una cepa de Neurospora, y se ha demostrado que es un intermediario en la biosíntesis de metionina. De preparaciones de nisina, cuatro componentes principales fueron aislados y caracterizados; se denominaron A, B, C y D. Presentan diferente actividad biológica: C y D tienen cinco veces menos actividad que A ó B frente a Streptococcus agalactiae.

Una técnica mejorada para la preparación del complejo nisina fué diseñada en 1957 (Cheeseman y Berridge, 1957), y con material de esta procedencia se intentaron investigaciones estructurales (Cheeseman y Berridge, 1959). Pudo aislarse nisina A, el componente mayor; se determinó su peso molecular (alrededor de 7000) y se dedujeron algunas posibles secuencias de aminoácidos, de cuyo análisis resultó la sugerencia de una estructura cíclica; la molécula probó ser demasiado compleja para una determinación total de la estructura primaria en esta etapa.

En este estudio también se observó que el material se comportaba globalmente de manera algo distinta al analizado en 1952, posiblemente debido a variaciones en el esquema de extracción y purificación, ya que de los dos componentes mayores obtenidos en aquella oportunidad (Berridge y col.,1952), sólo uno (nisina A) pudo ser recuperado, aunque la naturaleza heterogénea del antibiótico podía seguir siendo reconocida. La composición en aminoácidos de nisina A comprobada en este estudio, tampoco estuvo en completo acuerdo con anteriores resultados; fueron identificados: alanina, ácido aspártico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lantionina, β-metil lantionina, lisina, metionina, prolina, serina y valina.

- - -

Polimixinas: Las polimixinas constituyen un grupo de péptidos antibióticos, muy semejantes en sus propiedades químicas y biológicas, sintetizadas por diversas cepas de Bacillus polymyxa y especies vecinas. Los primeros integrantes de este grupo fueron descubiertos en 1947, casi simultáneamente, por tres equipos independientes de investigadores: Benedict y Langlykke (1947) describieron brevemente las condiciones de fermentación bajo las cuales ciertas cepas de B. polymyxa por ellos aisladas producían un material de notable actividad sobre bacterias Gram negativas; Stansly, Shepherd y White (1947) informaron sobre la obtención y algunas propiedades de un antibiótico de semejante actividad, que denominaron polimixina; identificaron la cepa productora como de B.polymyxa (Stansly y Schlosser, 1947) y dieron más tarde los métodos de purificación del material activo (Shepherd y col., 1948). Casi al mismo tiempo, los investigadores ingleses Ainsworth, Brown y Brownlee (1947) comunicaron la preparación y las propiedades de la aerosporina, antibiótico producido por una cepa de Bacillus aerosporus que había sido aislada de una muestra de suelo el año anterior; advirtieron pronto la similitud de aerosporina con

polimixina ("probablemente no idénticas"), y tiempo más tarde demostraban la identidad entre B.aerosporus y B.polymyxa (Stansly, 1949; Brownlee, 1949).

Investigaciones posteriores mostraron que B.polymyxa es una especie relativamente común en suelos y otros habitats, y por selección de cepas productoras fueron encontrados otros materiales activos, que sólo diferían ligeramente de aerosporina y polimixina. Se tuvo entonces la certeza de que se estaba en presencia de una familia de antibióticos muy relacionados, y se propuso denominarlos con el nombre colectivo de polimixinas; aerosporina fué designada polimixina A (Brownlee y Jones, 1948; White, Alverson, Baker y Jackson, 1949; Brownlee, 1949), la polimixina de Stansly y colaboradores fué llamada D, y otros materiales fueron denominados B, C y E (Brownlee y Jones, 1948; Swift y Bushby, 1953; Brownlee y Bushby, 1948; Jones, 1949; Brownlee, Bushby y Short, 1952).

El interés por este tipo de antibióticos era muy grande, dada la eficacia de su acción sobre bacterias Gram negativas, particularmente Pseudomonas aeruginosa, que era casi insensible a los productos en uso; además, si bien las primeras polimixinas eran marcadamente nefrotóxicas, las que siguieron, en especial B y C, estaban casi desprovistas de esta propiedad desfavorable, y tenían así gran probabilidad de ser utilizadas en clínica.

El progreso de los estudios sobre estas cinco polimixinas y el hallazgo y posterior caracterización de otros materiales, agregaron más miembros a esta familia:

Circulina: producida por Bacillus circulans (Murray y Tetrault, 1948; Murray y col., 1949);

Polipeptina: primitivamente también llamada circulina, sintetizada por Bacillus krzemieniewski, una variante mucoide de B.circulans (McLeod, 1948; Howell, 1950);

Colistin o colimicina: producida por Bacillus colistinus (Koyama, 1952);

Polimixina M: Producida por una cepa de B.polymyxa (Khokhlov y col., 1960).

Las características salientes de este importante grupo de antibióticos, además de su espectro antimicrobiano típico, que a veces incluye algunos hongos, pueden resumirse así: son polipéptidos básicos, de muy similar composición en aminoácidos, incluyendo una considerable proporción de α,γ diaminobutírico; sus pesos moleculares tienen valores alrededor de 1000; además de aminoácidos, todos contienen un ácido graso que, con rara exclusión, ha sido identificado como (+)-6-metil octanoico (isopelargónico).

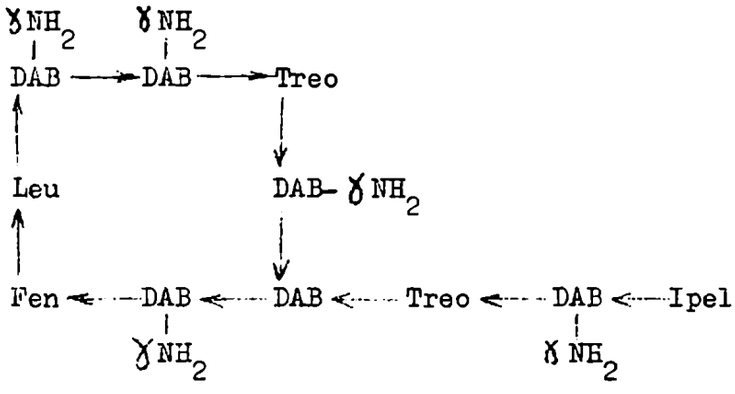
Además de ligeras diferencias en la composición en aminoácidos, la naturaleza de la porción no-aminoácido y ocasionalmente distinta sensibilidad a proteasas y lipasas, las polimixinas pueden distinguirse por procedimientos cromatográficos (Jones, 1948, 1949, 1954; Stansly y Brownlee, 1949; Nash y Smashey, 1951; Dowling y col., 1952; Mistretta, 1956; Biserte y Dautrevaux, 1957; Forni y Cavalli, 1958); información estructural sobre las polimixinas más estudiadas permite adjudicarles estructuras cíclicas.

Poco después de reconocerse la multiplicidad de las polimixinas, fué probado que varias de ellas no eran homogéneas. Regna, Solomons, Forscher y Timbreck (1949) mostraron por intensiva purificación que polimixina B era una mezcla de dos péptidos muy relacionados, B_1 y B_2; Hausmann y Craig (1954) separaron estos componentes por distribución en contracorriente, y los estudiaron en detalle; curiosamente, presentaban una diferencia en la naturaleza del ácido graso: en B_1 era 6-metil octanoico, pero en B_2 era un iso-octanoico cuya estructura no fué determinada. También fué demostrada la heterogeneidad de la circulina, de la cual los componentes principales, A y B, pudieron ser perfectamente caracterizados (Dowling y col., 1952); de la polipepti-

na, cuyo componente mayor da cuenta del 80% del peso de las preparaciones purificadas (Hausmann y Craig, 1952), y en la que sólo parece haber dos componentes; y del colistin (Oda, Kinoshita, Yamanaka y Ueda, 1954), que revela cromatográficamente tres componentes principales (A, B y C).

La aplicación de los métodos de análisis secuencial ha permitido dilucidar la estructura de algunas polimixinas.

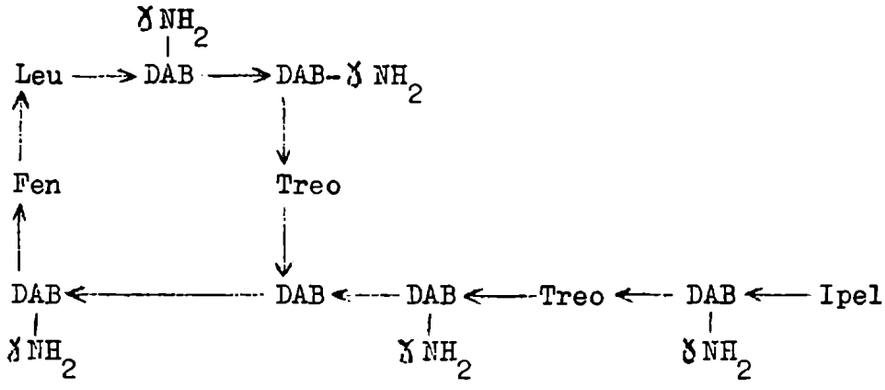
Hausmann propuso en 1956 dos estructuras probables para la polimixina B_1; Biserte y Dautrevaux (Biserte y Dautrevaux, 1956, 1957; Dautrevaux y Biserte, 1956) llegaron a similares conclusiones independientemente y parte de las secuencias deducidas fué luego confirmada por síntesis (Vogler y Lanz, 1960). La información acumulada era consecuente con la existencia de un ciclopéptido con una cadena lateral, emergente del ciclo por un amino grupo de un residuo de ácido diaminobutírico, cuyo extremo remataba el ácido metil octanoico (isopelargónico). Esta manera de emerger una cadena lateral de un ciclo peptídico recuerda la molécula de bacitracina A, en que una ramificación similar se produce a través de un grupo amino de lisina.



Polimixina B_1 (Estructura I)

DAB: ácido α, γ diaminobutírico.

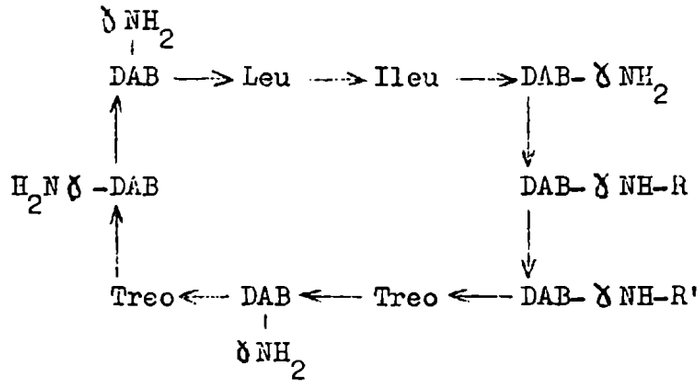
Ipel: ácido (+)-6- metil octanoico (isopelargónico)



Polimixina B_1 (Estructura II)

De las dos estructuras de la polimixina B_1 que han sido propuestas, existe evidencia en favor de la primera (Vogler, Lanz y Lergier, 1959; Vogler y Lanz, 1960); la indeterminación surge como consecuencia de la extrema labilidad que frente a las condiciones hidrolíticas presentan las uniones peptídicas formadas con el grupo amino de treonina.

Koffler y Kobayashi (Koffler, 1959; Koffler y Kobayashi, 1960) informaron en 1959 y 1960 las estructuras de las circulinas A y B.



Circulinas

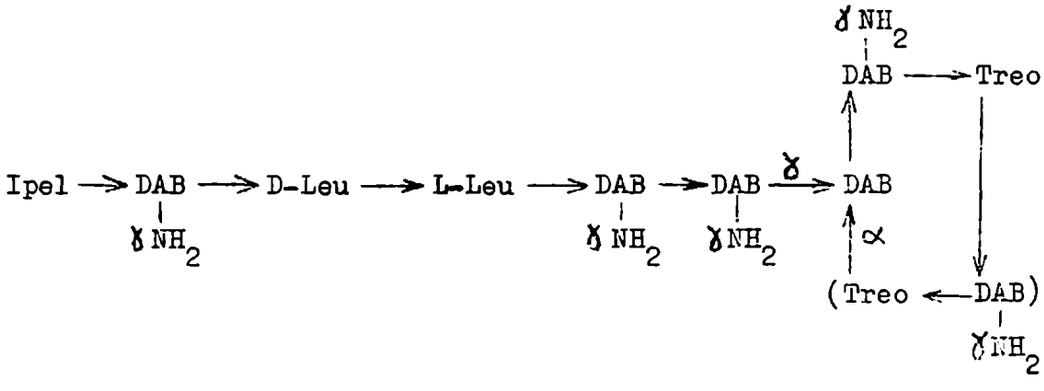
Circulina A: R= Ipel ⟶ ; R'= H.

Circulina B: R= H; R'= Ipel ⟶ .

En base a estas estructuras, han sido propuestos modelos moleculares de las circulinas (Warner, 1961). Curiosamente, la única diferencia entre ambas es la ubicación del ácido isopelargónico, que constituye la cadena lateral emergente del ciclodecapéptido.

Se ha sugerido en relación con estas estructuras, que la existencia de una fracción hidrofílica (el ciclopéptido) y otra hidrofóbica (el ácido graso) puede cumplir funciones interfaciales que son esenciales para la actividad (Koffler, 1959); aunque otras observaciones no concuerdan con esta hipótesis, es sumamente sugestivo que el ciclopéptido solo, desprovisto del ácido graso, tiene solamente 2 á 2.5 % de la actividad de la molécula intacta. El estudio de la extrapolación de estas observaciones a las restantes polimixinas parece una materia interesante, debido a que las circulinas, una excepción en este sentido, son inactivadas por tripsina y lipasa.

La estructura del colistin, antibiótico que ha alcanzado considerable difusión clínica, y parece ser la mejor polimixina desde este punto de vista, también ha sido estudiada. En 1961, Dautrevaux y Biserte propusieron dos estructuras alternativas, muy diferentes a las que años antes habían postulado Kiruhara y Suzuki (1955); como en la polimixina B_1, la alternativa surgía de la inestabilidad de los péptidos conteniendo treonina, necesarios para una completa definición. Aunque no lo afirman expresamente, Dautrevaux y Biserte abonan algunas evidencias en favor de la secuencia treonina·treonina.



Colistin

Muy recientemente, Wilkinson (1963) estudió las secuencias de péptidos obtenidos por hidrólisis parcial de polimixina E, y otras de sus propiedades físicas y químicas en comparación con las del colistin. Concluyó que exactamente el mismo par de estructuras alternativas que los autores franceses ya citados habían propuesto para el colistin, era también atribuible a la polimixina E, observación que resulta en que ambos antibióticos deben considerarse idénticos.

No hay aún la evidencia final que permita decidir entre ambas estructuras, y algunas cuestiones, como la probable relación entre la heterogeneidad del colistin y la naturaleza compuesta de la fracción ácido graso (ya que se ha encontrado en los hidrolizados, además de ácido isopelargónico primitivamente informado, otros dos: 5-metil heptanoico y octanoico), quedan pendientes de solución.

De la polimixina M se han informado el estudio de secuencias parciales, y la síntesis y propiedades de algunos posibles fragmentos (Silaev, Stepanov, Yulikova y Muratova, 1961; Silaev, Stepanov y Kozlov, 1961).

- - -

Antibióticos de Bacillus pumilus: Un considerable número de preparaciones antibióticas han sido encontradas producidas por cepas de B.pumilus. Las que se hallan mejor caracterizadas son:

Micrococcina P: probablemente idéntica a Micrococcina, producida por especies de Micrococcus (Su, 1948; Heatley y Doery, 1951; Fuller, 1955; Abraham y col., 1956), si bien pueden considerarse biogenéticamente relacionadas con péptidos ricos en cisteína, presentan particulares estructuras tiazólicas resistentes a la hidrólisis ácida que las apartan de este estudio (Brookes, Fuller y Walker, 1957; Mijovic y Walker, 1960, 1961);

Tetaína: un péptido neutro, activo sobre bacterias Gram positivas y negativas (Borowski, 1953).

Tetaína ha sido purificada y estudiada por autores polacos (kryński y col., 1955; Borowski y Konopa, 1957; Borowski, 1957; Borowski y K-Borowska, 1957) quienes establecieron su naturaleza peptídica y analizaron algunas de sus propiedades.

Menos caracterizado se encuentra el antibiótico Pumilina (Bhate, 1955), activo sobre bacterias Gram positivas. Fué cristalizado y si bien su hidrolizado muestra la presencia de componentes revelables con ninhidrina, su bajo contenido de nitrógeno sugiere que la mayor parte de la molécula no es peptídica.

- - -

Subtilina: Cultivando una cepa de Bacillus subtilis en un medio sintético con asparragina como fuente de nitrógeno, Jansen y Hirschmann obtuvieron, en 1944, un caldo que exhibía propiedades antibacterianas. La sustancia activa fué reconocida compleja, y denominada subtilina. Sustancias antibacterianas producidas por cepas de B.subtilis han sido llamadas subtilina por varios autores (Magarao, Arriagada y Thales, 1944; Ramon, Richou y Ramon, 1945; Hassall, 1948), pero la intensidad de los estudios a que posteriormente dió lugar la aislada por Jansen y Hirschmann, dejó limitada a ella ese nombre; con alguna excepción (Hassall, 1948), no parece probable que en todos los casos se trate del mismo material.

Hacia 1951, la subtilina había sido purificada y caracterizada como un material polipeptídico esencialmente homogéneo por diversos métodos (Dimick y col., 1947; Fevold, Dimick y Klose, 1948); su producción en escala industrial se había considerado, pues fué reconocida su potencial aplicación en la preservación de alimentos envasados (Garibaldi y Feeney, 1949).

La obtención de preparados más purificados de subtilina permitió realizar estudios más detallados; así, en 1951 (Alderton y Fevold, 1951; Lewis y Snell, 1951) fué estudiada su composición en aminoácidos,

entre los que se identificó lantionina. Este hallazgo era interesante ya que, aparte de ser un aminoácido de rara presencia en proteínas, también se lo había encontrado en el antibiótico nisina.

En 1957, Sacks y Pence obtuvieron la evidencia de la heterogeneidad de subtilina por métodos electroforéticos; aislaron un componente mayor que denominaron subtilina A. Como un hecho que cabía esperar en base a la experiencia previa sobre microorganismos productores de antibióticos peptídicos, se mostró así que las cepas productoras de subtilina no sintetizan un sólo antibiótico sino una familia de péptidos relacionados.

Tanto la heterogeneidad del antibiótico como el aislamiento de aquél componente mayor, fueron luego confirmados por Stracher y Craig (1959) utilizando distribución en contracorriente, y por Alderton y Snell (1959) mediante cromatografía de partición sobre sílica-gel; ambos grupos fueron capaces de aislar y caracterizar el componente A. Su peso molecular es de alrededor de 3300, en concordancia con la composición en aminoácidos: alanina, ácido aspártico, fenilalanina, glicina (2), ácido glutámico (3), isoleucina, lantionina, β-metil lantionina, leucina (4), lisina (3), prolina, sarcosina (2) y triptofano (Stracher y Craig, 1959). Sarcosina, que no había sido previamente identificada en subtilina, aparece como grupo N-terminal. Durante la hidrólisis ácida se observan algunas uniones muy resistentes, una de las cuales, en que está involucrada sarcosina, puede ser de tipo no usual. La información acumulada sugiere que subtilina A es un péptido pentacíclico con una cadena lateral.

- - -

Tirotricina: El descubrimiento de la tirotricina por Dubos en 1939, resultó de una de las primeras investigaciones sistemáticas destinadas al hallazgo de sustancias antibióticas. Es interesante describir el panorama que se ofrecía en este campo hasta esa fecha,

citando a Abraham y Florey (1949): "La posición hasta 1939 puede ser sintetizada diciendo que casi todos los observadores estaban de acuerdo en que había cepas de Bacillus mycoides y del grupo subtilis-mesentericus, que producían sustancias bacteriolíticas y bactericidas. Esas sustancias eran termoestables y filtrables; filtrados del cultivo crudo, a menudo eran aún potentes y exhibían un efecto sobre algunos organismos hasta en dilución 1:100".

La lectura de este párrafo, y la de los trabajos de Dubos y sus colaboradores en los años inmediatamente posteriores, produce la impresión de un salto tan trascendental, que queda perfectamente justificado señalar en estas fechas, también jalonadas por el redescubrimiento de la penicilina, el comienzo de la llamada "era de los antibióticos". En lo que respecta a los antibióticos de origen bacteriano, al trabajo de Dubos y su continuación cupo una responsabilidad fundamental en este salto, ya que "tuvo el gran mérito de considerar el objeto desde muchos puntos de vista: bacteriológico, bioquímico, biológico y eventualmente clínico; esto estuvo en agudo contraste con todo el trabajo previo, mucho del cual era adecuado en la parte bacteriológica pero sufría de extremada limitación en los sentidos químicos y otros, si ellos habían sido considerados" (Abraham y Florey, 1949).

Dubos aisló la cepa productora de tirotricina, un Bacillus brevis, organismo del que no se había informado previamente que mostrara actividad antibacteriana, de un suelo al que agregó a intervalos regulares durante dos años, un conjunto de bacterias responsables de procesos infecciosos. Este "enriquecimiento" o bacterización, tenía por objeto inducir la producción de sustancias antagonistas por los microorganismos presentes en ese suelo, ya que su microflora tendería siempre a contrarrestar el desequilibrio provocado por ese agregado masivo. Si la bacterización tuvo algo que ver en la aparición de una cepa de poderosa actividad antibacteriana está abierto a la duda, pues cepas similares pudieron aislarse de suelos no tratados de esta manera.

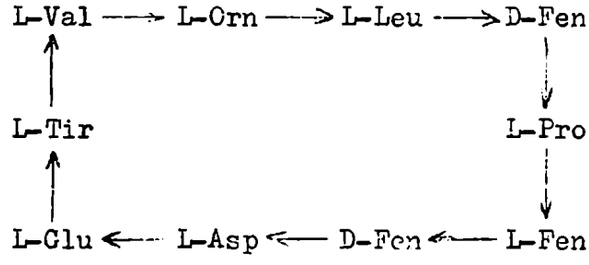
Hotchkiss y Dubos (1941) aislaron la tirotricina y fraccionaron este material en dos entidades: gramicidina y tirocidina. Pronto se demostró, a su vez, que estos dos antibióticos eran heterogéneos, y constaban de mezclas de péptidos muy relacionados (Craig, Gregory y Barry, 1949 b).

Tirocidinas: La tirocidina de Hotchkiss y Dubos fué descripta como un polipéptido básico, y recristalizada hasta que sus propiedades permanecieron constantes; satisfacía así los criterios de homogeneidad vigentes en 1940. En 1947, Synge y Tiselius por análisis cromatográfico, y en 1949 Craig, Gregory y Barry (1949 b) por distribución en contracorriente, mostraron que estas preparaciones eran en realidad mezclas. En 1952, Battersby y Craig (1952 a) sometieron la tirocidina cristalizada al fraccionamiento por distribución en contracorriente y la resolvieron en tres componentes mayores, que denominaron A, B y C; un número de péptidos menores estaba también presente en las preparaciones analizadas. El componente A fué purificado hasta que representó muy probablemente una entidad homogénea; reveló ser un péptido cíclico que sólo contenía aminoácidos, y en el que la presencia de un grupo amino primario respondía de la basicidad de la molécula.

Como un resultado inesperado de este trabajo (Battersby y Craig, 1952 b), fué sugerido un método general para la determinación del peso molecular de péptidos, mediante la sustitución parcial de sus grupos funcionales con un reactivo adecuado; esta sustitución afecta las propiedades de partición de los derivados, paralelamente al grado de sustitución, de modo que ellos pueden ser perfectamente resueltos por distribución en contracorriente. El análisis de cada una de las bandas así obtenidas, respecto de la cantidad de sustituyente que contiene, permite el cálculo del peso molecular, ya que el cuadro general del número de sustituyentes involucrados en cada caso es inequívocamente suministrado por la distribución en contracorriente. La reac-

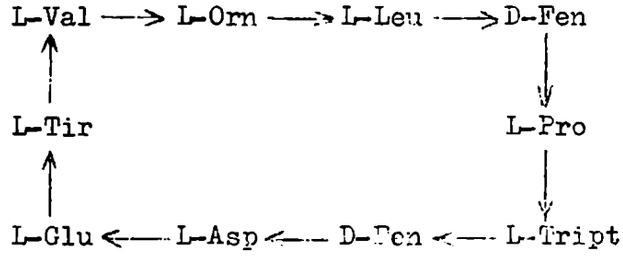
ción de sustitución accidentalmente hallada en tirocidina A fué la metanolisis de uno de los grupos $-CONH_2$, y el peso molecular que permitió deducir fué luego confirmado utilizando 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno como reactivo. Este método fué empleado posteriormente para la deducción del peso molecular de otros péptidos.

La estructura de la tirocidina A fué luego dilucidada por Paladini y Craig (1954); resultó particularmente interesante el problema de la ubicación de las dos D-fenilalaninas características de este antibiótico.



Tirocidina A

Tirocidina B, otro de los componentes de la tirocidina natural, fué purificada por King y Craig (King y Craig, 1955 a; Craig y King, 1955), y la secuencia de sus aminoácidos pudo ser establecida (King y Craig, 1955 b); los métodos que se habían utilizado en tirocidina A para el fraccionamiento de los péptidos obtenidos en los hidrolizados parciales, no pudieron ser aplicados con éxito en este caso (complicación producida por la presencia de triptofano), y este problema fué elegantemente resuelto con técnicas de diálisis fraccionada, que permiten la separación de mezclas de solutos dializables. Resultó ser un



Tirocidina B

decapéptido similar a tirocidina A, excepto que contiene un triptofano en vez de una fenilalanina.

Gramicidinas: Utilizando métodos de distribución en contracorriente, Gregory y Craig (1948) confirmaron que la gramicidina de Hotchkiss y Dubos no era homogénea. Comprobaron la presencia de dos componentes mayores, uno dando cuenta de casi el 80 % de la preparación, y por lo menos dos entidades más, en mucha menor proporción.

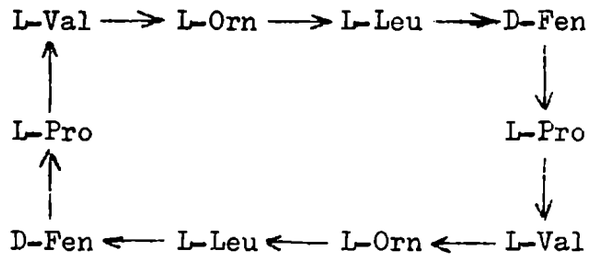
La exacta composición en aminoácidos de las gramicidinas A, B y C, que pudieron ser así caracterizadas, es aún materia no definitivamente aclarada. La gramicidina A contiene L-alanina, glicina, D-leucina, L-triptofano, L- y D-valina y etanolamina; los componentes B y C difieren de ella en que contienen L-fenilalanina y L-tirosina respectivamente en lugar de uno ó más triptofanos (Craig, Gregory y Barry, 1949 b).

En 1951, James y Synge,utilizando la gramicidina mezcla, obtuvieron información sobre ciertos aspectos estructurales de estas sustancias; en particular, investigaron la causa de su carencia de propiedades básicas y grupos ionizables, cuestión que, obviamente, estaba relacionada con la forma en que la etanolamina se encontraba ligada en la molécula. En efecto, había sido establecido que las gramicidinas eran péptidos neutros; a pesar de estar formadas exclusivamente por aminoácidos monoamino y monocarboxílicos y etanolamina, no poseen grupos ionizables, y los únicos grupos funcionales libres parecen ser el núcleo indólico y los hidroxilos alcohólicos. James y Synge reconocieron la complicación involucrada en utilizar un material heterogéneo en sus estudios, pero fueron capaces, no obstante, de obtener datos que probablemente son comunes a los miembros del grupo. Establecieron así que los hidroxilos alcohólicos, susceptibles de metilación en la gramicidina intacta, no pertenecen a etanolamina, y sugirieron que

ésta se encuentra ligada a una unión peptídica por su hidroxilo y a un núcleo indol o a una unión peptídica enolizada, por su grupo amino. Tanto la presencia de etanolamina como la de estas uniones no peptídicas, son un ejemplo más de las peculiaridades estructurales que a menudo presentan los péptidos antibióticos.

Más recientemente, el problema de la composición en aminoácidos de las gramicidinas A, B y C fué atacado, por Okuda, Lin y Winnick (1962). Sus análisis les permitieron rectificar algunos datos previamente consignados, y deducir para el componente A, la composición molecular mínima: alanina (2), glicina, leucina (4), triptofano (4), valina (4) y etanolamina. Dieron además razones para suponer que la molécula contiene el doble de esta composición, resultando un peso molecular de aproximadamente 3800, que es concordante con los datos cristalográficos (Hodgkin, 1949). Encontraron también una pequeña cantidad de isoleucina en la gramicidina mezcla, que no había sido previamente detectada. Este grupo de investigadores está estudiando la estructura primaria de estos compuestos.

Gramicidina S: Es un antibiótico polipeptídico elaborado por una cepa de B. brevis; fué descubierto en 1944 por Gause y Brazhnikova como resultado de un intensivo programa de selección de cepas de bacilos esporulados antagonistas aislados de suelos. El polipéptido fué pronto purificado y cristalizado, y las informaciones que obtuvieron diferentes grupos de investigadores permitieron formular una estructura que resultó bien sostenida por todas las evidencias experimentales (Sanger, 1946; Consden, Gordon, Martin y Synge, 1947; Battersby y Craig, 1951). Consden, Gordon, Martin y Synge, que propusieron en 1947 esa estructura, marcaron con ello un importante hito en el desarrollo de la química de péptidos y proteínas, a la que contribuían con la primera secuencia totalmente aclarada.



Gramicidina S

Se trata de un decapéptido cíclico, conteniendo la secuencia L-valina·L-ornitina·L-leucina·D-fenilalanina·L-prolina, dos veces. Es interesante observar que las tirocidinas, con las cuales está más relacionada la gramicidina S que con las otras gramicidinas, contienen esta misma secuencia como una mitad del ciclodecapéptido, del que la otra mitad es enteramente diferente. La estructura primaria de la gramicidina S ha sido confirmada por estudios con rayos X de un número de sus sales y acil-derivados (Schmidt, Hodgkin y Oughton, 1957); mediante la síntesis del decapéptido acíclico (Erlanger, Sachs y Brand, 1954), y finalmente la síntesis completa del ciclo (Schwyzer y Sieber, 1957). Dicha estructura primaria pasó a ser una de las más seguramente establecidas dentro de los péptidos antibióticos. Diversos modelos moleculares han sido propuestos (Hodgkin y Oughton, 1957; Warner, 1961).

Interesantes trabajos han sido dedicados al estudio de la actividad de análogos tanto acíclicos como cíclicos de la gramicidina S, con vistas al establecimiento de relaciones entre estructura y actividad. Los primeros análogos lineales (pentapéptidos) (Harris y Work, 1950) no tenían más que una pequeña actividad, de donde se infirió la probable necesidad de la estructura cíclica. Sin embargo pudieron luego obtenerse decapéptidos acíclicos, inclusive el que tenía la secuencia correcta, que eran unas 10 veces menos activos pero se comportaban de manera cualitativamente similar al producto natural y presentaban con él una marcada sinergia (Erlanger, Sachs y Brand,

1954); se observó además, que los microorganimos supervivientes poseían enzimas capaces de destruir al análogo lineal.

Si se admitía que el modo de acción del análogo lineal no era distinto al de la gramicidina S, era atractivo suponer que la mayor actividad de ésta se debía a su menor susceptibilidad a la destrucción por las enzimas bacterianas (Erlanger y Goode, 1954); en otros términos, la estructura cíclica no es esencial pero contribuye a dar eficacia a la propiedad antibacteriana. Erlanger y Goode, que sugirieron esta hipótesis en 1954, encontraron más tarde (1960) evidencias de que, probablemente, los análogos acíclicos y gramicidina S tienen diferentes modos de acción, y por lo tanto debía inferirse que la actividad del producto natural depende de su estructura cíclica. Aparte de esta cuestión, el papel de algunos aminoácidos fué investigado; Schwyzer y Sieber (1958) encontraron que el ciclopéptido con lisina en lugar de ornitina es tan activo como el producto natural.

Un particular estímulo para el mayor desarrollo de estas cuestiones fué el hallazgo de Katchalski y colaboradores (Katchalski, Berger, Bichowsky-Slomnicki y Kurtz, 1955; Bichowsky-Slomnicki, Berger, Kurtz y Katchalski, 1956), de que copolímeros de los aminoácidos componentes de la gramicidina S mostraban considerable actividad antibacteriana, en algunos casos hasta mayor que la del péptido natural. Que los poliaminoácidos obtenidos por ellos y el péptido natural tengan el mismo modo de acción, es una cuestión todavía no resuelta, pero algunas de las conclusiones de estos estudios agregan nuevos elementos de controversia: aparentemente, sólo dos factores son esenciales para la actividad antibiótica de los copolímeros, a saber, la ornitina con un grupo amino libre, y otros cuatro aminoácidos como "diluyentes". Polímeros de cadena abierta se han encontrado activos cuando se cumplen estos requerimientos, indicando que ni la estructura cíclica ni la configuración óptica de los aminoácidos es esencial para la actividad.

Otros péptidos antibióticos producidos por cepas de B.brevis han recibido el nombre de gramicidinas.

Autores japoneses, principalmente Otani y Saito y colaboradores, aislaron y estudiaron un polipéptido antibiótico parecido a gramicidina S, al que denominaron Gramicidina J (Otani y Saito, 1954; Yukawa, 1957; Saito, 1958; Otani, Nagano y Saito, 1958). Demostraron su homogeneidad por métodos de distribución en contracorriente, y una estructura cíclica que respondía a los hechos experimentales pudo ser propuesta. Posteriormente, otro péptido muy difícilmente distinguible de gramicidina J fué obtenido y purificado por Okuda en 1959, de otra cepa del mismo microorganismo. Ambas sustancias eran, sin embargo, separables por distribución en contracorriente, y Okuda propuso llamar J_1 al péptido de Otani y Saito, y J_2 al aislado por él.

Finalmente, otro autor japonés, Minoura (1959), descubrió otra sustancia de B.brevis, esta vez parecida a las gramicidinas de Dubos ya que constaba de los mismos aminoácidos y etanolamina.

- -- -

Viscosina: Un péptido acídico cristalino, activo sobre micobacteria in vitro e in vivo, y producido por Pseudomonas viscosa, fué aislado por Groupé, Pugh, Weiss y Kochi en 1951, y denominado viscosina. Autores japoneses estudiaron este antibiótico en los años siguientes (Ohno, Tajima y Toki, 1953), y lograron determinar su estructura (Toki y Ohno, 1955):

(-) 3-hidroxidecanoil → L-Leu → Gli → Ser → Val → Treo → L-Leu

Además de su relativa sencillez, en comparación con la mayoría de los antibióticos peptídicos, esta estructura presenta dos cualidades dignas de comentario: la presencia de un ácido graso ligado al grupo amino terminal de la porción peptídica, y su secuencia lineal. La primera de estas características no es excepcional, pues existen

numerosos ejemplos de lipopéptidos antibióticos (polimixinas); la segunda, en cambio, es una curiosa excepción, ya que las estructuras cíclicas parecen ser lo habitual en este campo.

La sustancia tiene también alguna actividad sobre ciertos virus, y porciones de su secuencia han sido sintetizadas (Fukuda y Bani, 1961).

Otro lipopéptido cristalino, este producido por Pseudomonas fluorescens, fué estudiado por Gräf y Bickel (1961). Tiene actividad sobre bacterias, algunos protozoarios y virus influenza (Bickel, 1961).

- - -

Miscelánea: Un número considerable de investigadores han informado estudios preliminares sobre antibióticos producidos por diversas especies de bacterias (Gause, 1946; Heatley y Florey, 1946; Miller y Rowley, 1948; Hirschhorn, Bucca y Thayer, 1948; Howell y Tauber, 1948; Loeb, Moyer y Murray, 1950; Murray y Loeb, 1950; Casas - Campillo, 1951; Dos-Santos, 1953; Dvonch y Benedict, 1953; Sarraillet, 1954; Mahbubur Rahman y Ahmed, 1955; Knecht y McCleskey, 1955; Vankowá, 1957; K-Borowska, 1959; Mauer, 1959; Vincent, Veomett y Riley, 1959; Fregnan y Smith, 1962), que presentan actividad antibacteriana. Si bien la naturaleza peptídica no se ha comprobado en todos los casos, algunos son incluídos en la precedente enumeración cuando no hay razones para descartar esta posibilidad.

3.- ANTIBIOTICOS ACTIVOS SOBRE HONGOS

Bacilomicinas: Las bacilomicinas constituyen un grupo definido de péptidos antifúnguicos producidos por cepas de Bacillus subtilis. Este grupo no constituye una familia en el sentido que se da a esta palabra para describir, por ejemplo, a las bacitracinas, pues en este caso se desea indicar el hecho de la multiplicidad de sustancias similares sintetizadas por la misma cepa. En las bacilomicinas, en cambio, además de esta multiplicidad, que ha sido demostrada en algunos casos (por ejemplo, en la que es objeto de este trabajo), se da la circunstancia de que cepas diferentes producen péptidos que, aunque distintos en algunos aspectos, presentan gran analogía en lo que respecta a un notable conjunto de características. El reconocimiento de esta analogía (Sharon y col., 1954), permitió establecer un agrupamiento de antibióticos similares que se denominaron bacilomicinas.

Se trata de péptidos extracelulares, sintetizados por bacterias del género Bacillus, de carácter ácido, termoestables, no dializables, de peso molecular en las vecindades de 1000, y de acción predominantemente antifúnguica, no afectada por incubación con pepsina y tripsina. Solubles en solventes polares, insolubles en los no polares, presentan además ciertos aminoácidos con relativa frecuencia.

Atendiendo a estos criterios de clasificación, y tolerando, naturalmente, algunas desviaciones más o menos significativas, existe un apreciable número de antibióticos que caen en este agrupamiento.

En 1948, Landy, Warren, Rosenman y Colio comunicaron las condiciones de producción, el aislamiento y métodos de dosaje de un material antibiótico de propiedades antifúnguicas que denominaron bacilomicina. En los antecedentes, consignaban estos autores que de los antibióticos de origen bacteriano descubiertos hasta ese momento, sólo la eumicina (Johnson y Burdon, 1946) exhibía un espectro antimi-

crobiano que incluía a los hongos. La eumicina era también activa sobre bacterias, y aunque fué luego incluída en un estudio comparativo de las bacilomicinas (Sharon y col., 1954), no llegó a ser suficientemente caracterizada.

En 1951, Tint y Reiss estudiaron la formación de complejos de bacilomicina con citocromo c; debieron para ello purificar el material de Landy y colaboradores, y estudiar algo más de sus propiedades: lograron cristalizarla, caracterizar su naturaleza peptídica y comprobaron que la presencia de tirosina en su molécula era esencial para la actividad; del comportamiento electroforético de los complejos, infirieron que el material por ellos obtenido era heterogéneo, y constaba probablemente de dos componentes muy relacionados. Las muestras más purificadas de bacilomicina mostraron contener ácido aspártico, ácido glutámico, serina, tirosina, treonina y amoníaco.

En 1956, Turner purificó la bacilomicina por cromatografía sobre resinas de intercambio, estableció algunas secuencias parciales y determinó que las preparaciones más puras consistían de un 60 % de polipéptido. A la parte no peptídica de la molécula atribuyó la poca solubilidad en agua a pH menores que 8; no le fué posible estudiar su naturaleza ni la forma en que se une a la porción peptídica, aunque determinó que no es a través del hidroxilo de la tirosina. Estimó en 950 el peso molecular, en base a la extinción debida a tirosina.

A eumicina y bacilomicina, sigue cronológicamente el descubrimiento del"factor Aspergillus", por Michener y Snell en 1949, en los caldos de cultivo para la producción de subtilina fermentados por la cepa de B.subtilis ATCC 6633; esos autores aislaron también de estos caldos, otra entidad antifúnguica, "factor Rhizoctonia", que diferenciaron de la anterior. Ninguno de los dos antibióticos fué luego suficientemente caracterizado, pero el primero de ellos fué tentativamente considerado una bacilomicina (Sharon y col., 1954); el segundo era dializable, insoluble en solventes polares e inactivo sobre Aspergillus niger, y caía así fuera del grupo (Michener y Snell, 1949).

En 1950, las bacilomicinas recibieron dos contribuciones más: una sustancia no denominada, obtenida por Raubitschek y Dostrowsky, que fué sólo muy someramente caracterizada, y fungocina, descubierta en nuestro país por Cercós, ambas producidas por B.subtilis.

La fungocina fué purificada y estudiada por Cercós y Castronovo (1951) y Cercós (1954), quienes reconocieron su naturaleza peptídica y evaluaron sus propiedades biológicas; en 1954, Sharon, Pinsky, Turner-Graff, Babad y Cercós, la incluyeron en un estudio comparativo de algunos miembros del grupo y demostraron que poseía sus características típicas; en los hidrolizados ácidos se identificaron ácido aspártico, ácido glutámico, serina, tirosina y treonina como aminoácidos principales, y pequeñas cantidades de otros aminoácidos. En este trabajo, además, quedó firmemente establecida la conveniencia de definir al grupo como una familia de antibióticos similares, y se sugirió para el mismo el nombre de bacilomicinas. Así, la denominación fungocina fué reemplazada por la de bacilomicina A (Argentina). De una cepa aislada a partir del microorganismo productor de este antibiótico, se obtuvo el material que fué objeto de esta tesis.

Otros antibióticos clasificados en este grupo en el estudio comparativo ya citado, son, además de los que se acaban de comentar:

Bacilomicina R: producida por una cepa de B.subtilis contaminante de un cultivo de Penicillium roqueforti, aislada por Babad, Pinsky, Turner-Graff y Sharon (1952); se identificaron alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, leucina y serina, y una distribución en contracorriente realizada con un pequeño número de transferencias la mostró homogénea. Sus propiedades biológicas fueron luego intensivamente estudiadas por estos autores (Babad, Turner-Graff, Pinsky y Sharon, 1960).

Bacilomicina B: aislada en Japón por Shibazaki y Terui (1953). Hallada homogénea por cromatografía sobre papel, contiene ácido aspártico, ácido glutámico,

leucina, prolina y tirosina; el conjunto de sus propiedades estudiadas la ubican como una bacilomicina típica.

Toximicina: también un antibiótico típico de este grupo, no ha sido exhaustivamente caracterizada (Stessel, Leben y Keitt, 1952, 1953).

Sustancia no denominada: estudiada por Nandi y Sen (1953), es parecida al "factor Aspergillus" y probablemente algo distinta de las bacilominas.

Otras sustancias tipo bacilomicina han sido posteriormente descriptas por varios autores, y se consignan a continuación.

El procedimiento de extracción, las propiedades de solubilidad, la actividad biológica y otras características, acercan a la bacilocina al grupo que nos ocupa (Fukumoto y col., 1961); la sustancia tiene un peso molecular de alrededor de 1000 y en sus hidrolizados se han identificado ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, lisina, prolina, tirosina, valina y un aminoácido desconocido. Es producida por B.subtilis var antiblasti.

Una sustancia no denominada fué estudiada por Hashimoto (1960), quien la caracterizó como un péptido conteniendo ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, lisina, tirosina, valina y un aminoácido no identificado.

Otro antibiótico no denominado, producido por una cepa de B.subtilis, fué aislado por Lueck (1960). Es un polipéptido algo diferente a las bacilomicinas pues dializa y, aunque su actividad es primariamente antifúnguica, también inhibe algunas bacterias.

Péptidos antifúnguicos insuficientemente caracterizados, pero que también se han reconocido como algo distintos de las bacilomicinas, son:

Funguistatina: o antibiótico XG (Hobby, Regna, Dougherty y Steig, 1949; Regna, Carboni y Steig, 1950), péptido anfótero, peso molecular 2400, homogéneo por distribución en contracorriente, contiene aminoácidos básicos y triptofano; y

Micosubtilina: que es intracelular e insoluble en alcoholes de bajo peso molecular (Walton y Woodruff, 1949).

Un antibiótico antifúnguico producido por una cepa de B.subtilis, con muchas propiedades comunes con las bacilomicinas, pero de mayor peso molecular, fué estudiado por Van Vuuren, Joubert y Serfontein (1961). Se trata de un polipéptido homogéneo, en cuyo hidrolizado ácido se identificaron alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, prolina, serina, tirosina, treonina y valina. La comparación con las bacilomicinas y la micobacilina fué realizada hasta donde los datos disponibles lo hicieron posible. Los autores sugieren la necesidad de profundizar los estudios de caracterización de los péptidos antifúnguicos de B.subtilis, en particular los no dializables, para proveer una base más firme a los trabajos de clasificación.

- - -

Coliformina: Un complejo de péptidos antifúnguicos producidos por una cepa del grupo coli, fué estudiado por Freyschuss, Pehrson y Steenberg (1955) y denominado coliformina. Su heterogeneidad se dedujo por distribución en contracorriente y su peso molecular promedio está en las vecindades de 4000. Su producción ha sido patentada (Freyschuss, Pehrson y Steenberg, 1958).

- - -

Comirina: Una nueva especie de Pseudomonas fluorescens, que se denominó Ps.antimycetica n.sp., aislada como contaminante de un

cultivo de Aspergillus, fué estudiada por Forsyth (1955). Produce un antibiótico funguistático, comirina, del cual se informaron las características de producción y purificación. Parece un péptido homogéneo, cuya hidrólisis ácida revela alanina, arginina, ácido aspártico, ácido α,γ diaminobutírico, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, lisina, serina, tirosina, treonina y una fracción no aminoácido que es éter soluble.

- - -

Fluvomicina: Polipéptido producido por una cepa de B.subtilis, fué descubierto por Carvajal en 1952 (Carvajal, 1952, 1953). Además de su actividad antifúnguica, es bastante activo sobre bacterias. No ha sido posteriormente caracterizado y su producción se ha patentado.

- - -

Iturina: En 1950 y años siguientes (Delcambe y Devignat, 1957), Delcambe aisló y purificó, a partir de una cepa de B.subtilis (var Ituriensis, aislada en Ituri, Congo) un antibiótico peptídico que denominó iturina en 1957. Se producían simultáneamente otros dos materiales complejos, de naturaleza lipoide, cuyas propiedades biológicas los hacían menos interesantes. La iturina, en cambio, tenía una marcada actividad contra hongos, y pruebas clínicas exitosas en el tratamiento de diversas dermatomicosis hicieron encarar su preparación industrial.

El antibiótico presenta algunas diferencias con las bacilomicinas, principalmente en lo que respecta a su peso molecular, más elevado, pero Delcambe opina que eventualmente puede agruparse con ellas. Ya en 1957, Delcambe y Devignat sugirieron la posibilidad de que la iturina fuera heterogénea, del análisis de sus curvas de solubilidad. Posteriormente (Delcambe, 1961) esta heterogeneidad pudo ser confirmada por distribución en contracorriente y cromatografía de partición;

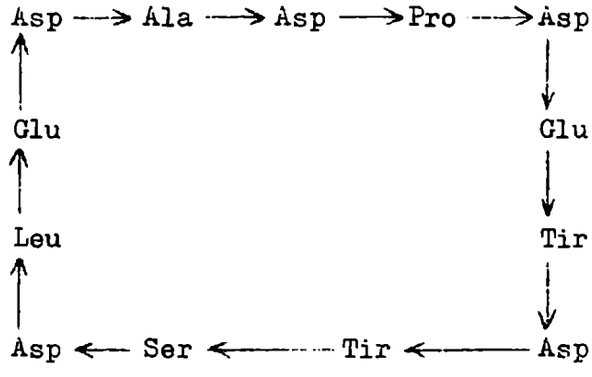
los componentes presentan ligeras diferencias en su composición en aminoácidos.

Del estudio comparativo de la iturina con algunas bacilomicinas, Delcambe sugiere la hipótesis de que ellas puedan considerarse mezclas, en proporciones variables, de componentes idénticos (Delcambe, 1957).

- - -

Micobacilina: La micobacilina, péptido antifúnguico producido por una cepa de B.subtilis, descubierto y estudiado por Majumdar y Bose (1958, 1960 a), proporciona otro ejemplo de antibiótico sólo ligeramente distinto de las bacilomicinas. El método de extracción y purificación de éstas es enteramente aplicable a la micobacilina, y son igualmente similares las propiedades de solubilidad y la composición en aminoácidos. El peso molecular, en cambio, es algo mayor: 1775 (Majumdar, 1960).

La aplicación de criterios de homogeneidad comunes, no demasiado exhaustivos, muestran una sustancia simple; Majumdar y Bose (1960 b) han propuesto una estructura cíclica para este antibiótico.



Micobacilina

4.- CONCLUSIONES

Después de haber descripto el panorama de los péptidos antibióticos de origen bacteriano, parece útil remarcar algunas conclusiones más o menos generales, que pueden contribuir a dar algo más que un valor meramente informativo a algunos de los hechos experimentales señalados.

Heterogeneidad: Es significativamente frecuente que la homogeneidad de los péptidos antibióticos producidos por bacterias es un atributo ligado a los métodos de fraccionamiento empleados como criterios para determinarla. Cuando estos métodos son llevados a un suficiente grado de poder resolutivo, y en este sentido la distribución en contracorriente y la cromatografía de partición se han mostrado de especial eficacia en comparación con otros, se observa muchas veces que la situación real es más compleja y puede ser más correctamente descripta estableciendo que se trata de mezclas de péptidos íntimamente relacionados. A menudo las diferencias menores se encuentran en las propiedades químicas y físicoquímicas, y llegan a ser tan sutiles que obligan a incrementar las exigencias de los criterios de homogeneidad, mientras se observan mayores divergencias en lo que respecta a las propiedades biológicas. El hallazgo de estas últimas divergencias ha sido a veces decisivo para dar al antibiótico posibilidades de un uso clínico: ocasionalmente fué posible encontrar componentes con una relación actividad/toxicidad muy superior a la correspondiente al complejo.

Si esta heterogeneidad es el resultado de la actividad biosintética del microorganismo productor, o una consecuencia de delicadas modificaciones que ocurren a nivel de los métodos de producción, extracción o purificación del antibiótico, es una cuestión que pocas veces puede responderse de manera inequívoca. Sin embargo, la existencia de otras estructuras bacterianas que presentan tal heteroge-

neidad (las paredes celulares, por ejemplo) y la influencia de precursores, parecen abonar en favor de la primera hipótesis, sin eliminar la eventual participación de la segunda en algunos casos (Stracher y Craig, 1959; Bu'lock, 1961).

- - -

Estructuras: La presencia de estructuras peptídicas cíclicas y de D-aminoácidos ha sido establecida en un gran número de antibióticos peptídicos de origen bacteriano, y da cuenta de su casi generalizada resistencia a la proteolisis enzimática. Estos hechos han sido frecuentemente analizados en relación a la actividad antimicrobiana.

Si ambas características contribuyen solamente a dar "eficacia" a la acción antibiótica, disminuyendo las posibilidades de inactivación por las enzimas del microorganismo sensible (caso supuesto para la gramicidina S), o por el contrario son de importancia crucial para una interacción estéricamente condicionada resultante en actividad (por ejemplo, receptores específicos con especificidad estérica) (Edman, 1959), es todavía material de hipótesis. Los resultados no son coincidentes, y seguramente dependen del antibiótico y de su modo de acción (Erlanger y Goode, 1960). Por ejemplo, ha sido sugerido que la configuración D de ciertos aminoácidos es un requisito de la actividad; sin embargo, también ha sido observado, en cicloserina, que ambos enantiomorfos son activos, que sus modos de acción son diferentes y que, como cabía esperar de esto último, el racémico es más activo que cada isómero separado (Smrt y col., 1957). Tal ejemplo de no paralelismo entre estructura y actividad, es también proporcionado por los poliaminoácidos relacionados con gramicidina S obtenidos por Katchalski y colaboradores (Katchalski, Berger, Bichowsky-Slomnicki y Kurtz, 1955; Bichowsky-Slomnicki, Berger, Kurtz y Katchalski, 1956).

Otras peculiaridades estructurales frecuentemente halladas en péptidos antibióticos son la presencia de aminoácidos "no comunes" y de secuencias y enlaces que se observan rara vez en proteínas. En este caso, respecto a secuencias y enlaces, hay general acuerdo con los hechos experimentales en que juegan importante papel en la actividad (bacitracinas, penicilinas).

Una interesante complicación en relación con estructuras es también proporcionada por los casos en que una parte de la molécula no está formada por aminoácidos. Las polimixinas y las gramicidinas (de Dubos) constituyen excelentes ejemplos de tales péptidos heteroméricos; en las primeras, la presencia de un residuo de ácido graso ha dado lugar a interesantes conjeturas en relación con el modo de acción; en las segundas, la forma en que etanolamina se encuentra ligada en la molécula parece ser especialmente curiosa.

- - -

Multiplicidad: Ha sido observado muchas veces, que cepas diferentes de una misma especie, o de especies muy relacionadas, son capaces de producir antibióticos similares, que pueden agruparse juntos en clasificaciones que utilizan criterios parecidos a los adoptados aquí. Al mismo tiempo, es raro que esa capacidad sea compartida por todas las variantes de una especie. Algunas veces, ha sido percibida, además, una fuerte dependencia de la producción con las condiciones de cultivo.

Estas observaciones, han sido señaladas como una discrepancia con las regularidades bioquímicas que se encuentran, por ejemplo, en las plantas superiores, donde tales correlaciones abren en cierto modo un camino bioquímico en la especificación de grupos taxonómicos (Bu'lock, 1961).

En este sentido, hay que decir que la producción de antibióticos es casi siempre el resultado de colocar al microorganismo productor en condiciones muy especiales de desarrollo, que pueden estar muy alejadas de las que, por definición, se consideran normales o utilizables para los fines taxonómicos.

De todas maneras, como ha podido percibirse en la descripción realizada, ciertas regularidades generales pueden establecerse en cuanto a géneros productores y naturaleza de los antibióticos producidos (bacitracinas, polimixinas, gramicidinas, bacilomicinas), y el estudio de las analogías fisiológicas de que ellas pueden ser expresión, se presenta como un interesante campo aparentemente poco explorado.

Algo similar puede decirse en lo que respecta a las analogías en el espectro de actividad.

C A P I T U L O II

PRODUCCION DEL
MATERIAL ANTIBIOTICO ESTUDIADO

1.- INTRODUCCION

En el Capítulo I se han mencionado brevemente algunas características de la bacilomicina A. Antes de penetrar en la descripción del estudio realizado con una preparación antibiótica obtenida a partir de la cepa aislada por Cercós (1950), es útil presentar un sumario de la información que este autor y sus colaboradores habían logrado reunir hasta el momento en que aquél estudio fué encarado.

La bacilomicina A fué descubierta en el seno de un grupo de trabajo orientado hacia la búsqueda de antibióticos útiles en fitopatología, en que los hongos tienen una importante responsabilidad; era pues lógico que se prestara especial atención a sus propiedades biológicas. Se estudió su actividad antibiótica sobre un gran número de microorganismos; las preparaciones tenían una acción casi exclusiva sobre hongos, pero algunas bacterias, particularmente Micrococcus sp. y Corynebacterium diphteriae, eran también sensibles (Cercós y Castronovo, 1951). Con algunos organismos, en particular especies de Micrococcus y Candida albicans, pudo observarse la aparición de cepas resistentes. Favret (1952) estudió el problema con C.albicans y otros microorganismos, en relación con las marcadas propiedades tensioactivas de la bacilomicina A; aunque estas propiedades no eran físicamente separables de la actividad antibiótica, resultó claro que no bastaban para dar cuenta de ella, por lo menos en su totalidad.

Cercós, analizando estas experiencias y las de otros autores con tirocidina y detergentes catiónicos (1954), sugiere que la detergencia puede "favorecer" la acción antibiótica pero que ella es, además, el resultado de otros procesos más específicos.

Otras propiedades biológicas estudiadas fueron su pronunciada toxicidad para los peces (Cercós, 1951 a), su efecto inhibidor del crecimiento de raíces de trigo (Cercós, 1951 b), y su marcada actividad hemolítica en ausencia de suero. La actividad hemolítica era enteramente similar a la de otros antibióticos peptídicos y probablemente no separable de la propiedad antibiótica.

La biosíntesis de la bacilomicina A aparecía estrechamente ligada a la presencia de asparragina en los caldos de fermentación. Observaciones efectuadas durante la purificación del antibiótico indujeron a sugerir su probable naturaleza compleja. Preparaciones no purificadas obtenidas de diferentes fermentaciones, mostraban un contenido en tirosina sensiblemente constante, que no guardaba relación con su actividad específica (Burachik, Cercós y Eilberg, 1959).

2.- CEPA UTILIZADA

Para la producción del antibiótico se utilizó la cepa *B. subtilis* DINR 49-4. Esta proviene de la cepa original DINR 49 [1], que fué activada para aumentar su capacidad productora del antibiótico. Esto se consiguió mediante cuatro pasajes por caldo de papa con 2 % de glucosa y 1 á 5 % de peptona, incubando ocho a diez días á 37° cada vez. Los materiales obtenidos de caldos de fermentación de la cepa original, tenían 25 unidades por miligramo (ver más adelante), y

---

(1) Suministrada por el Ing. A.P.Cercós.-

los provenientes de la cepa activada 70 unidades por miligramo.

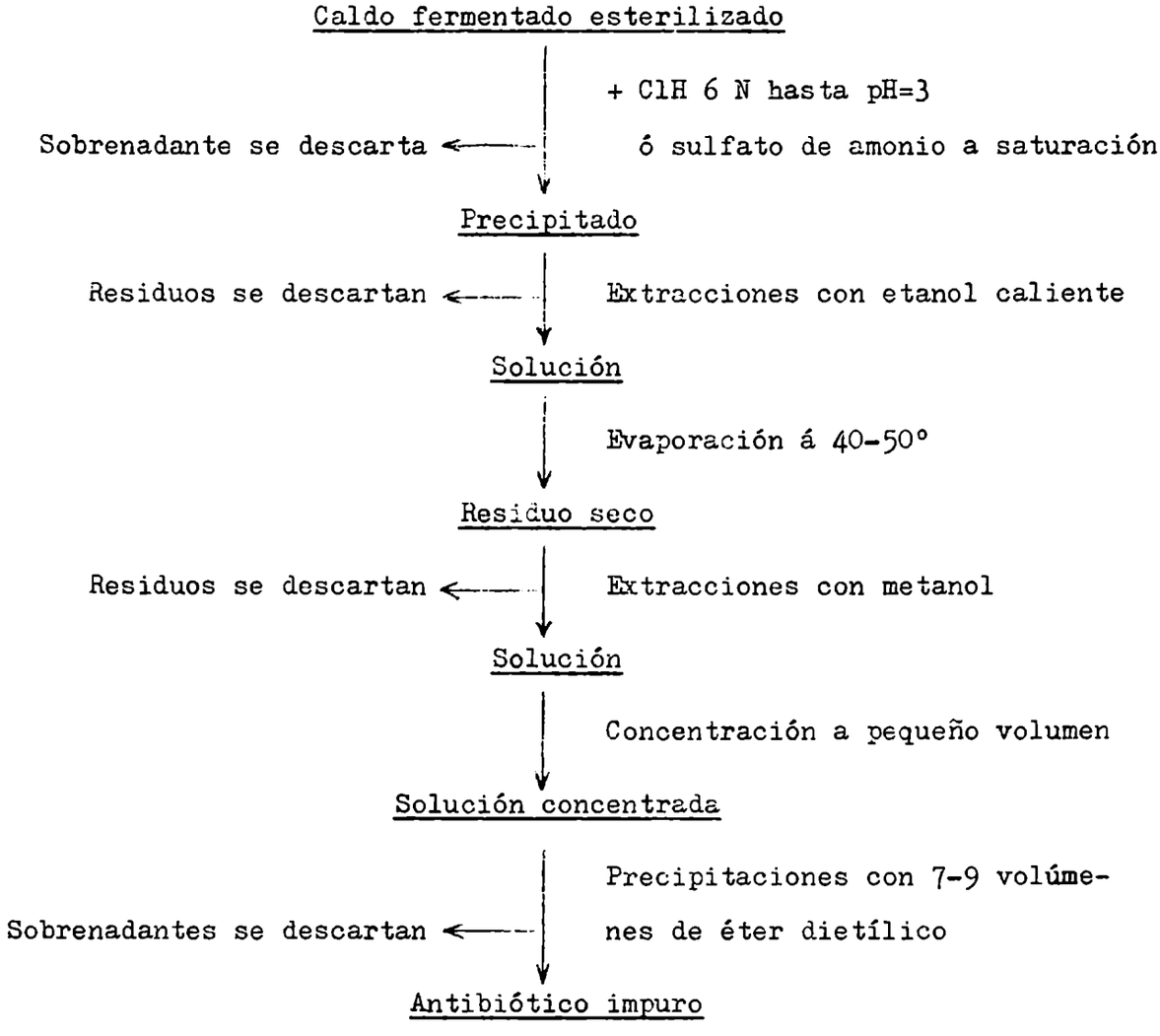
3.- PREPARACION

El medio de cultivo está constituído por caldo de papa (250 g de papa por litro), con 2 % de glucosa y 0.4 % de asparragina, que se distribuye en frascos de Povitsky en cantidades ajustadas para mantener una relación superficie/volumen de aproximadamente 400 cm^2 por litro.

El inóculo se preparó suspendiendo el desarrollo de dos estrías en tubo (agar-papa, glucosa 2 %) de la cepa DINR 49-4, en 25 ml de agua estéril, agitando con perlas de vidrio. Los caldos se sembraron con esta suspensión, inoculando aproximadamente al 0.2 % (v/v). Se incubó quince días á 25 $\pm$ 2°, al cabo de los cuales se forma una película gruesa y quebradiza. El caldo así fermentado se esterilizó 15 minutos á 1 atmósfera de sobrepresión, y una vez frío se precipitó el material activo llevando a pH=3 con ácido clorhídrico 6 N. El sistema se dejó una noche á 4-5°, se agitó luego con 3-4 g de Hyflo-supercel por cada litro de cultivo, y se centrifugó. El precipitado se extrajo tres veces con etanol caliente (casi a ebullición), y los extractos reunidos se filtraron y evaporaron a sequedad á 40-50°. El residuo seco se disolvió en la menor cantidad posible de metanol á 40° y la solución filtrada se evaporó a sequedad; todo este tratamiento se repitió dos veces más, de modo de conseguir una completa eliminación de sustancias poco solubles en metanol. Se preparó luego una solución metanólica concentrada del material así obtenido, que se precipitó con siete a nueve volúmenes de éter dietílico; el sobrenadante se descartó y con el residuo se repitió el tratamiento hasta obtener un sobrenadante casi incoloro; usualmente se requieren unas cuatro o cinco precipitaciones.

En algunas preparaciones se siguió un procedimiento ligeramente diferente: la modificación consistió en precipitar el material activo del caldo, con sulfato de amonio a saturación; el precipitado se lavó con solución saturada de sulfato de amonio y se secó á 37° antes de las extracciones con etanol caliente.

El siguiente es un esquema del proceso descripto, que es muy aproximadamente el utilizado por Cercós:



Se realizaron nueve fermentaciones y se procesaron en total unos 130 litros de caldo, lo cual permitió obtener aproximadamente 50 g de material activo impuro. En la Tabla 1 se consignan los resultados de cada una de las fermentaciones.

T A B L A 1

RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES

En la columna "Precipitación inicial", Sal indica que se usó sulfato de amonio a saturación.
La actividad específica es sobre Neurospora crassa DINR 136.

FERMENTACION	VOLUMEN DE CALDO En litros	PRECIPITACION INICIAL	RENDIMIENTO en g	ACTIVIDAD ESPECIFICA u/mg
F-1	9.75	Sal	3.1	24
F-2	9.75	"	5.7	30
F-3	10	"	5.0	30
F-4	16.5	pH 3	6.2	50
F-5	14.25	" "	6.3	38
F-6	18.25	" "	8.2	32
F-7	14.25	" "	6.4	70
F-8	18.5	" "	5.3	62
F-9	14.4	" "	8.7	70

C A P I T U L O III

ENSAYOS BIOLOGICOS

1.- ACTIVIDAD ANTIBIOTICA

El microorganismo sensible utilizado fué la Neurospora crassa. Se han usado dos cepas de este hongo: la DINR 136 (1) y la 73a (2). Con excepción de los valores de la actividad sobre esta última cepa, que figuran en la Tabla 8, todas las menciones de la potencia de las preparaciones se refieren a valoraciones hechas con N. crassa DINR 136. Esta cepa se mantiene en un medio de agar-papa con 2 % de glucosa. Para la valoración se utiliza un método de dilución seriada en caldo de papa con 2 % de glucosa, que se siembra con un cultivo de inoculación del hongo en el mismo medio, al 30-40 % de su volumen; este último cultivo se obtiene sembrando 125 ml de medio colocados en erlenmeyers de 500 ml, con un trozo de micelio de aproximadamente un centímetro de lado, e incubando 24-48 horas á 30 $\pm$ 2° con agitación recíproca (alrededor de 60 golpes/minuto). Se lo utiliza luego de verificar la ausencia de contaminantes en subcultivos de control, hechos en caldo de peptona, glucosa y rojo de fenol, durante 24 horas á 37°.

Una modificación de esta técnica, destinada a corregir los inconvenientes del manipuleo de una suspensión del micelio del hongo, y que permite conseguir una inoculación más uniforme, fué también empleada: el cultivo de inoculación en medio líquido ya descripto, se su-

---

(1) Suministrada por el Ing. A.P.Cercós.-

(2) Provista por el Dr. M.Nazario.-

plantó por una suspensión de esporas del hongo, obtenidas por incubación durante 4-5 días á 30 ± 2° en el medio semisólido de la siguiente composición (medio de cultivo para Neurospora, Difco Manual, 9a. Ed., 1953, p.214):

Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Maltosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH final=6.7

En este medio, el desarrollo de N.crassa DINR 136 es vigoroso, y da lugar a abundante esporulación al cabo del tiempo indicado; la suspensión de estas esporas con caldo de papa glucosado se obtiene fácilmente y casi desprovista de micelio grueso. Para el desarrollo obtenido sobre 150 ml de este medio en un erlenmeyer de 500 ml, el agregado de 100 ml de caldo da una suspensión que inoculada al 4-5 % (v/v) en el caldo del ensayo provee una siembra uniforme y satisfactoria.

Alícuotas de 2 ml de caldo inoculado se distribuyen en forma aséptica en tubos, y se agrega a los mismos, volúmenes crecientes de la solución del material en ensayo en caldo estéril con 10 % de etanol. Esta solución se prepara disolviendo la muestra, evaporada a sequedad estérilmente, en la cantidad de etanol adecuada (1/10 del volumen final de la solución a valorar), diluyendo luego con caldo estéril hasta alcanzar la concentración deseada del material activo; esta concentración varía generalmente entre 0.2 y 0.5 mg/ml para las fracciones más activas, y es de alrededor de 1 mg/ml para las preparaciones impuras.

Los tubos con caldo inoculado y antibiótico, se incuban 48 horas á 30 ± 2°, al cabo de las cuales se determinan las concentraciones mínimas de inhibición.

El ensayo se conduce por duplicado, y se hacen los correspondientes testigos y controles. Se define la unidad de actividad, como la menor masa de antibiótico necesaria para inhibir totalmente el desarrollo de 1 ml de la suspensión del hongo patrón.

La bacilomicina A es termoestable, lo cual permite conducir las valoraciones también de otra manera, utilizada por Cercós (1950): las alícuotas de la solución de antibiótico se agregan al caldo no estéril ya distribuído en los tubos; entonces se esterilizan, y una vez fríos se inoculan con pequeños trozos de micelio del hongo patrón, lo más uniformemente posible. Hemos preferido, en cambio, utilizar las técnicas anteriormente descriptas, especialmente la segunda, por las siguientes razones: a) las soluciones de materiales activos en solventes orgánicos son estériles y esta esterilidad puede preservarse adecuadamente durante su evaporación y posterior redisolución, observando las habituales precauciones; en ningún caso hemos encontrado contaminaciones provenientes de la solución de antibiótico así preparada; b) la densidad de inoculación es más controlable y probablemente más uniforme; c) se elimina una variable (la esterilización) cuya incidencia puede depender de las características del caldo, de por sí una variable dentro de ciertos límites, y de la preparación analizada.

Un ejemplo ilustrativo, el de la valoración de la actividad de un lote conservado durante tres años a menos de 10° en atmósfera seca, se presenta esquemáticamente:

> Se prepararon dos soluciones en caldo estéril con 10 % de etanol:
>
> solución 1, concentración= 0.845 mg/ml
>
> solución 2, concentración= 0.985 mg/ml
>
> Para cada una de estas soluciones se realizó el siguiente plan de dosaje, por duplicado:

TUBO N°	1	2	3	4	5	6	7	8
SOLUCION DE ANTIBIOTICO (ml/tubo)	-	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.10
SOLUCION CONTROL (ml/tubo)	0.10	-	-	-	-	-	-	-
CALDO INOCULADO (ml/tubo)	2	2	2	2	2	2	2	2
LECTURAS: Solución 1	+	+	+	$\pm$	-	-	-	-
LECTURAS: Solución 2	+	+	+	-	-	-	-	-

Abreviaturas (en LECTURAS): + : desarrollo normal

$\pm$: inhibición parcial

- : inhibición completa.

La solución control es caldo estéril con 10 % de etanol.

Las concentraciones mínimas de inhibición para cada solución, resultan, respectivamente, 0.0144 y 0.0148 mg/ml; la actividad específica: 69 y 68 u/mg respectivamente.

En los tubos con crecimiento normal, el hongo desarrolla vigorosamente en el interior del caldo y produce un micelio aéreo que suele alcanzar alturas de 20 á 40 mm por encima de la superficie libre del líquido. A concentraciones por debajo de las que producen inhibición completa, pero no muy alejadas de ella, se ha observado que la altura del micelio aéreo disminuye progresivamente con el aumento de la concentración de antibiótico, mientras el desarrollo en el interior del caldo aparece normal; si las concentraciones son suficientemente próximas, es posible obtener desarrollo normal en el caldo (y también deficiente), con inhibición completa del micelio aéreo. Estas observaciones sugieren la existencia de un efecto sub-funguistático sobre N.crassa DINR 136, en concordancia con estudios microscópicos más detallados, realizados por Favret (1952).

La valoración con N.crassa 73a se conduce en forma similar, excepto que los cultivos y el ensayo se hacen en un medio mínimo para

este hongo (Beadle y Tatum, 1945); en estas condiciones el desarrollo es muy homogéneo y,variable importante, el medio de cultivo, queda perfectamente fijada. Desafortunadamente, N.crassa DINR 136 crece con dificultad en este medio.

Los métodos de difusión no son directamente aplicables para la observación de la actividad de nuestro preparado, pues el antibiótico difunde muy pobremente en medios agarizados. Sin embargo es posible superar esta situación si la solución del antibiótico contiene un agente dispersante en concentración adecuada. Las soluciones se preparan con 10 % de etanol final, pero el 90 % restante del solvente son diluciones 1:5000 á 1:10000 de Tween 80 (1) ó Triton X-100 (2) en agua destilada. Discos de papel de filtro (diámetro=7 mm) impregnados en soluciones así preparadas de material impuro (1 mg/ml), dan halos netos de inhibición (10-11 mm) sobre Penicillium chrysogenum DINR 361, que de un conjunto ensayado mostró ser el hongo más adecuado para estas pruebas. La cantidad de antibiótico contenida en los discos se estimó en 0.030 á 0.050 mg.

Fué estudiada la estabilidad de soluciones del antibiótico impuro en buffer de fosfato 0.2 M á pH 5.85, 6.90 y 7.95 . Las soluciones fueron mantenidas a alrededor de 22° y muestras periódicamente extraídas y valoradas previa corrección del pH mostraron que en todos los casos la actividad sobre N.crassa DINR 136 se mantuvo prácticamente inalterada durante por lo menos quince días.

---

(1) Atlas Chemical Industries, Inc., Delaware, U.S.A.

(2) Rohm & Haas Company, Philadelphia, U.S.A.

2.- ACTIVIDAD HEMOLITICA

En el estudio de la actividad hemolítica se empleó la técnica de Dacie (1954) para la determinación de la resistencia globular.

Se preparó una suspensión de eritrocitos de conejo en una proporción del 20 % respecto de la sangre original, en una solución salina osmóticamente equivalente á 0.85 % de cloruro de sodio. Un ml de esta suspensión se incubó 20 minutos á 37-38° con 1 ml de soluciones de concentraciones crecientes de antibiótico (0.060 á 0.500 mg/ml) en la misma solución fisiológica equivalente. Se prepararon también un testigo (blanco de hemólisis) sin antibiótico, y un control de hemólisis total, en que la suspensión de eritrocitos se incuba con igual volumen de solución osmóticamente equivalente al 0.10 % de cloruro de sodio.

Luego de incubar, se centrifuga 10 minutos á 2500 r.p.m. y el grado de hemólisis se determina midiendo la densidad óptica del sobrenadante, utilizando el filtro adecuado (545 mμ).

Experimentos de este tipo fueron realizados para estimar la existencia de alguna correlación entre las actividades antibiótica y hemolítica.

C A P I T U L O IV

PURIFICACION DEL MATERIAL ANTIBIOTICO

1.- INTRODUCCION

El material antibiótico obtenido con las técnicas ya descriptas a partir de los caldos fermentados, es un sólido parduzco, algo higroscópico, casi insoluble en agua a pH inferiores á 7, y en solventes orgánicos no polares. Muy soluble en alcoholes de bajo peso molecular, es también bastante soluble en agua y en soluciones salinas a pH superiores á 7.

Una técnica de precipitación fraccionada en soluciones salinas fué empleada por Cercós (1954) para purificar la bacilomicina A; obtuvo así la primera evidencia de su probable heterogeneidad. Cercós preparó también un picrato del antibiótico que era muy soluble en agua y mostraba una actividad estequiométricamente equivalente.

Experiencias realizadas con preparaciones crudas indicaban que el material contenía algunas impurezas eliminables por diálisis (Burachik, Cercós y Eilberg, 1959).

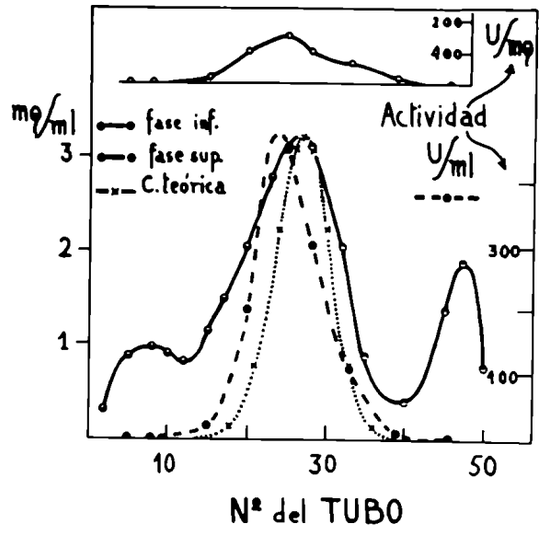
Las características del material en estudio, nos hizo pensar que la utilización de los métodos de distribución en contracorriente tenía buena probabilidad de resultar en su adecuada purificación. Si bien ella fué entonces encarada con esta idea, no quedaba en absoluto descartado el empleo de otras técnicas, que también fueron preliminarmente ensayadas con posterioridad.

2.- EXPERIENCIAS PRELIMINARES DE DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE

El sistema:
cloroformo/metanol/ácido clorhídrico 0.1 N (2:2:1, v/v), sistema I, fué elegido en la primera parte de estos trabajos. Este sistema había sido usado con éxito en el fraccionamiento de la tirocidina (Battersby y Craig, 1952 a), y en él nuestro material mostró tener un coeficiente de partición global adecuado (K= 0.7).

Tres distribuciones (50 transferencias) realizadas con muestras de otros tantos lotes diferentes, indicaron que el antibiótico era heterogéneo; la porción activa exhibía un coeficiente de partición cercano á 1. Estas distribuciones fueron analizadas mediante tres criterios: a) el peso seco; b) la densidad óptica á 280 mμ; y c) la actividad antibiótica. En la Figura 1 se presenta una de las distribuciones realizadas.

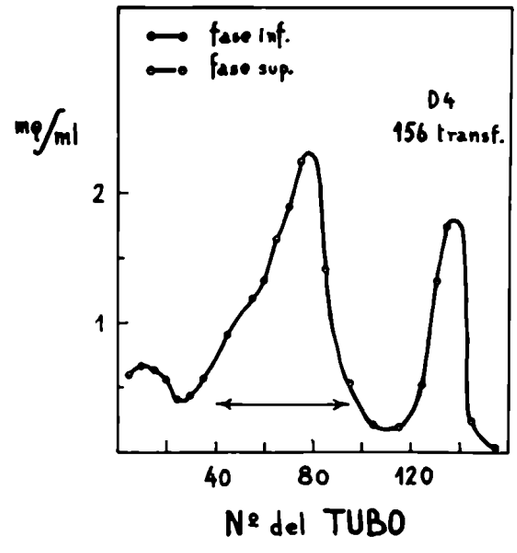
FIGURA 1



Distribución en contracorriente del antibiótico impuro. (D-3).
Muestra: 205 mg del lote F-7 (70 u/mg), cargados en cuatro tubos. Sistema I: cloroformo/metanol/ácido clorhídrico 0.1 N (2:2:1, v/v). Transferencias: 50.

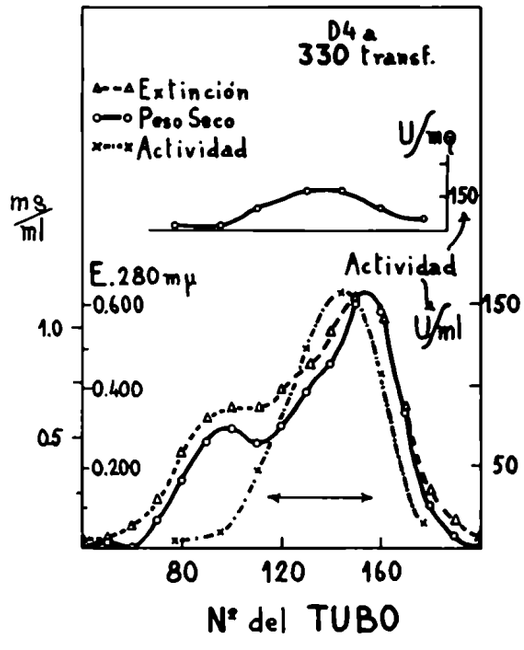
Para resolver la heterogeneidad de la porción activa, se realizó una distribución de una muestra mayor del producto impuro, en una máquina automática; fueron aplicadas 1142 transferencias, y la operación se cumplió en cuatro etapas, cada una de las cuales permitió eliminar materiales inactivos o poco activos previo análisis mediante los criterios ya citados. En las siguientes cuatro figuras (Figuras 2, 3, 4 y 5), se presentan los datos obtenidos en cada una de estas etapas.

FIGURA 2



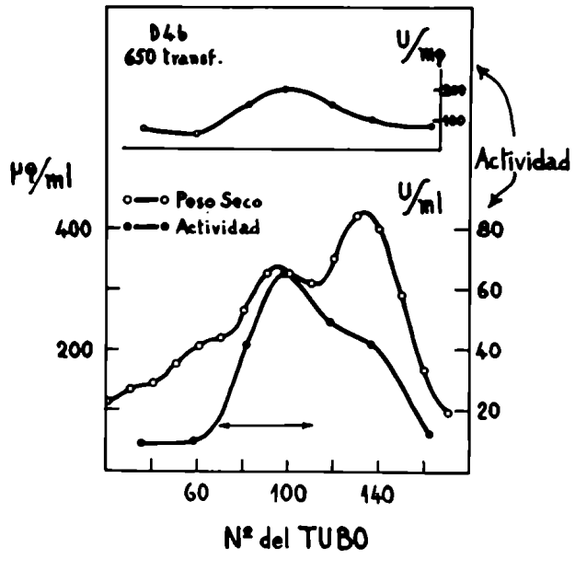
Distribución en contracorriente del antibiótico impuro. (D-4).
Muestra: 609 mg del lote F-7, cargados en 8 tubos.
Sistema I: cloroformo/metanol/ácido clorhídrico 0.1 N (2:2:1, v/v).
Transferencias: 156. Se continúa la distribución por reciclado de la zona comprendida entre los tubos 40 y 95 (indicada en el gráfico), luego de descartar todo el material que se encuentra fuera de ella.-

FIGURA 3



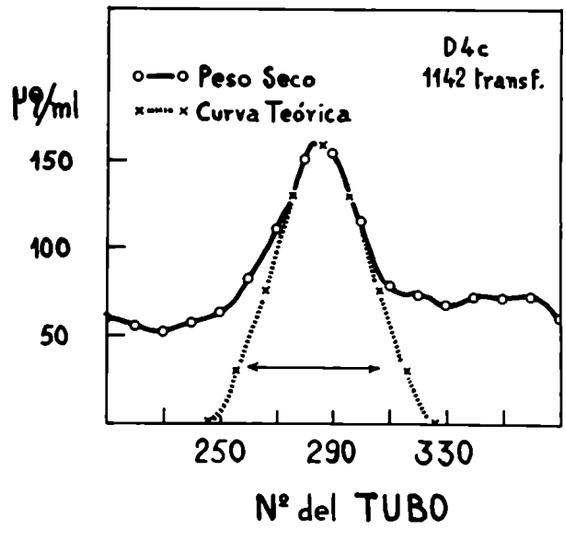
Continuación de la distribución D-4. (D-4 a). Transferencias: 330. La distribución se continúa como en D-4 (Figura 2), conservando esta vez la zona entre tubos 114 y 156 que, como puede verse, contiene el material de más elevada actividad específica.

FIGURA 4



Continuación de la distribución D-4 a. (D-4 b). Transferencias: 650. Como en D-4 a (Figura 3), se continúa por reciclado de la zona de mayor actividad específica, que se indica en el gráfico, comprendida entre los tubos 70 y 110. La masa de material incluída en esta zona se calculó en 52 mg, por integración de la curva.-

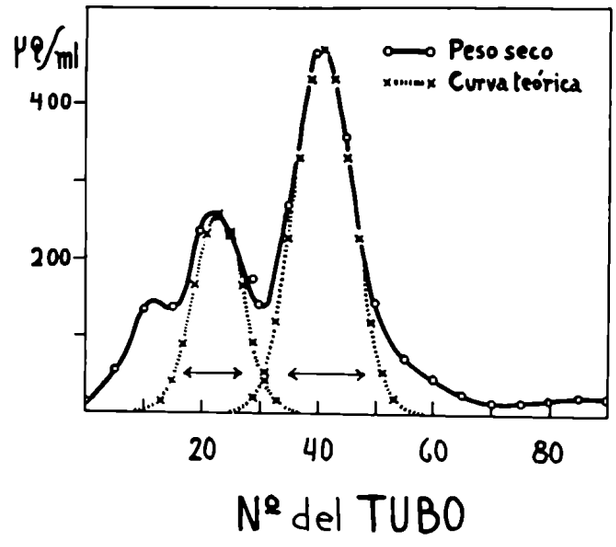
FIGURA 5



Continuación de la distribución D-4 b. (D-4 c). Transferencias: 1142. La distribución obtenida se aleja sensiblemente de una teórica calculada para una sustancia con K = 0.64 , correspondiente al tubo de máximo peso seco.
Se obtiene el material contenido entre los tubos 260 y 305, cuya masa calculada por integración de esta curva es aproximadamente 30 mg.-

Como se ve, la fracción activa así obtenida (Figura 5, entre tubos 100 y 145 del aparato, numerados 260 y 305 respectivamente en la distribución) no era aún homogénea, de modo que fué recuperada (aproximadamente 30 mg) y redistribuída en el mismo sistema. Ello permitió resolverla en dos componentes, fracciones A y B, cuyas distribuciones eran satisfactoriamente coincidentes con las que darían sustancias puras (Figura 6). Sus actividades específicas sobre N.crassa DIVR 136 eran: 250 u/mg para la fracción A, y 60 u/mg para la B; el lote impuro de partida tenía 70 u/mg.

FIGURA 6



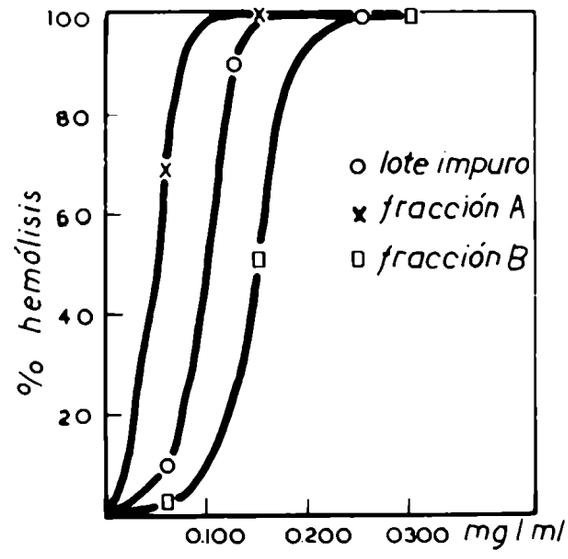
Distribución en contracorriente del material obtenido en D-4 c (Figura 5), aproximadamente 30 mg, cargados en 1 tubo. (D-5).
Sistema I: cloroformo/metanol/ácido clorhídrico 0.1 N(2:2:1)
Transferencias: 91.
Se obtienen las dos fracciones indicadas en el gráfico:
fracción A, entre tubos 35 y 48, K=0.82 , 19 mg;
fracción B, entre tubos 17 y 27, K=0.34 , 6.5 mg.
Las masas han sido calculadas por integración.

Como resultado de este fraccionamiento, algunas propiedades de los dos componentes aislados pudieron ser estudiadas. La comparación de las curvas de hemólisis indicó que la fracción A era también más hemolítica que el lote de partida; el componente B, en cambio, era menos hemolítico (Figura 7).

Los dos mostraron ser péptidos que, a menos de pequeñas diferencias que podían provenir de impurezas presentes, daban los mismos aminoácidos por hidrólisis ácida total: ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, serina y tirosina. Un hecho interesante, inmediata-

mente percibido, fué la presencia de prolina; este aminoácido no había sido identificado en la bacilomicina A (Sharon y col., 1954).

FIGURA 7

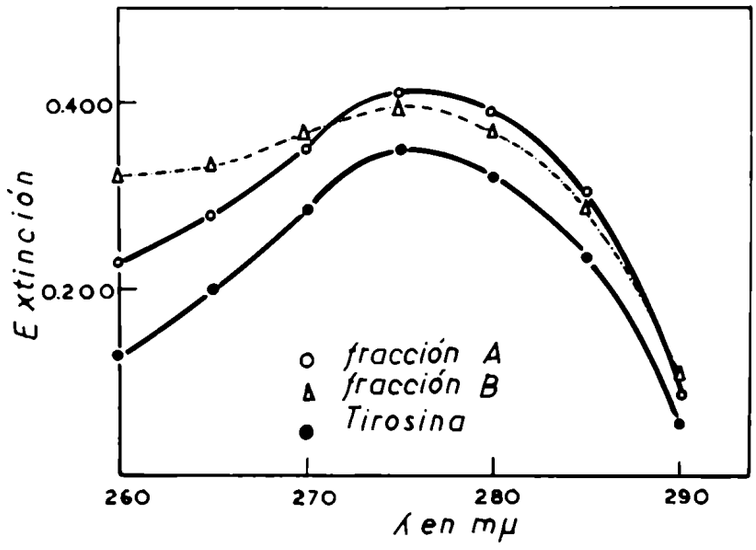


Curvas de hemólisis.
Se comparan las curvas obtenidas con un material impuro (F-7 , 70 u/mg) y con las dos fracciones que produjo su purificación en el sistema I: fracción A (250 u/mg) y fracción B (60 u/mg). (Véase el texto).-

El análisis de las curvas de absorción de ambos péptidos en la zona ultravioleta, comparada con la de tirosina, permitió calcular sus pesos moleculares mínimos, para un residuo de tirosina por mol. Los valores encontrados fueron: 1268 para la fracción A, y 1257 para la B.

En la Figura 8 se presentan las curvas de absorción obtenidas.

FIGURA 8

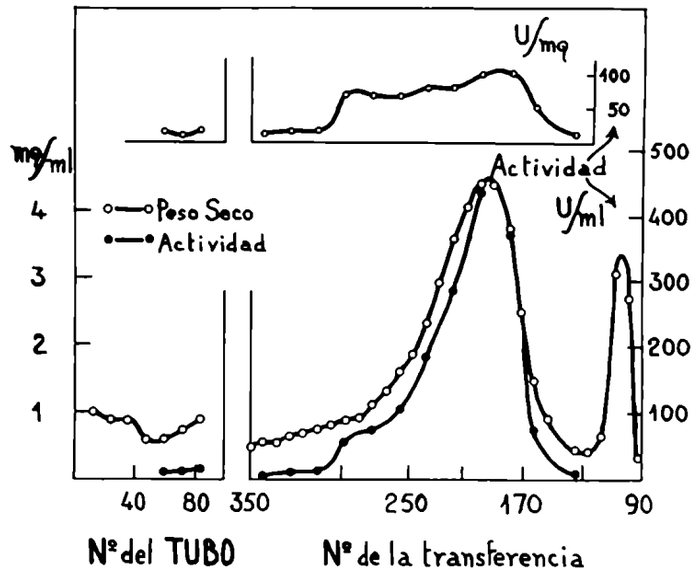


Espectros de absorción ultravioleta de las fracciones obtenidas del antibiótico impuro por distribución en contracorriente en el sistema I. (Véase Figura 6, y el texto).-

Las pequeñas cantidades de estos péptidos de que se dispuso, no permitieron ulteriores estudios, y fué necesario someter al fraccionamiento por distribución en contracorriente a una cantidad mayor del material impuro. Atendiendo a la experiencia ya alcanzada en este punto, el sistema I fué utilizado para un fraccionamiento grosero preliminar, que permitió obtener tres porciones activas arbitrariamente tomadas (que llamamos 6/a , 6/b y 6/c , ver Figura 9), pero para la posterior purificación de éstas, debió considerarse la necesidad de buscar sistemas de solventes más apropiados, tanto en lo referente a poder resolutivo como a coeficiente de partición. Este último aspecto era particularmente crítico pues sólo si se conseguían las condiciones para un valor muy bajo del coeficiente de partición, era posible aplicar en los aparatos disponibles (160 tubos) un número

elevado de transferencias como exigía la naturaleza del material en estudio.

FIGURA 9



Distribución en contracorriente del antibiótico impuro. (D-6).
Muestra: 4.83 g del lote F-7, cargados en 10 tubos.
Aparato: manual, volúmenes de fases= 10 ml.
Sistema I: cloroformo/metanol/ácido clorhídrico 0.1 N (2:2:1, v/v).
Transferencias: 350; a partir de la transferencia N° 91, se opera en "single withdrawal" (Craig y Craig, 1956). La zona activa se recupera dividida en tres porciones:

6/a , entre transferencias 256 y 297 ,
6/b , entre transferencias 196 y 255 , y
6/c , entre transferencias 160 y 195 .-

Fué determinado el coeficiente de reparto en cierto número de sistemas de solventes, mediante la siguiente técnica: en pequeñas ampollas de decantación o tubos con tapón esmerilado, se preparan unos 10 ml del sistema, que se equilibra adecuadamente. La muestra del material se coloca en un tubo pequeño con tapón esmerilado de muy

buen ajuste; frecuentemente se trata de una solución metanólica de concentración conocida, que es evaporada a seco a baja temperatura para hacer la determinación. Se emplean corrientemente 1.5 á 5 mg de muestra. Al material seco en el tubo, se agregan entonces 2 ml de cada una de las fases del sistema en estudio, se observa cómo procede la disolución y se equilibra, bien tapado, con movimientos similares a los que se operan en el aparato de distribución en contracorriente.

Se mide el tiempo de separación de las fases, la temperatura del recinto, y se observan las características del sistema (distribución del color, aspecto de la interfase), que son datos de valor en la evaluación de su utilidad.

El análisis posterior se conduce de acuerdo con la naturaleza del sistema:

a) si el sistema es totalmente volátil, se determina el coeficiente de partición midiendo el peso seco de alícuotas cuidadosamente tomadas de cada una de las fases; en estos casos es posible calcular la recuperación, que rara vez está fuera del 90 - 110 % , y la exactitud de las pesadas ($\pm$ 0.010 mg) permite asegurar la segunda cifra decimal para valores del coeficiente de reparto no muy alejados de 1 ;

b) si el sistema contiene sales fijas, y una determinación previa realizada sin muestra revela que no hay apreciable solubilización de ellas en una de las fases, corrientemente la superior, (menos que 0.030 mg/ml),entonces, luego de centrifugar, se determina el peso seco de una alícuota de esa fase; el cálculo del coeficiente de partición se hace admitiendo una recuperación del 100 %;

c) si las sales del sistema se distribuyen en las dos fases, el coeficiente de partición se determina por medida de la extinción á 275 mμ de alícuotas de cada fase, convenientemente diluídas; en algunos casos, también se ha recurrido al dosaje del nitrógeno total (micro-Kjeldahl) en cada fase.

T A B L A 2

DETERMINACION DE COEFICIENTES DE PARTICION

Salvo que se indique otra cosa, las determinaciones se realizaron con un material parcialmente purificado.
Aclaraciones: (a) solubilidad menor que 1 mg/ml ; (b) se mide el peso seco en una de las fases ; (c) se determinó K por extinción á 275 m μ ; (d) se determinó K por micro-Kjeldahl ; (e) los solventes se encuentran en equilibrio de esterificación en presencia de H^+ ; (f) con material impuro.

SISTEMA N °	COMPOSICION (v/v)	K	OBSERVACIONES
III	ClH 0.1 N/butanol-n, (1:1)	7	(f)
1	ClH 1 N/metanol/éter de petróleo, (3:7:10)	0	
2	ClH 0.5 N/metanol/acetato de etilo, (10:3:10)	0.62	
3	ClH 0.1 N/metanol/acetato de etilo, (10:3:10)	0.95	
4	ClH 0.1 N/metanol/acetato de etilo, (10:4:10)	0.92	
5	ClH 0.1 N/ butanol-n/éter de petróleo, (5:1:5)	-	(a)
6	ClH 0.1 N/ butanol-n/éter de petróleo, (2:1:2)	-	(a)
7	Ac.acético 2 N/metanol/acetato de etilo,(7:3:10)	1.3	
8	Ac.acético 1 N/metanol/éter dietílico, (1:1:2)	0.39	
9	Ac.acético 1 N/metanol/éter dietílico,(10:10:27)	0.14	
10	Ac.acético 1 N/metanol/éter dietílico, (1:1:2)	0.29	(e)
11	Ac.acético 1 N/metanol/éter dietílico,(10:10:27)	0.17	(e)
12	Buffer fosfato 0.5M (pH=4.65)/acetato de etilo, (1:1)	-	(a)
13	Buffer fosfato 0.5M (pH=5.55)/acetato de etilo, (1:1)	-	(a)
14	Buffer fosfato 0.5M (pH=7.75)/acetato de etilo, (1:1)	-	(a)
15	Buffer fosfato 0.5M (pH=6.58)/acetato de etilo, (1:1)	-	(a)
16	Buffer fosfato 0.5M (pH=6.90)/butanol-n, (1:1)	21	(c)
17	Buffer fosfato 0.5M (pH=8.85)/butanol-n, (1:1)	8.6	(c)

T A B L A 2

(Continuación)

SISTEMA N °	COMPOSICION (v/v)	K	OBSERVACIONES
18	Buffer fosfato 0.5M (pH=4.65)/metanol/éter de petróleo, (10:3:10)	-	(a)
19	Buffer fosfato 0.5M (pH=4.65)/metanol/éter diétílico, (10:3:10)	-	(a)
20	Buffer fosfato 0.5M (pH=4.65)/metanol/acetato de etilo, (10:3:10)	1.5	(b,f)
21	Buffer fosfato 0.5M (pH=6.58)/metanol/acetato de etilo, (10:3:10)	0.87	(b,f)
22	Buffer fosfato 0.5M (pH=7.75)/metanol/acetato de etilo, (10:3:10)	0.76	(b,f)
23	Buffer fosfato 0.5M (pH=4.65)/metanol/acetato de etilo, (10:3:10)	1.98	(b)
24	Buffer fosfato 0.5M (pH=4.65)/metanol/acetato de etilo/éter de petróleo, (10:3:5:5)	-	(a)
25	Buffer acetato 0.4M (pH=4.60)/metanol/benceno (1:1:2)	-	(a)
26	Buffer acetato 0.4M (pH=4.60)/metanol/benceno (2:7:4)	0	(b)
27	Buffer acetato 0.4M (pH=4.60)/metanol/benceno/ butanol-n, (3:3:4:2)	0.51	(b)
28	Buffer acetato 0.4M (pH=4.60)/metanol/benceno/ butanol-n, (3:4:4:1)	0.04	(b)
29	Buffer acetato 0.4M (pH=3.60)/metanol/benceno/ butanol-n, (6:8:8:3)	0.09	(b)
30	Buffer acetato 0.4M (pH=4.60)/metanol/benceno/ butanol-n, (6:8:8:3)	0.08	(b)
31	Buffer acetato 0.4M (pH=5.60)/metanol/benceno/ butanol-n, (6:8:8:3)	0.09	(b)
II	Buffer citrato 0.2M (pH=6.20)/metanol/benceno/ butanol-n, (6:8:8:3)	0.11	(b)

T A B L A 2
(Continuación)

SISTEMA N °	COMPOSICION (v/v)	K	OBSERVACIONES
32	Buffer borato 0.2M (pH=7.60)/metanol/benceno/ butanol-n, (6:8:8:3)	0.07	(d)
33	Buffer borato 0.2M (pH=8.60)/metanol/benceno/ butanol-n, (6:8:8:3)	0.07	(d)
34	Cloroformo/ác.acético/agua, (2:2:1)	1.26	
35	Cloroformo/benceno/metanol/ClH 0.01 N, (10:20:23:7)	37	
36	Cloroformo/benceno/ác.acético/agua, (13:10:26:10)	8.9	
37	Ac.acético/butanol-n/agua, (1:4:4)	5.3	
38	Ac.acético 0.1 %/butanol-n/piridina, (24:10:7)	5.2	

Los resultados de esta investigación se presentan en la Tabla 2.

Con los sistemas 10, 29, 30, 31, II y 32 (Tabla 2), se realizaron sendas distribuciones (75 transferencias) con pequeñas muestras de un material parcialmente purificado en anteriores intentos de emplear el sistema I. De esta manera se encontró que algunos de ellos, si bien proveían las condiciones para un bajo coeficiente de reparto de la porción activa, presentaban un poder resolutivo que de todas formas obligaría a aplicar un elevado número de transferencias; el problema era, no obstante, abordable con los aparatos disponibles.

De la evaluación de estas experiencias, el sistema II fué elegido para posteriores estudios, excepto que se varió la concentración del buffer, que se empleó 0.15 M.

En este sistema fueron analizadas las fracciones ya mencionadas

6/b y 6/c (Figura 9), cada una de las cuales se resolvió en por lo menos dos componentes activos; en ambos casos la heterogeneidad no pudo ser completamente resuelta, aunque se llegó (para 6/c) á 2000 transferencias. Todos estos componentes tenían diferente actividad antibiótica, pero sus hidrolizados daban los mismos aminoácidos mencionados antes, y no podía descartarse la posibilidad de que alguno de ellos estuviera presente en las dos fracciones analizadas. En particular, uno de estos componentes fué distribuído posteriormente en el sistema I y obtenido como una entidad homogénea. Reveló poseer esos mismos aminoácidos en la proporción: ácido aspártico (3), ácido glutámico (1), prolina (2), serina (1) y tirosina (1). Ninguno de los péptidos posteriormente obtenidos en forma purificada en este trabajo demostró contener 2 prolinas, y aunque se estudió la posibilidad de una destrucción del aminoácido durante la hidrólisis, esta cuestión no pudo ser satisfactoriamente resuelta.

Para separar los materiales activos, de las sales presentes en el sistema de solventes utilizado en su obtención (sistema II con el buffer 0.15 M), cada una de las fracciones retirada del aparato de contracorriente se evapora a sequedad en vacío a baja temperatura y se somete a una nueva distribución, esta vez en el sistema III (Tabla 2). En este sistema, el coeficiente de partición de las sales es muy bajo, y el de los materiales activos muy elevado, de modo que al cabo de un número relativamente pequeño de transferencias (generalmente no superior á 140), se obtiene la separación deseada.

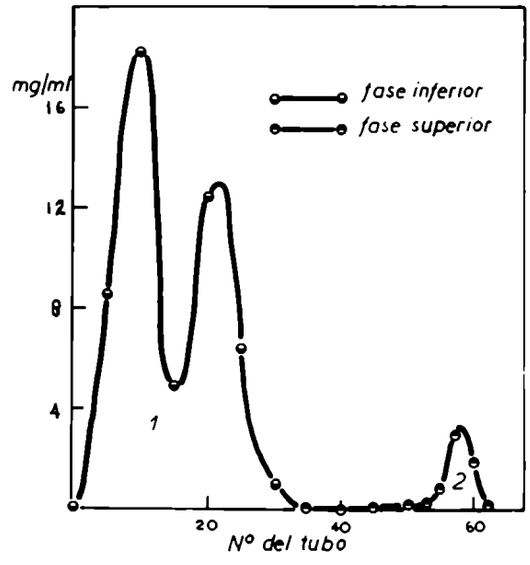
Otro sistema de solventes también utilizado para esta recuperación fué:

buffer de acetato de amonio 0.2 M (pH=6.9)/butanol-n, (1:1, v/v).

En este caso la separación ya es satisfactoria al cabo de 20 á 25 transferencias, y la eliminación del acetato de amonio que acompaña al material de interés se efectúa por liofilización.

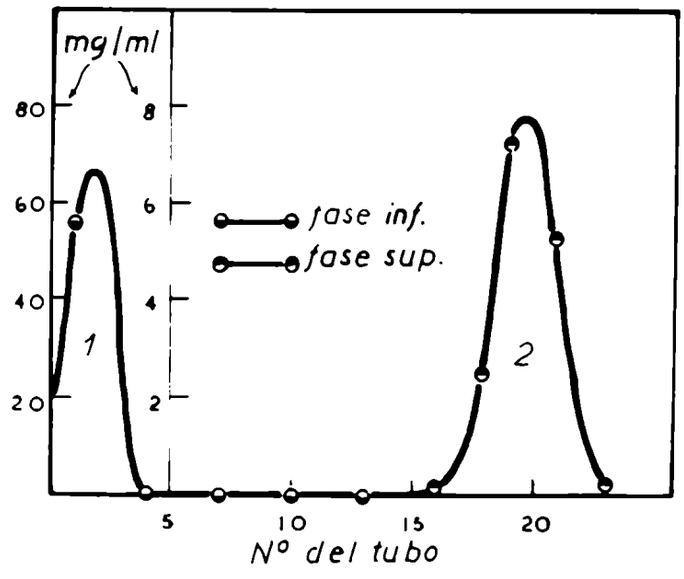
En las Figuras 10 y 11, se presentan ejemplos típicos de estas distribuciones de desalificación.

FIGURA 10



Distribución en contracorriente de una fracción activa del antibiótico, que se obtuvo mezclada con las sales provenientes del sistema II. (D-21). La muestra: 28 mg de péptido (calculada por integración de la curva correspondiente) y 400 mg de sales, se cargó en tres tubos (volúmenes de fases = 1.8 ml).
Sistema III: ác.clorhídrico 0.1 N/butanol-n, (1:1, v/v). La muestra seca se suspendió en 3.6 ml de fase inferior y el pH fué corregido á 1 con ác. clorhídrico 6 N, antes de equilibrar con fase superior y cargar.
Transferencias: 60. La zona 1 contiene las sales (análisis por nitrógeno: menos que 0.003 mg de nitrógeno/ml) y se descarta. La zona 2 (K=29) contiene todo el nitrógeno de la muestra; cantidad obtenida (pesada)= 30 mg.-

FIGURA 11



Distribución en contracorriente de una fracción activa del antibiótico, que se obtuvo mezclada con las sales presentes en el sistema II. (D-33).
Muestra: 400 mg de péptido (calculada por integración de la curva correspondiente) y 700 mg de sales (estimada); cargada en tres tubos (volúmenes de fases = 10 ml).
Sistema: buffer de acetato de amonio 0.2 M (pH=6.9)/ butanol-n, (1:1, v/v).
Transferencias: 20. La zona 1 contiene las sales (densidad óptica nula á 275 m μ); la zona 2 contiene el material activo, y se recupera por liofilización (350 mg aproximadamente).-

---

3.- FRACCIONAMIENTO

Sobre la base del estudio preliminar efectuado, se emprendió un fraccionamiento en mayor escala; éste se realizó con el lote F-9, por distribución en contracorriente en el sistema II, empleando el buffer 0.15 M (Tabla 2).

Se utilizaron dos aparatos, uno automático de 160 tubos (volumen de fase inferior = 3.2 ml) y otro manual de 80 tubos (volumen de fase inferior = 1.8 ml).

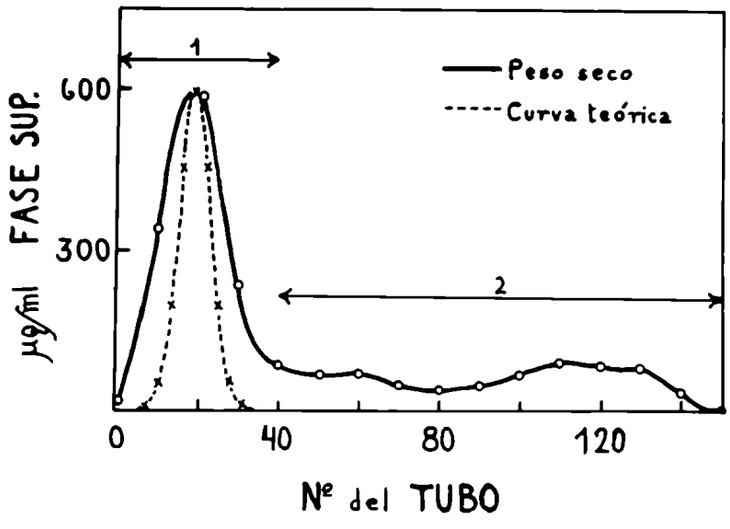
La complejidad del cuadro que se obtenía si se utilizaban fraccionamientos previos de la porción activa, para un análisis exhaustivo en el sistema elegido, mostró la necesidad de efectuar tal análisis partiendo del material impuro inicial.

La primera distribución (Figura 12) se realizó hasta alcanzar 145 transferencias, y permitió descartar materiales poco activos distribuídos en la zona 2 (actividad específica menor que 40 u/mg). La zona 1 contiene la totalidad de la actividad antibiótica pero es francamente heterogénea; por lo tanto se continuó la distribución operándose por reciclado (Craig y Craig, 1956), hasta llegar a las 932 transferencias, en que se practicaron nuevos análisis (Figura 13). La zona 1 de esta distribución, contiene material con muy baja actividad (menos que 40 u/mg) y se descarta; la sustancia de la zona 2 es bastante activa (100 u/mg) pero se retira de la máquina para dar lugar a la distribución posterior, que también se realiza por reciclado, hasta 1392 transferencias (Figura 14). La zona 2 de esta distribución, tubos 135 á 173, que contiene material con actividad biológica elevada, se retira de la máquina. Esta fracción es la que denominamos I en el estudio químico y biológico descripto posteriormente. El material de la zona 1 (Figura 14), se continúa distribuyendo por reciclado hasta las 2871 transferencias (Figura 15). El análisis de esta distribución permitió separar la fracción II, de los tubos 197 á 239, y la fracción

III, de los tubos 130 á 164.

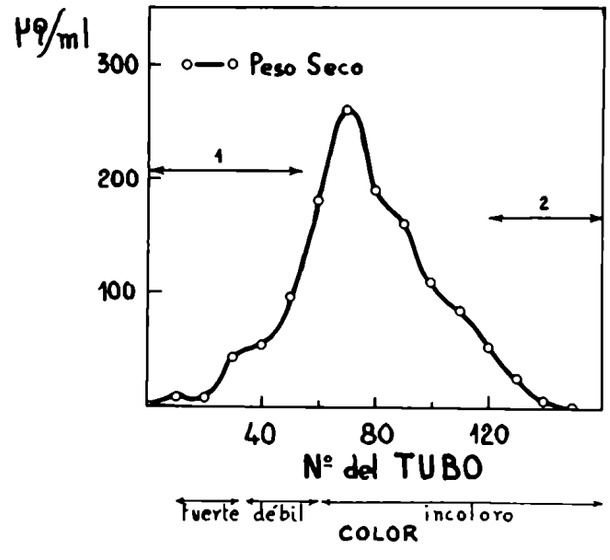
En la Tabla 3 se resumen las características de estos tres materiales.

FIGURA 12



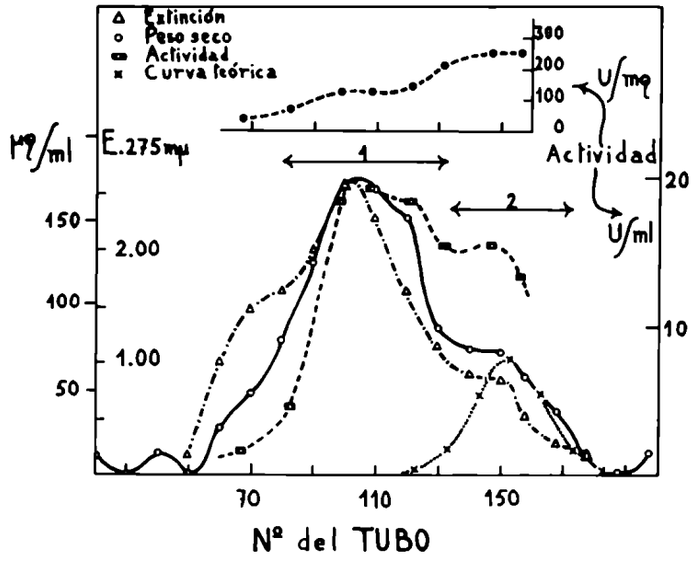
Distribución en contracorriente del antibiótico impuro. (D-27).
Muestra: 619 mg del lote F-9 (70 u/mg), cargados en 14 tubos (volúmenes de fases = 3.2 ml).
Sistema: buffer de citrato 0.15 M (pH=6.20)/metanol/benceno/butanol-n, (6:8:8:3, v/v).
Transferencias: 145. Se continúa la distribución reciclando la zona comprendida entre los tubos 0 y 40 , intensamente coloreada, que contiene la totalidad de la actividad antibiótica. La porción restante (entre tubos 41 y 159), que contiene materiales con actividad menor que 40 u/mg, se descarta.-

FIGURA 13



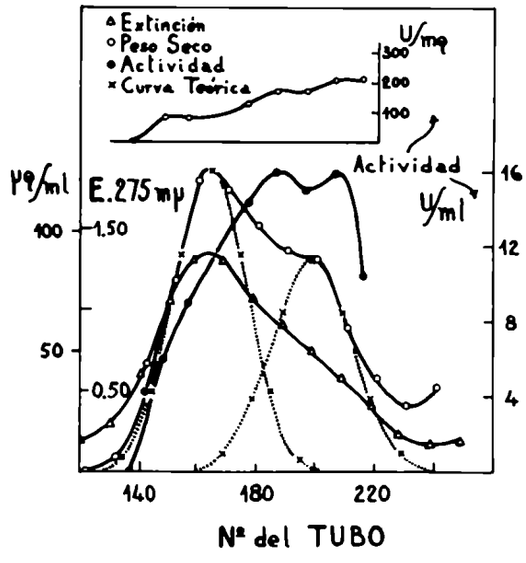
Continuación de la distribución D-27. (D-27 b)
Transferencias: 932; a partir de la transferencia Nº 492, en que se practicó un análisis cuyo gráfico no se consigna, el volumen de la fase superior se ajustó á 2 ml, para reducir el coeficiente de partición efectivo.
La zona comprendida entre los tubos 0 y 41 se descarta (actividad menor que 40 u/mg); la comprendida entre 121 y 158 se retira de la distribución y conserva (actividad = 100 u/mg); la situada entre los tubos 42 y 120 , que contiene casi toda la actividad antibiótica, se continúa reciclando.-

FIGURA 14



Continuación de la distribución D-27 b. (D-27 c).
Transferencias: 1392.
Se aísla la zona entre tubos 135 y 173 (fracción I).
Se continúa reciclando la comprendida entre tubos 80 y 134, luego de descartar todo el resto, que resultó prácticamente inactivo.-

FIGURA 15



Continuación de la distribución D-27 c. (D-27 d).
Transferencias: 2871.
Se aíslan tres zonas:
entre tubos 197 y 239 (fracción II),
entre tubos 130 y 164 (fracción III), y
entre tubos 165 y 196 (mezcla de fracciones II y III).-

Como ya se ha indicado en la descripción de las experiencias preliminares, todas estas fracciones debieron ser recuperadas del sistema empleado, mediante sendas distribuciones del material seco en el sistema III (Tabla 2).

Es útil agregar que una posterior distribución del material impuro inicial en el mismo sistema utilizado para obtener las fracciones que se acaban de describir, realizada en una máquina automática de 1000 tubos (volumen de fase inferior = 3 ml), permitió corroborar plenamente este cuadro general en cuanto a la complejidad de la porción

activa del antibiótico. Al cabo de 5120 transferencias, realizadas en seis etapas, un similar conjunto de tres fracciones activas, no totalmente resueltas, pudo ser obtenido.

Experiencias preliminares utilizando cromatografía de partición sobre sílica-gel y cromatografía en capa delgada sobre este mismo material, demuestran que estos métodos pueden ser de valor para una ulterior resolución y análisis de estas fracciones.

T A B L A 3

COEFICIENTE DE PARTICION Y ACTIVIDAD ANTIBIOTICA DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS

Aclaraciones: (a) calculado a partir de los datos de la distribución respectiva;
(b) sobre N.crassa DINR 136.-

FRACCION	COEFICIENTE DE PARTICION (a)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (u/mg) (b)
I	0.12	250
II	0.07	210
III	0.06	80

C A P I T U L O V

ESTUDIO QUIMICO DE LAS FRACCIONES ACTIVAS OBTENIDAS

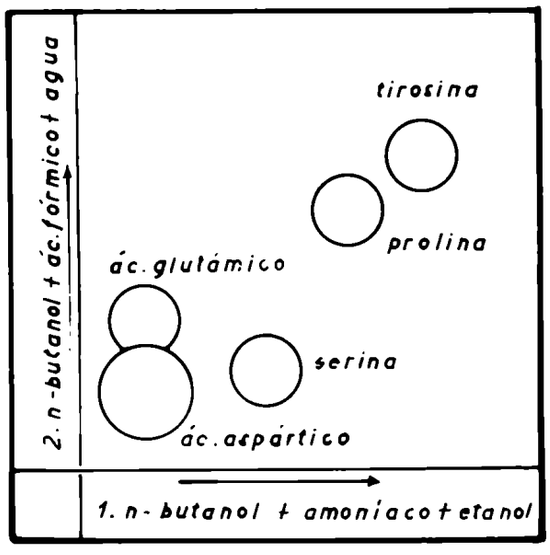
1.- HIDROLISIS TOTAL Y CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

Las fracciones aisladas se hidrolizaron con ácido clorhídrico 6 N, durante 24 horas á 110° en tubo cerrado. Una vez eliminado el ácido clorhídrico en exceso, los hidrolizados se sometieron a una cromatografía bidimensional sobre papel Whatman N° 1, utilizando como sistemas de solventes, butanol-n/amoníaco 2.8 %/etanol (10:4:3, v/v) para la primera dimensión, y butanol-n/ácido fórmico 90 %/agua (15:3:2, v/v) para la segunda. Los cromatogramas se revelaron por inmersión en una solución de ninhidrina al 0.2 % en acetona, y una vez secos, calentando 10 minutos á 80°.

En las tres fracciones obtenidas (Capítulo IV, 3.-), y también en las que resultaron de las experiencias preliminares, se identificaron los mismos aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, serina y tirosina. La mancha correspondiente al ácido aspártico resultó ser más intensa que las de los restantes aminoácidos.

En la Figura 16, se observa el diagrama de uno de los similares cromatogramas obtenidos.

FIGURA 16



Esquema de un cromatograma obtenido con el hidrolizado de una fracción activa (aproximadamente 0.11 mg de hidrolizado).-

---

2.- ANALISIS CUANTITATIVO DE AMINOACIDOS

Se utilizó la técnica de Moore, Spackman y Stein (1958). Los materiales se hidrolizaron como se describió anteriormente, y el exceso de ácido se eliminó evaporando a sequedad en vacío, sobre hidróxido de sodio.

Los resultados figuran en la Tabla 4 ; uno de los gráficos obtenidos se presenta en la Figura 17.

T A B L A 4

COMPOSICION EN AMINOACIDOS

DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS

En la relación molar se ha considerado tirosina = 1 .-

AMINOACIDO	FRACCION I		FRACCION II		FRACCION III	
	% en peso	Relación molar	% en peso	Relación molar	% en peso	Relación molar
Ac.aspártico	25.4	3.17	24.63	2.83	25.1	2.5
Ac.glutámico	10.34	1.17	10.43	1.1	12.07	1.09
Prolina	7.46	1.11	8.84	1.18	7.53	0.88
Serina	5.95	0.93	5.97	0.86	5.57	0.71
Tirosina	10.94	1.00	11.75	1.00	13.74	1.00

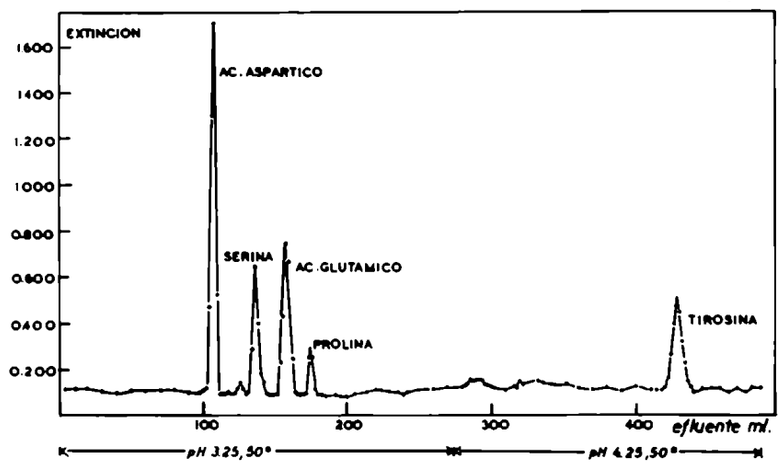
Además de las cantidades de aminoácidos que se consignan, las muestras analizadas contenían cloruros (entre 20 y 30 % , expresado como cloruro sódico). Considerando la suma de estos datos, se obtuvieron valores que dieron cuenta del 80 al 92 % del peso de las muestras.

La posibilidad de una destrucción de prolina durante la hidrólisis fué estudiada en relación con la composición de uno de los péptidos encontrados durante los experimentos preliminares de purifica - ción. Este péptido mostraba la composición mínima: ácido aspártico (3), ácido glutámico (1), prolina (2), serina (1) y tirosina (1), diferente a la de todos los posteriormente estudiados, que contenían un solo residuo de prolina. Como en ciertas secuencias que incluían prolina, una definida destrucción del aminoácido durante la hidrólisis ácida pudo ser comprobada por otros autores (Elliott, Lewis y Horton, 1960), resultó de interés estudiar el problema en una de las

fracciones activas del antibiótico. Entre 0.5 y 1 mg de péptido (fracción III) se hidrolizaron como habitualmente, sólo que las hidrólisis se interrumpieron a las 4 , 8 , 16 y 24 horas de comenzadas. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Como puede observarse, prolina se libera rápidamente y no hay apreciable destrucción en las condiciones experimentales utilizadas.

FIGURA 17



Composición en aminoácidos de un hidrolizado de la fracción I , cromatografiado sobre una columna de Amberlite IR 120 tipo II.
La muestra fueron 0.655 mg de fracción I, disueltos en 0.05 ml de ácido acético, hidrolizados por 24 horas á 110° con 0.5 ml de ácido clorhídrico 6 N.-

T A B L A 5

COMPOSICION DEL HIDROLIZADO DE LA FRACCION III

A DISTINTOS TIEMPOS DE HIDROLISIS

Los valores de ácido aspártico y tirosina que no se consignan, no fueron determinados.
Las muestras fueron: 0.543 mg (4 horas), 1.005 mg (8 horas), 0.935 mg (16 horas) y 0.600 mg (24 horas) de péptido.-

AMINOACIDO	% EN PESO EN EL HIDROLIZADO			
	4 horas	8 horas	16 horas	24 horas
Ac.aspártico	-	-	-	22.7
Ac.glutámico	10.7	11.7	11.9	12.07
Prolina	7.44	7.58	8.23	7.53
Serina	3.36	4.97	5.8	5.57
Tirosina	-	12.3	12.64	13.7

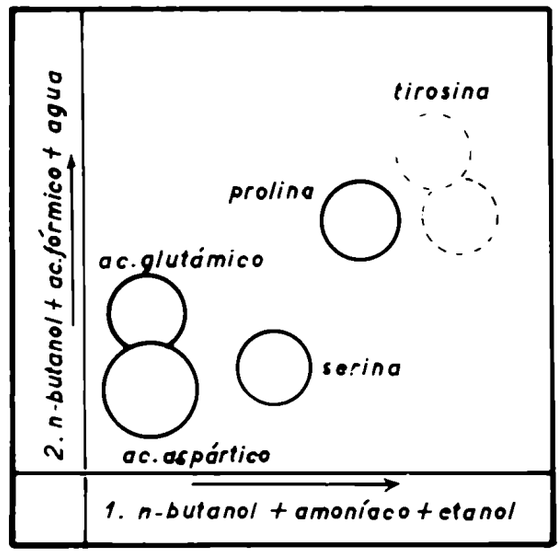
3.- AMINOACIDO N-TERMINAL

Para su determinación se empleó el método de Sanger (1945), en la modificación de Sanger y Thompson (1953).

Aproximadamente 0.350 mg del péptido se disolvieron en 0.1 ml de una solución acuosa de trimetilamina al 1 % (v/v) y se trataron con 0.21 ml de una solución de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) en etanol al 5 % (v/v); la mezcla de reacción se colocó en la oscuridad, 3 horas a temperatura ambiente y 3 horas á 27-28°, agitando frecuentemente. El exceso de FDNB se eliminó del sistema de reacción me-

diante extracciones con éter dietílico, el residuo se disolvió en una cantidad mínima de ácido acético e hidrolizó con ácido clorhídrico 6 N , 8 horas á 105° en tubo cerrado. El hidrolizado se analizó por cromatografía bidimensional en papel, siguiendo la técnica ya descripta.

FIGURA 18



Esquema de un cromatograma obtenido con el hidrolizado del producto de reacción de una fracción activa con FDNB (aproximadamente 0.12 mg de hidrolizado).-

Los cromatogramas obtenidos fueron prácticamente iguales para las tres fracciones; se identificaron los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, prolina y serina; la mancha correspondiente a tirosina se encontró fuertemente disminuída, casi imperceptible, y cerca de ella apareció una nueva mancha muy tenue. En ningún caso pudo detectarse la presencia de algún N-dinitrofenil aminoácido.

En la Figura 18, puede verse el esquema de uno de los cromatogramas obtenidos.

4.- DETERMINACION DE NITROGENO AMIDICO

El NH_4^+ formado en condiciones de hidrólisis selectivas para grupos amidas (Speck, 1949), fué determinado con la técnica de microdifusión de Conway (1957); para liberar el amoníaco de los hidrolizados se utilizó buffer de borato saturado de pH = 10.65 (Archibald, 1944), y para su absorción ácido sulfúrico 0.01 N . El amoníaco absorbido fué valorado por el método de Rosen (1957).

Los resultados obtenidos para las tres fracciones activas figuran en la Tabla 6.

T A B L A 6

DETERMINACION DE NITROGENO AMIDICO

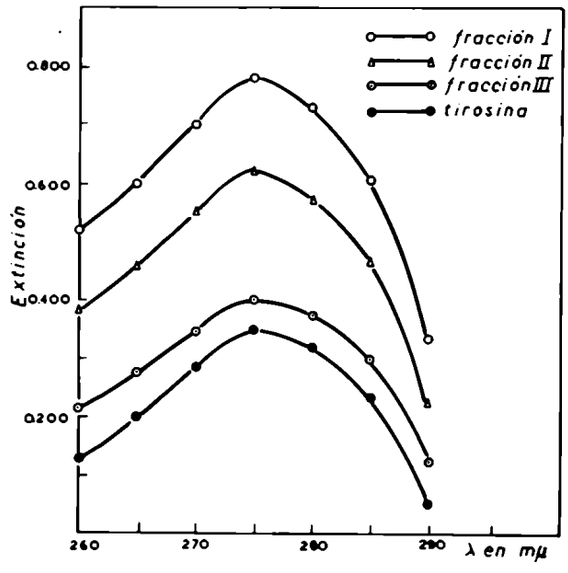
El peso molecular mínimo se calculó como la masa de péptido que contiene 1 átomo gramo de nitrógeno amídico.-

	FRACCION I	FRACCION II	FRACCION III
% N-AMIDICO	1.38	1.34	1.24
PESO MOLECULAR MINIMO	1018	1083	1130

5.- ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA

Todas las mediciones se hicieron con soluciones en etanol 60 %. Las fracciones en estudio se disolvieron primero en la cantidad correspondiente de etanol 96 %, con agregado posterior de agua hasta que la solución alcanzó la concentración indicada.

FIGURA 19



Espectros de absorción ultravioleta de las fracciones activas aisladas en D-27 c y d. (Figuras 14 y 15).-

Los espectros de absorción obtenidos entre 260 y 290 mμ, para las fracciones I , II y III , fueron cualitativamente similares a los obtenidos para la tirosina en la misma zona; se presentan en la Figura 19.

En todos los casos el máximo se encontró en 275 mμ y este valor se utilizó para determinar el peso molecular mínimo de cada fracción.

Los resultados se dan en la Tabla 7.

T A B L A 7

EXTINCION A 275 mμ

El peso molecular mínimo se calculó como la masa de péptido que contiene un residuo de tirosina.
La concentración se expresa en mg/ml.-

	CONCENTRACION	EXTINCION	PESO MOLECULAR MINIMO
Tirosina	0.040	0.350	
Fracción I	0.547	0.780	1118
Fracción II	0.350	0.620	1392
Fracción III	0.408	0.400	1063

C A P I T U L O VI

ESTUDIO BIOLOGICO
DE LAS FRACCIONES ACTIVAS

Fué estudiada la actividad antibiótica de las fracciones activas obtenidas, sobre un grupo de bacterias y hongos.

Para la medición de la actividad antibacteriana se empleó un método de dilución seriada en medio líquido (Grove y Randall, 1955).

Un método similar, pero en medio semisólido (agar Sabouraud-glucosa), fué utilizado en el caso de levaduras y hongos.

Alícuotas de la solución del material activo en ensayo, preparada como se describió en el Capítulo III, 1.-, se incorporan a porciones de 2 ml de medio, previamente fundido en el caso de medio agarizado, que se inoculan de manera uniforme con el microorganismo de prueba. En el caso de hongos y levaduras, el medio con el antibiótico se deja solidificar en pico de flauta y se siembra con pequeñas cantidades de inóculo. Las temperaturas y tiempos de incubación dependen del organismo ensayado.

Los resultados se presentan en la Tabla 8, donde se consignan las concentraciones mínimas de inhibición para aquellos microorganismos que demostraron comportarse de una manera diferencial. Además del conjunto de cepas que allí figura, se estudió la actividad sobre: Micrococcus pyogenes var. aureus ATCC 6538, Escherichia coli 55-B5-3844, Corynebacterium diphteriae P.W. 8, B.subtilis ATCC 6633, Klebsiella pneumoniae 10033, Trichophyton mentagrophytes, Saccharomyces cereviceae, Candida albicans y Aspergillus niger. Todos estos microorganismos no fueron inhibidos dentro de las concentraciones ensa-

yadas.

T A B L A 8

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS

La concentración mínima de inhibición se expresa en mg/ml.-

MICROORGANISMO	CONCENTRACION MINIMA DE INHIBICION		
	Fracción I	Fracción II	Fracción III
C.diphteriae C-12-6	0.032	>0.032	>0.032
T.tonsurans	0.016	0.032	0.008
T.rubrum	>0.032	0.032	>0.032
P.chrysogenum	>0.032	0.004	>0.032
Botrytis cinerea	>0.040	0.040	>0.032
Alternaria solani	0.040	>0.040	0.040
Rhizoctonia solani	>0.040	0.040	>0.040
Mucor racemosus	>0.040	0.040	>0.040
N.crassa 73 a	0.006	0.006	0.025

C A P I T U L O VII

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La purificación de un preparado funguistático producido por una cepa de Bacillus subtilis, condujo al aislamiento de tres péptidos similares en varias de sus propiedades químicas, pero con diferente actividad antibiótica.

La cepa utilizada proviene de la productora de bacilomicina A, que por cultivos sucesivos en un medio peptonado aumenta su capacidad productora de antibiótico.

Las características de ese material, y el análisis de una serie de experimentos preliminares, resultaron en la elección de los métodos de distribución en contracorriente para realizar su purificación.

Por cromatografía sobre papel de los productos de hidrólisis ácida total de los tres péptidos así obtenidos, se identificaron en todos los casos los mismos aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, serina y tirosina. El análisis cuantitativo demostró que en los tres péptidos la relación molar entre los aminoácidos era la misma: 3:1:1:1:1 , en el orden arriba indicado. Las recuperaciones obtenidas fueron del 80 al 92 % del peso; lo exiguo del material disponible y su no absoluta pureza, no permitieron mejorarlas. Esto deja abierta la posibilidad de que existan en las moléculas de estos péptidos, otros fragmentos no detectados en este estudio.

No se observaron entre estos péptidos, diferencias en lo que respecta al grado de bloqueo por grupos amida de los carboxilos no comprometidos en uniones peptídicas. Se halló prácticamente la misma cantidad de nitrógeno amídico por unidad de masa.

Las medidas de la extinción á 275 mμ, permitieron calcular los pesos moleculares correspondientes a un residuo de tirosina por mol de péptido. Estos valores, y los obtenidos a partir de la medición del nitrógeno amídico, concordaron con los que pueden deducirse de la composición en aminoácidos. Para las tres fracciones, los pesos moleculares resultaron ser algo superiores á 1000.

La ausencia de derivados N-dinitrofenil sustituídos en el producto de reacción con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB), indica que ninguno de los tres péptidos posee grupos amino libres; esto coincide con la imposibilidad de revelarlos sobre papel con ninhidrina. La disminución de la intensidad de la mancha de tirosina en los cromatogramas de los hidrolizados de dichos productos de reacción con FDNB, sugiere la formación de un derivado O-sustituído de la tirosina.

Los espectros antibióticos de los tres péptidos, demostraron ser significativamente diferentes. Es interesante destacar que la fracción III , menos activa sobre la mayoría de los microorganismos probados, inhibió al Trichophyton tonsurans a menor concentración que las otras dos fracciones. La fracción II resultó particularmente activa sobre Penicillium chrysogenum, y la I inhibió el desarrollo de una cepa de Corynebacterium diphteriae.

Determinaciones realizadas con otras fracciones purificadas, aisladas en los estudios preliminares, indican la existencia de alguna correlación entre el poder hemolítico y la actividad antibiótica, en el sentido de que un aumento de ésta, es acompañado por un incremento de aquél.

Con excepción de los valores del coeficiente de partición, ningún otro de los criterios experimentales utilizados en este trabajo permitió establecer alguna distinción entre las propiedades químicas de los tres péptidos, que pudiera servir de base para explicar su diferente actividad biológica. Estas observaciones sugieren que esas

diferencias pueden residir en la estructura.

Si bien los resultados del análisis cuantitativo de aminoácidos, la ausencia de residuo N-terminal y los valores concordantes hallados para el peso molecular, son consistentes con adjudicar a los materiales estudiados un grado de pureza razonablemente elevado, es necesario indicar que ellos no se comportaron como estrictamente puros en las distribuciones que condujeron a su aislamiento. Ello, al mismo tiempo que reproduce una situación muy frecuente en la resolución de péptidos antibióticos de origen bacteriano, demuestra hasta qué punto llegan las exigencias que deben satisfacer los métodos de fraccionamiento, para alcanzar el adecuado poder resolutivo.

Todos los datos obtenidos coinciden en ubicar estos antibióticos dentro del grupo de las bacilomicinas, con las que concuerdan en las propiedades físicas, químicas y biológicas estudiadas.-

---

C A P I T U L O VIII

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, E.P. & FLOREY, H.W. (1949).
En Antibiotics, vol. I, págs. 421 y 422. Florey, H.W., Chain, E. B., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. & Florey, M.E.. Londres: Oxford University Press.

ABRAHAM, E.P., HEATLEY, N.G., BROOKES, P., FULLER, A.T. & WALKER, J. (1956).
Nature, 178, 44.

ABRAHAM, E.P. & NEWTON, G.G.F. (1958).
Ciba Found. Symp. on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, 1958, 205.

AINSWORTH, G.C., BROWN, A.M. & BROWNLEE, G. (1947).
Nature, 160, 263.

ALDERTON, G. & FEVOLD, H.L. (1951).
J. Am. chem. Soc. 73, 463.

ALDERTON, G. & SNELL, N.S. (1959).
J. Am. chem. Soc. 81, 701.

ARCHIBALD, R.M. (1944).
J. biol. Chem. 154, 643.

ARRIAGADA, A., FLOREY, H.W., JENNINGS, M.A. & WALLMARK, I.G. (1949 a).
Brit. J. exp. Path. 30, 458.

ARRIAGADA, A., SAVAGE, M.C., ABRAHAM, E.P., HEATLEY, N.G. & SHARP, A. E. (1949 b).
Brit. J. exp. Path. 30, 425.

BABAD, J., PINSKY, A., TURNER-GRAFF, R. & SHARON, N. (1952).
Nature, 170, 618.

BABAD, J., TURNER-GRAFF, R., PINSKY, A. & SHARON, N. (1960).
Ktavim, 10, 33. Citado en Chem. Abstr. 54, 7041 (1960).

BARNES, E.M. (1948).
En Antibiotics, vol. II, pág. 1540. Florey, H.W., Chain, E.B., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. & Florey, M.E. (1949). Londres: Oxford University Press.

BARNES, E.M. & NEWTON, G.G.F. (1953).
Antibiot. & Chemother. 3, 866.

BARRY, G.T., GREGORY, J.D. & CRAIG, L.C. (1948).
J. biol. Chem. 175, 485.

BASFORD, R.E. & HUENNEKENS, F.M. (1955).
J. Am. chem. Soc. 77, 3878.

BATTERSBY, A.R. & CRAIG, L.C. (1951).
J. Am. chem. Soc. 73, 1887.

BATTERSBY, A.R. & CRAIG, L.C. (1952 a).
J. Am. chem. Soc. 74, 4019.

BATTERSBY, A.R. & CRAIG, L.C. (1952 b).
J. Am. chem. Soc. 74, 4023.

BAVIN, E.M., BEACH, A.S., FALCONER, R. & FRIEDMANN, R. (1952).
Lancet, I, 127.

BEADLE, G.W. & TATUM, E.L. (1945).
Am. J. Botany, 32, 678.

BENEDICT, R.G. & LANGLYKKE, A.F. (1947).
J. Bact. 54, 24.

BERNLOHR, R.W. & NOVELLI, G.D. (1960).
Biochim. biophys. Acta, 41, 541.

BERNLOHR, R.W. & SIEVERT, C. (1962).
Biochem. biophys. Res. Commun. 9, 32.

BERRIDGE, N.J. (1952).
Nature, 169, 707.

BERRIDGE, N.J., NEWTON, G.G.F. & ABRAHAM, E.P. (1952).
Biochem. J. 52, 529.

BHATE, D.S. (1955).
Nature, 175, 816.

BICHOWSKY-SLOMNICKI, L., BERGER, A., KURTZ, J. & KATCHALSKI, E. (1956).
Arch. Biochem. Biophys. 65, 400.

BICKEL, H. (1961).
Arch. Hyg. u. Bakteriol. 145, 475. Citado en Chem. Abstr. (1962) 56, 5191.

BISERTE, G. & DAUTREVAUX, M. (1956).
C.R. Acad. Sci., Paris, 242, 1801.

BISERTE, G. & DAUTREVAUX, M. (1957).
C.R. Soc. Biol. 151, 1888.

BISERTE, G. & DAUTREVAUX, M. (1957).
Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 39, 795.

BOROWSKI, E. (1953).
Przemisł Chem. 9, 503. Citado en Chem. Abstr. (1957) 51, 3092.

BOROWSKI, E. (1957)
Bull. Inst. Marine Med. Gdańsk, Polonia, 8, 205. Citado en Chem. Abstr. (1958) 52, 5749.

BOROWSKI, E. & K-BOROWSKA, Z. (1957).
Bull. Inst. Marine Med. Gdańsk, Polonia, 8, 69. Citado en Chem. Abstr. (1958) 52, 660.

BOROWSKI, E. & KONOPA, J. (1957).
Bull. Inst. Marine Med. Gdańsk, Polonia, 8, 215. Citado en Chem. Abstr. (1958) 52, 5510.

BOROWSKI, E., KRYNSKI, S., K-BOROWSKA, Z. & WASIELEWSKA, D. (1956).
Bull. State Inst. Marine and Trop. Med., Gdańsk, Polonia, 7, 119. Citado en Chem. Abstr. (1957) 51, 543.

BROOKES, P., FULLER, A.T. & WALKER, J. (1957).
J. chem. Soc., p.689.

BROWNLEE, G. (1949).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 875.

BROWNLEE, G. & BUSHBY, S.R.M. (1948).
Lancet, I, 127.

BROWNLEE, G., BUSHBY, S.R.M. & SHORT, E.J. (1952).
J. Pharmacol. 7, 170.

BROWNLEE, G. & JONES, T.S.G. (1948).
Biochem. J. 43, xxv.

BU'LOCK, J.D. (1961).
Advances in Applied Microbiology, 3, 293.

BURACHIK, M., CERCOS, A.P. & EILBERG, B.L. (1959).
Rev. Inv. Agríc. 13, 225.

CALLOW, R.K., GLOVER, R.E. & HART, P.D'A. (1947).
Biochem. J. 41, xxvii.

CALLOW, R.K., GLOVER, R.E., HART, P.D'A. & HILLS, G.M. (1947).
Brit. J. exp. Path. 28, 418.

CALLOW, R.K. & HART, P.D'A. (1946).
Nature, 157, 334.

CALLOW, R.K. & WORK, T.S. (1952).
Biochem. J. 51, 558.

CARTWRIGHT, N.J. (1955).
Biochem. J. 60, 238.

CARTWRIGHT, N.J. (1957).
Biochem. J. 67, 663.

CARVAJAL, F. (1952).
Bact. Proc., p. 25.

CARVAJAL, F. (1953).
Antibiot. & Chemother. 3, 765.

CASAS-CAMPILLO, C. (1951).
Ciencia, 11, 21.

CERCOS, A.P. (1950).
Rev. Inv. Agríc. 4, 325.

CERCOS, A.P. (1951 a).
Ciencia e Investigación, 7, 47.

CERCOS, A.P. (1951 b).
Rev. Arg. Agr. 18, 33.

CERCOS, A.P. (1954).
An. Soc. Científ. Argentina, 157, 38.

CERCOS, A.P. & CASTRONOVO, A. (1951).
An. Soc. Científ. Argentina, 152, 68.

CHEESEMAN, G.C. & BERRIDGE, N.J. (1957).
Biochem. J. 65, 603.

CHEESEMAN, G.C. & BERRIDGE, N.J. (1959).
Biochem. J. 71, 185.

CONSDEN, R., GORDON, A.H., MARTIN, A.J.P. & SYNGE, R.L.M. (1947).
Biochem. J. 41, 596.

CONWAY, E.J. (1957).
Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 4a. ed. Londres: Crosby Lockwood and Son Ltd.

CRAIG, L.C. & CRAIG, D. (1956).
En Technique of Organic Chemistry, 2a. ed., vol. III, parte 1, capítulo II, p. 149. Ed. por A.Weissberger. Nueva York: Interscience Publ., Inc.

CRAIG, L.C., GREGORY, J.D. & BARRY, G.T. (1949 a).
J. clin. Invest. 28, 1014.

CRAIG, L.C., GREGORY, J.D. & BARRY, G.T. (1949 b).
Cold Spr. Harb. Sym. quant. Biol. 14, 24.

CRAIG, L.C. & KING, T.P. (1955).
J.Am. chem. Soc. 77, 6620.

CRAIG, L.C., KING, T.P. & KONIGSBERG, W. (1960).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 88, 571.

CRAIG, L.C., KONIGSBERG, W. & HILL, R.J. (1958).
En Ciba Foundation Symp. on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, p. 226. Londres: J. and A.Churchill, Ltd.

CRAIG, L.C., WEISIGER, J.R., HAUSMANN, W. & HARFENIST, E.J. (1952).
J. biol. Chem. 199, 259.

CUMMINS, C.S. & HARRIS, H. (1956).
J. gen. Microbiol. 14, 583.

CUMMINS, C.S. & HARRIS, H. (1958).
J. gen. Microbiol. 18, 173.

DACIE, J.V. (1954).
Citado en Fotocolorimetría Clínica, p. 451. Ióvine, E., Gaya Noya, E.R. y Villa, J.C. (1959). Buenos Aires: Ed. Universitaria.

DAUTREVAUX, M. & BISERTE, G. (1956).
C.R. Acad. Sci., Paris, 243, 923.

DAUTREVAUX, M. & BISERTE, G. (1961).
Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 43, 495.

DELCAMBE, L. (1957).
Comunicación personal.

DELCAMBE, L. (1961).
Vth. Intern. Congr. Biochem., Moscú, Abstr. Communs., sección 7, 157.

DELCAMBE, L. & DEVIGNAT, R. (1957).
Classe des Sciences Naturelles et Médicales, Acad. roy. Sci. colon. 6, fasc. 4.

DIMICK, K.P., ALDERTON, G., LEWIS, J.C., LIGHTBODY, H.D. & FEVOLD, H. L. (1947).
Arch. Biochem. 15, 1.

DOS SANTOS, M.S. (1953).
Bol. escola farm., Univ. Coimbra, 13-14, 22. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 7312.

DOWLING, J.H., KOFFLER, H., REITZ, H.C., PETERSON, D.H. & TRETAULT, P.A. (1952).
Science, 116, 147.

DUBOS, R.J. (1939).
J. exp. Med. 70, 1.

DVONCH, W. & BENEDICT, R.G. (1953).
Antibiot. & Chemother. 3, 192.

EDMAN, P. (1959).
Annu. Rev. Biochem. 28, 81.

ELLIOTT, D.F., LEWIS, G.P. & HORTON, E.W. (1960).
Biochem. biophys. Res. Commun. 3, 87.

ERLANGER, B.F. & GOODE, L. (1954).
Nature, 174, 840.

ERLANGER, B.F. & GOODE, L. (1960).
Science, 131, 669.

ERLANGER, B.F., SACHS, H. & BRAND, E. (1954).
J. Am. chem. Soc. 76, 1806.

FAVRET, E.A. (1952).
Publicación N° 136 del Inst. de Fitotecnia, Castelar, R. Argentina.

FEVOLD, H.L., DIMICK, K.P. & KLOSE, A.A. (1948).
Arch. Biochem. 18, 27.

FLOREY, H.W. (1949).
En Antibiotics, vol. I, págs. 3 y sig. Florey, H.W., Chain, E.B., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. y Florey, M.E.. Londres: Oxford University Press.

FORNI, P.V. & CAVALLI, F. (1958).
Minerva med., p. 4545. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 7306.

FORSYTH, W.G.C. (1955).
Biochem. J. 59, 500.

FREGNAN, G.F. & SMITH, D.W. (1962).
J. Bact. 83, 1069.

FREYSCHUSS, S.K.L., PEHRSON, S.O. & STEENBERG, K.B. (1955).
Antibiot. & Chemother. 5, 218.

FREYSCHUSS, S.K.L., PEHRSON, S.O. & STEENBERG, K.B. (1958).
Patente (Suecia) 164.932. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 7499.

FUKUDA, K. & BANI, K. (1961).
Kanazawa Daigaku Yakugakubu Kenkyu Nempo, 11, 33. Citado en Chem. Abstr. (1962) 56, 10265.

FUKUMOTO, J., SATOMURA, Y., HASHIMOTO, K., IWAI, S. & TANIGUCHI, Y. (1961).
Patente (Japón) 1149 ('61). Citado en Chem. Abstr. (1961) 55, 21474.

FULLER, A.T. (1955).
Nature, 175, 722.

FULLER, A.T. & HORTON, J.M. (1950).
J. gen. Microbiol. 4, 417.

GARIBALDI, J.A. & FEENEY, R.E. (1949).
Ind. Eng. Chem. 41, 432.

GAUSE, G.F. (1946).
Science, 104, 289.

GAUSE, G.F. & BRAZHNIKOVA, M.G. (1944).
Lancet, II, 715.

GILLIVER, K. (1949).
Brit. J. exp. Path. 30, 214.

GILLIVER, K., HOLMES, A.M. & ABRAHAM, E.P. (1949).
Brit. J. exp. Path. 30, 209.

GRAF, W. & BICKEL, H. (1961).
Arch. Hyg. u. Bakteriol. 145, 21. Citado en Chem. Abstr. (1961) 55, 15608.

GREGORY, J.D. & CRAIG, L.C. (1948).
J. biol. Chem. 172, 839.

GROUPE, V., PUGH, L.H., WEISS, D. & KOCHI, M. (1951).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 78, 354.

GROVE, D.C. & RANDALL, W.A. (1955).
Assay Methods of Antibiotics. Nueva York: Medical Encyclopedia, Inc.

HARRIS, J.I. & WORK, T.S. (1950).
Biochem. J. 46, 196, 582.

HART, P.D'A. & HILLS, G.M. (1947).
Biochem. J. 41, xxvii.

HASHIMOTO, K. (1960).
Noyaku Seisan Gijutsu, 1, 14. Citado en Chem. Abstr. (1961) 55, 27542.

HASSALL, C.H. (1948).
Nature, 161, 317.

HAUSMANN, W. (1956).
J. Am. chem. Soc. 78, 3663.

HAUSMANN, W. & CRAIG, L.C. (1952).
J. biol. Chem. 198, 405.

HAUSMANN, W. & CRAIG, L.C. (1954).
J. Am. chem. Soc. 76, 4892.

HAUSMANN, W., WEISIGER, J.R. & CRAIG, L.C. (1955).
J. Am. Chem. Soc. 77, 723.

HEATLEY, N.G. & DOERY, H.M. (1951).
Biochem. J. 50, 247.

HEATLEY, N.G. & FLOREY, H.W. (1946).
Brit. J. exp. Path. 27, 378.

HILLS, G.M., BELTON, F.C. & BLATCHLEY, E.D. (1949).
Brit. J. exp. Path. 30, 427.

HIRSCH, A. (1951).
Nature, 167, 1031.

HIRSCHHORN, H.H., BUCCA, M.A. & THAYER, J.D. (1948).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 67, 429.

HOBBY, G.L., REGNA, P.P., DOUGHERTY, N. & STEIG, W.E. (1949).
J. clin. Invest. 28, 927.

HODGKIN, D.C. (1949).
Cold Spr. Harb. Sym. quant. Biol. 14, 65.

HODGKIN, D.C. & OUGHTON, B.M. (1957).
Biochem. J. 65, 752.

HOTCHKISS, R.D. & DUBOS, R.J. (1941).
J. biol. Chem. 141, 155.

HOWELL, S.F. (1950).
J. biol. Chem. 186, 863.

HOWELL, S.F. & TAUBER, H. (1943).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 67, 432.

JAMES, A.T. & SYNGE, R.L.M. (1951).
Biochem. J. 50, 109.

JANSEN, E.F. & HIRSCHMANN, D.J. (1944).
Arch. Biochem. 4, 297.

JOHNSON, B.A., ANKER, H. & MELTNEY, F.L. (1945).
Science, 102, 376.

JOHNSON, E.A. & BURDON, K.L. (1946).
J. Bact. 51, 591.

JONES, T.S.G. (1948).
Biochem. J. 43, xxvi.

JONES, T.S.G. (1949).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 909.

JONES, T.S.G. (1954).
Brit. med. Bull. 10, 226.

KATCHALSKI, E., BERGER, A., BICHOWSKY-SLOMNICKI, L. & KURTZ, J.(1955).
Nature, 176, 118.

KAWAMATA, J. & MOTOHURA, Y. (1954).
J. Antibiot., ser. A, 7, 25. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 11510.

K-BOROWSKA, Z. (1959).
Bull. Inst. Marine Med. Gdańsk, Polonia, 10, 83. Citado en Chem. Abstr. (1960) 54, 2495.

KHOKHLOV, A.S., SILAEV, A.B., STEPANOV, V.M., YULIKOVA, E.P., TROSHKO, E.V., LEVIN, E.D., MAMIOFF, S.M., SINITSYNA, Z.T., CHAN-TSIN CHI, SOLOV'EVA, N.K., IL'INSKAYA, S.A., ROSSOVSKAYA, U.S., DMITRIEVA, V.S., SEMENOV, S.M., VEIS, R.A., BEREZINA, E.K. & RUBTSOVA, L.K. (1960).
Antibiotiki, 5, 3. Citado en Chem. Abstr. (1961) 55, 5653.

KING, T.P. & CRAIG, L.C. (1955 a).
J. Am. chem. Soc. 77, 6624.

KING, T.P. & CRAIG, L.C. (1955 b).
J. Am. chem. Soc. 77, 6627.

KIRUHARA, T. & SUZUKI, K. (1955).
Ann. Report Tohoku Coll. Pharm. 2, 1. Citado en Dautrevaux y Biserte (1961).

KNECHT, A.T. & McCLESKEY, C.S. (1955).
Proc. Lousiana Acad. Sci. 18, 16. Citado en Chem. Abstr. (1956) 50, 14040.

KOFFLER, H. (1959).
Science, 130, 1419.

KOFFLER, H. & KOBAYASHI, T. (1960).
Fed. Proc. 19, 342.

KONIGSBERG, W. & CRAIG, L.C. (1962).
J. org. Chem. 27, 934.

KONIGSBERG, W., HILL, R.J. & CRAIG, L.C. (1961).
J. org. Chem. 26, 3867.

KOYAMA, Y. (1952).
Patente (Japón) 1546 ('52). Citado en Chem. Abstr. (1953) 47, 6097.

KRYNSKI, S., BOROWSKI, E., CHWISTECKA, W., BECLA, E., KONIAR, H. & PREIS, M. (1955).
Acta Polon. Pharm. 12, 85. Citado en Chem.Abstr. (1955) 49, 16061.

LANDY, M., WARREN, G.H., ROSENMAN, S.B. & COLIO, L.G. (1948).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 67, 539.

LEWIS, J.C. & SNELL, N.S. (1951).
J. Am. Chem. Soc. 73, 4812.

LINDERSTROM-LANG, K. & JACOBSEN, C.F. (1941).
J. biol. Chem. 137, 443.

LOCKHART, I.M., ABRAHAM, E.P. & NEWTON, G.G.F. (1955).
Biochem. J. 61, 534.

LOEB, L.J., MOYER, A. & MURRAY, R.G.E. (1950).
Can. J. Research (E) 28, 212. Citado en Annu. Rev. Biochem. (1951) 20, 367.

LUECK, S. (1960).
Kuehn-Arch. 74, 19. Citado en Chem. Abstr. (1962) 56, 1829.

MAGARAO, M.F., ARRIAGADA, V.A. & THALES, S. (1944).
Rev. brasil. Med., p. 556.

MAHBUBUR RAHMAN, A.K.M. & AHMED, K. (1955).
Pakistan J. Sci. Research, 7, 112. Citado en Chem. Abstr. (1956) 50, 2907.

MAJUMDAR, S.K. (1960).
Naturwiss. 47, 39.

MAJUMDAR, S.K. & BOSE, S.K. (1958).
Nature, 181, 134.

MAJUMDAR, S.K. & BOSE, S.K. (1960 a).
Arch. Biochem. Biophys. 90, 154.

MAJUMDAR, S.K. & BOSE, S.K. (1960 b).
Biochem. J. 74, 596.

MATTICK, A.T.R. & HIRSCH, A. (1944).
Nature, 154, 551.

MATTICK, A.T.R. & HIRSCH, A. (1946).
Lancet, I, 417.

MATTICK, A.T.R. & HIRSCH, A. (1947).
Lancet, II, 5.

MAUER, H. (1959).
Klin. Wschr. 37, 158. Citado en Chem. Abstr. (1960) 54, 4761.

McLEOD, C. (1948).
J. Bact. 56, 749.

MELENEY, F.L. & JOHNSON, B.A. (1949).
Amer. J. Med. 7, 794.

MICHENER, H.D. & SNELL, N. (1949)
Arch. Biochem. 22, 208.

MIJOVIC, M.P.V. & WALKER, J. (1960).
J. chem. Soc., p. 909.

MIJOVIC, M.P.V. & WALKER, J. (1961).
J. chem. Soc., p. 3381.

MILLER, J. & ROWLEY, D. (1948).
Brit. J. exp. Path. 29, 452.

MINOURA, K. (1959).
Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi, 8, 359. Citado en Chem. Abstr. (1961) 55, 1804.

MISTRETTA, A.G. (1956).
Antibiot. & Chemother. 6, 196.

MOORE, S., SPACKMAN, D.H. & STEIN, W.H. (1958).
Analyt. Chem. 30, 1185.

MOTOMURA, Y. (1955).
J. Antibiot., ser. B, 8, 391. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 18171.

MOTOMURA, Y. (1956).
J. Antibiot., ser. B, 9, 9. Citado en Chem. Abstr. (1960) 54, 1337.

MURRAY, R.G.E. & LOEB, L.J. (1950).
Can. J. Research (E) 28, 177. Citado en Annu. Rev. Biochem. (1951) 20, 367.

MURRAY, F.J. & TETRAULT, P.A. (1948).
Proc. Soc. Amer. Bact. 1, 20.

MURRAY, F.J., TETRAULT, P.A., KAUFMANN, O.W., KOFFLER, H., PETERSON, D.H. & COLINGSWORTH, D.R. (1949).
J. Bact. 57, 305.

NANDI, P. & SEN, G.P. (1953).
Nature, 172, 871.

NASH, H.A. & SMASHEY, A.R. (1951).
Arch. Biochem. 30, 237.

NEWTON, G.G.F. (1949).
Brit. J. exp. Path. 30, 306.

NEWTON, G.G.F. & ABRAHAM, E.P. (1950).
Biochem. J. 47, 257.

ODA, T., KINOSHITA, M., YAMANAKA, O. & UEDA, F. (1954).
J. pharm. Soc. Japan, 74, 1243. Citado en Chem. Abstr. (1955) 49, 4785.

OHNO, T., TAJIMA, S. & TOKI, K. (1953).
J. agric. chem. Soc. Japan, 27, 665. Citado en Chem. Abstr. (1955) 49, 3012.

OKUDA, K. (1959).
Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi, 8, 1443. Citado en Chem. Abstr. (1961) 55, 1803.

OKUDA, K., LIN, C. & WINNICK, T. (1962).
Nature, 195, 1067.

OTANI, S., NAGANO, H. & SAITO, Y. (1958).
Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi, 7, 640. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 12403.

OTANI, S. & SAITO, Y. (1954).
Proc. Japan. Acad. 30, 991. Citado en Chem. Abstr. (1955) 49, 13362.

PALADINI, A.C. & CRAIG, L.C. (1954).
J. Am. chem. Soc. 76, 688.

PORATH, J. (1954).
Acta chem. scand. 8, 1813.

POWELL, J.F. & STRANGE, R.E. (1957).
Biochem. J. 67, 700.

RAMON, G., RICHOU, R. & RAMON, J. (1945).
Bull. Acad. Méd. 129, 277.

RAUBITSCHEK, F. & DOSTROVSKY, A. (1950).
Dermatologica, 100, 45.

REGNA, P.P., CARBONI, R.A. & STEIG, W.E. (1950).
Am. Chem. Soc. Meeting in Miniature, N.York. Citado en Annu. Rev. Biochem. (1951) 20, 367.

REGNA, P.P., SOLOMONS, I.A., FORSCHER, B.K. & TIMBRECK, A.E. (1949).
J. clin, Invest. 28, 1022.

ROSEN, H. (1957).
Arch. Biochem. Biophys. 67, 10.

SACKS, L.E. & PENCE, J.W. (1957).
Analyt. Chem. 29, 1802.

SAITO, Y. (1958).
Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi, 7, 499, 503. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 1440.

SANGER, F. (1945).
Biochem. J. 39, 507.

SANGER, F. (1946).
Biochem. J. 40, 261.

SANGER, F. & THOMPSON, F. (1953).
Biochem. J. 53, 353.

SARRAILLET, J.M. (1954).
Rev. Asoc. Bioquím. Arg. 19, 182.

SCHALLER, A. (1960).
Fruchtsaft. Ind. 5, 3. Citado en Chem. Abstr. (1960) 54, 7911.

SCHMIDT, G.M., HODGKIN, D.C. & OUGHTON, B.M. (1957).
Biochem. J. 65, 744.

SCHWYZER, R. & SIEBER, P. (1957).
Helv. chim. acta, 40, 624.

SCHWYZER, R. & SIEBER, P. (1958).
Helv. chim. acta, 41, 1582.

SHARON, N., PINSKY, A., TURNER-GRAFF, R., BABAD, J. & CERCOS, A.P. (1954).
Nature, 174, 1190.

SHARP, A.E., ARRIAGADA, A., NEWTON, G.G.F. & ABRAHAM, E.P. (1949).
Brit, J. exp. Path. 30, 444.

SHEPHERD, R.G., STANSLY, P.G., WINTERBOTTOM, R., ENGLISH, J.P., FELLOWS, C.E., ANANENKO, N.H. & GUILLET, G.L. (1948).
J. Am. chem. Soc. 70, 3771.

SHIBAZAKI, I. & TERUI, G. (1953).
J. ferment. technol. 21, 339. Citado en Chem. Abstr. (1954) 48, 2832.

SILAEV, A.B., STEPANOV, V.M. & KOZLOV, L.V. (1961).
Zh. Obshch. Khim. 31, 2716. Citado en Chem. Abstr. (1962) 56, 13005.

SILAEV, A.B., STEPANOV, V.M., YULIKOVA, E.P. & MURATOVA, G.L. (1961).
Zh. Obshch. Khim. 31, 2712. Citado en Chem. Abstr. (1962) 56, 13005.

SMRT, J., BERANEK, J., SICHER, J., SKODA, J., HESS, V.F. & SORM, F. (1957).
Experientia, 12, 291.

SPECK, J.F. (1949).
J. biol. Chem. 179, 1387.

STANSLY, P.G. (1949).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 855.

STANSLY, P.G. & BROWNLEE, G. (1949).
Nature, 163, 611.

STANSLY, P.G. & SCHLOSSER, M.E. (1947).
J. Bact. 54, 549.

STANSLY, P.G., SHEPHERD, R.G. & WHITE, H.J. (1947).
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81, 43.

STESSEL, G.J., LEBEN, C. & KEITT, G.M. (1952).
Phytopathology, 42, 20.

STESSEL, G.J., LEBEN, C. & KEITT, G.M. (1953).
Phytopathology, 43, 23.

STOFFEL, W. & CRAIG, L.C. (1961).
J. Am. chem. Soc. 83, 145.

STRACHER, A. & CRAIG, L.C. (1959).
J. Am. chem. Soc. 81, 696.

SU, T.L. (1948).
Brit. J. exp. Path. 29, 466, 473.

SWIFT, P.N. & BUSHBY, S.R.M. (1953).
Lancet, I, 110.

SYNGE, R.L.M. & TISELIUS, A. (1947).
Acta chem. scand. 1, 749.

TINT, E. & REISS, W. (1951).
J. biol. Chem. 190, 133.

TOKI, K. & OHNO, T. (1955).
Nippon Nogei-Kagaku Kaishi, 29, 370. Citado en Chem. Abstr. (1959) 53, 243.

TURNER, R.A. (1956).
Arch. Biochem. Biophys. 60, 364.

VANKOWA, J. (1957).
Folia Biol. (Praga) 3, 175. Citado en Chem. Abstr. (1957) 51, 16988.

VAN VUUREN, P.J., JOUBERT, F.J. & SERFONTEIN, W.J. (1961).
Arch. Biochem. Biophys. 95, 251.

VINCENT, J.G., VEOMETT, R.C. & RILEY, R.F. (1959).
J. Bact. 78, 477.

VOGLER, K. & LANZ, P. (1960).
Helv.chim. acta, 43, 270.

VOGLER, K., LANZ, P. & LERGIER, W. (1959).
Experientia, 15, 334.

WAISVISZ, J.M., van der HOEVEN, M.G., van PEPPEN, J. & ZWENNIS, W.C. M. (1957).
J. Am. chem. Soc. 79, 4520.

WAISVISZ, J.M., van der HOEVEN, M.G. & te NIJENHUIS, B. (1957).
J. Am. chem. Soc. 79, 4524.

WALTON, R.B. & WOODRUFF, H.B. (1949).
J. clin. Invest. 28, 924.

WARNER, D.T. (1961).
Nature, 190, 120.

WHITE, H.J., ALVERSON, C.M., BAKER, M.J. & JACKSON, E.R. (1949).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 879.

WHITEHEAD, H.R. (1933).
Biochem. J. 27, 1793.

WHITEHEAD, H.R. & RIDDET, W. (1933).
N. Z. J. Agric. 46, 225. Citado en Nature, 154, 551 (1944).

WILKINSON, S. (1963).
Lancet, I, 922.

YUKAWA, T. (1957).
Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi, 6, 285. Citado en Chem. Abstr. (1957) 51, 16966.