

AISLAMIENTO DE UN COMPUESTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR UNA CEPA DE *STREPTOMYCES RESISTOMICIFICUS*

M.E. Pérez, R. Sánchez, Y. Caraballo*, R. Rodríguez** y C. Vallín.

Centro de Química Farmacéutica, Calle 21 y Avenida 200, Atabey, Playa, *Facultad de Biología, Calle 25 e I, Vedado, Plaza de la Revolución, **Facultad de Química, Calzada de Zapata y Calle G, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 1ro de septiembre de 1996.

RESUMEN. Actualmente la búsqueda de nuevos antibióticos se ha convertido en una tarea de primer orden debido a que existen muchos microorganismos que se han hecho resistentes a los antibióticos ya introducidos. Este trabajo tuvo como objetivo el aislamiento de un nuevo compuesto antimicrobiano producido por la cepa *Streptomyces resistomicificus* SQF-40. Para ello, se utilizaron técnicas convencionales de intercambio iónico, partición y exclusión molecular. La pureza del compuesto en cada etapa fue analizada en un sistema HPLC-UV con arreglo de diodo. Mediante ensayos químicos y microbiológicos se determinó que el metabolito activo pertenece a la familia de las estreptotricinas. Se logró obtener el compuesto con un grado de pureza de 37 veces y un rendimiento de un 21 %.

ABSTRACT. Searching new antibiotics has become a priority task due to the emergency of microorganisms resistant to the antibiotics used in clinics. The principal objective of this study is the isolation of a new antimicrobial compound produced by *Streptomyces resistomicificus* SQF-40 strain. For this purpose conventional chromatographies were used: ionic interchange, partition and molecular exclusion. The purity of this compound in each step was analyzed with and HPLC-UV system with photodiode array detector. Based on microbiological and chemical assays it was determined that SQF-40 belong to the streptothricin family. The compound was obtained with a degree of purity of 37 times and 21 % of yield.

INTRODUCCION

El motivo fundamental de la búsqueda de nuevos antibióticos, está en la necesidad de combatir enfermedades infecciosas en el hombre y en los animales, provocadas por microorganismos que se han hecho resistentes a los antibióticos actualmente disponibles.¹

Entre otras razones que impulsan a esta búsqueda se tiene: la necesidad de encontrar compuestos antitumorales, antivirales, con propiedades inmunomoduladoras, con actividad frente a infecciones de plantas, así como antibióticos que sirvan de instrumento a la investigación científica básica.²

El grupo de los aminoglucósidos constituye la mayor clase de agentes terapéuticos a partir del descubrimiento de la estreptomina en 1944, en el que se encuentran presentes más de 200 compuestos naturales con amplio espectro y una gran toxicidad.³

Recientemente, se han aislado nuevos antibióticos aminoglucósidos^{4,5} a partir de microorganismos, mientras que otros han sido obtenidos mediante modificaciones químicas de los antibióticos ya existentes.

La búsqueda de nuevos miembros de esta familia esta basada fundamentalmente en el desarrollo de antibióticos aminoglucósidos no tóxicos que logren vencer los mecanismos de resistencia en bacterias patógenas.

Como resultado de un programa desarrollado en el Departamento de Biotecnología del Centro de Química Farmacéutica para la búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana, se aisló un cepa de *Streptomyces* sp. productora de un compuesto con actividad antibiótica de amplio espectro (F20), la cual fue identificada como *Streptomyces resistomicificus*.⁶

El objetivo de este trabajo fue establecer un procedimiento para el aislamiento del metabolito biológicamente activo F-20, producido por una cepa de *Streptomyces resistomicificus* F-20, para su futura caracterización estructural.

MATERIALES Y METODOS

Un caldo de cultivo de 30L de *Streptomyces resistomicificus* fue centrifugado a 9000 r/min, durante 15 min a 10 °C. Se desechó el micelio y el sobrenadante fue ultrafiltrado (Sartorius) con una membrana de triacetato de celulosa de (160 X160) mm.

Cromatografía de intercambio catiónico

Fueron fijados 5L del sobrenadante en una resina de IRC-50 (Serva). Después del lavado exhaustivo con H₂O de silitada el metabolito fue desprendido con ácido acético glacial (Merck) 8,3 mol/L. A las fracciones colectadas, se les determinó la actividad microbiológica, con el empleo del microorganismo de prueba⁷ el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (metodología seguida después de cada etapa) y las fracciones activas fueron concentradas hasta 1L.

Cromatografía de intercambio aniónico

Se utilizó la resina IRA-45 (Merck) (OH⁻) y el proceso se llevó a cabo en lotes.

Cromatografía de intercambio iónico

La fijación de 100mL de muestra de la etapa anterior fue realizada en CM-Sephadex C-25 (Na⁺) (Pharmacia). El producto fue desorbido de la matriz con NaCl (0,4 mol/L). Las fracciones activas se concentraron a sequedad y al precipitado formado se le realizaron tres extracciones con volúmenes equivalentes de la mezcla metanol-cloroformo (90:10).

Cromatografía de partición

Se aplicaron 10 mL de la muestra obtenida en la etapa anterior en Sephadex LH-20 y la elución se llevó a cabo con una mezcla de metanol-cloroformo (90:10), con la cual fue hinchado el Sephadex. Las fracciones que dieron positivas fueron concentradas hasta sequedad y disueltas en 4 mL de H₂O.

Cromatografía de exclusión molecular

Los 4 mL de muestra (1,5 % del volumen de lecho) fueron aplicados en el Sephadex G-15 (Pharmacia). La elución del compuesto se realizó con H₂O destilada y las fracciones activas fueron liofilizadas.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Después de cada etapa de purificación, se empleó el sistema HPLC como control cualitativo del grado de homogeneidad de las muestras. El sistema estuvo constituido por una bomba L-7100 LaChrom (Merck-Hitachi), un detector UV con arreglo de diodo (DAD) (Merck), con sistema de adquisición de datos D6. La columna empleada fue LiCrospher 60 RP-select B (125X4) mm y con un tamaño de partícula de 5 µm.

La fase móvil se preparó con 10 mmol/L de Na₂HPO₄, 15 mmol/L de trietilamina y el pH = 3,5, ajustado con ácido fosfórico.

Con cada inyección se aplicó un volumen de muestra de 20 µL, con un flujo de corrida de 0,5 mL/min. El espectro de longitud de onda de trabajo fue de 200 a 360 nm. La sensibilidad del detector empleado fue de 0,000 1 unidades de absorbancia.

Cálculo de las variables de control de la purificación

El cálculo de las variables: actividad específica (UI/mg), rendimiento (%) y grado de pureza (veces) se realizó a partir de los valores de actividad antimicrobiana (mm) y masa total (mg) en cada etapa de purificación.⁵

Teniendo en cuenta la relación exponencial que existe entre la masa del antibiótico aplicado en la placa y la actividad antimicrobiana (diámetro del halo de inhibición: D) para cada etapa de purificación, se realizó una curva, masa obtenida del producto en cada etapa en función de la actividad, la cual se transformó en una recta después de aplicar el logaritmo neperiano a la masa y a esta última, se le hizo un análisis de regresión para determinar la ecuación de la recta y realizar los análisis del error estándar y de residuos. Como valor de la AE se tomó:

$$\lim_{D \rightarrow 0} = \left(\frac{1}{\tan} \right) = \frac{1}{b \exp(c)}$$

donde:

- b tangente de la regresión
- c intercepto.

Ensayos químicos

Determinación de la presencia de enlaces peptídicos.

El método del Biuret⁸ fue utilizado para detectar los enlaces peptídicos en la estructura del antibiótico.

Determinación de grupos aminos. El ensayo de la ninhidrina⁹ se empleó para detectar los grupos aminos que pudieran estar presentes en la muestra.

Determinación de la glucosamina. (Ensayo en solución). A 5 mg de la muestra obtenida en la última etapa, se le realizó una hidrólisis ácida durante 24 h con ácido clorhídrico 6

mol/L y con el hidrolizado neutralizado, se llevó a cabo la reacción de Elson-Morgan.¹⁰

RESULTADOS Y DISCUSION

Cromatografía de intercambio catiónico

Se fijaron 5 L de caldo (1,8 mg/mL) y las fracciones activas obtenidas correspondieron a un volumen de 3 800 mL, el cual fue concentrado hasta un litro (7,6 mg/mL).

El análisis por HPLC de este concentrado reveló que la muestra estaba constituida por una mezcla compleja. En el cromatograma correspondiente esto se reveló por la presencia de tres picos. La razón entre las longitudes de onda (200 y 210 nm) se mantuvo variable (Figuras 1 y 2), lo que confirmó la presencia de contaminantes en la muestra aún en esta etapa.

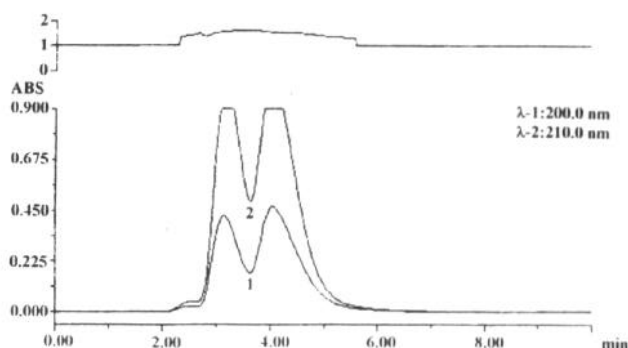


Fig. 1. Cromatograma de las fracciones activas correspondientes a la cromatografía de intercambio catiónico con Amberlite IRC-50.

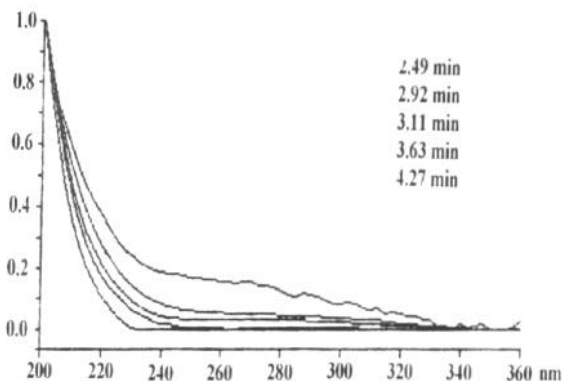


Fig. 2. Espectros obtenidos a diferentes tiempos de retención correspondientes a las fracciones activas de la cromatografía de intercambio catiónico con Amberlite IRC-50.

Cromatografía de intercambio aniónico

Con la resina IRA-45 se logró eliminar gran parte de las sales de acetato de amonio formada y el exceso de ácido acético utilizado en la etapa anterior.

Cromatografía de intercambio iónico

En esta etapa se aplicaron 100 mL (7,6 mg/mL). Se obtuvieron aproximadamente 3 500 mL (14,0 mg/mL) correspondientes a las fracciones activas. El análisis en HPLC con DAD evidenció diferencias sustanciales con respecto a la etapa anterior.

Cromatografía de partición

Se aplicaron 10 mL de muestra (14,0 mg/mL) y se colectó un volumen de 200 mL (13,6 mg/mL) pertenecientes a las fracciones con actividad microbiológicas. En este caso, el pico es más homogéneo, lo que se corroboró al realizar el análisis con HPLC con DAD, ya que se mantuvo la razón invariable en la zona correspondiente al pico de interés. Además, se observó una disminución de los picos encontrados en la etapa anterior.

Cromatografía de exclusión molecular

Se aplicaron 4 mL del producto (13,6 mg/mL). Se colectó un total de 40 mL y se obtuvieron 112 mg del compuesto liofilizado y parcialmente purificado.

El espectrocromatograma tridimensional, del liofilizado, (Fig. 3) mostró un pico con alto grado de homogeneidad en el que se detectó, entre los 200 y los 210 nm, la presencia de una cola correspondiente al segundo pico de la etapa anterior; el cual presentó una intensidad inferior y cuya detección sólo fue posible en el ultravioleta lejano debido a la baja concentración que presentaba el compuesto correspondiente (Fig. 4). Además, el alto valor del coeficiente de correlación (0,997) entre los espectros obtenidos antes y después del máximo del pico, confirmó lo antes expuesto.¹¹ También se observó un alto valor del coeficiente de correlación (0,98) entre los espectros correspondientes a los máximos respectivos obtenidos en el cromatograma tomado a los 200 nm. Este valor elevado sugiere que los picos analizados pudieran corresponder a antibióticos pertenecientes a la misma familia.

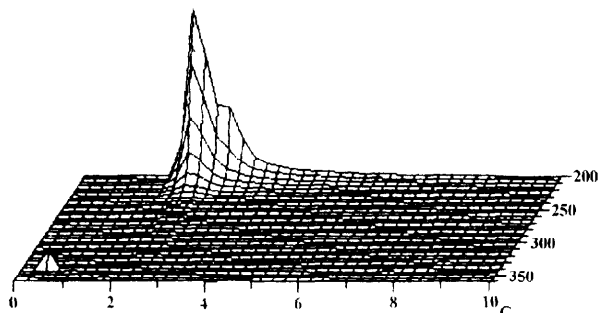


Fig. 3. Espectrocromatograma tridimensional de la muestra liofilizada obtenida en Sephadex G-15.

Cálculo de las variables de control de la purificación

La tabla I muestra los resultados del cálculo de las variables de control correspondientes a la purificación en la primera, cuarta y quinta etapas.

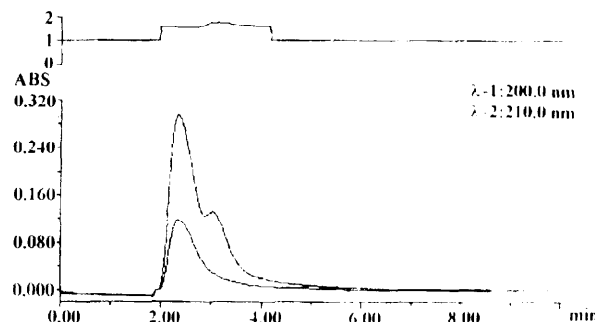


Fig. 4. Cromatograma de la muestra liofilizada obtenida en Sephadex G-15.

Ensayos químicos

Determinación de la presencia de enlaces peptídicos.

La reacción del biuret resultó ligeramente positiva, lo que significa que existe, al menos, un enlace peptídico en la estructura del compuesto.

Determinación de grupos aminos. La reacción de la ninhidrina resultó positiva, por lo que se pudo afirmar que el compuesto presenta, al menos, un grupo amino en la estructura.

Determinación de la glucosamina. Ensayo en solución. La determinación cualitativa de la glucosamina mediante la reacción de Elson-Morgan resultó positiva por tanto, uno de los productos de la hidrólisis es glucosamina.

Nieblas y col. reportaron que el metabolito F-20 presenta un espectro antimicrobiano muy amplio pues inhibe el crecimiento de bacterias (Gram positivas y negativas), micobacterias, hongos y levaduras.²

Según estudios realizados con dicho metabolito acerca de su termoestabilidad a pH = 3, se desprende que existe un aumento en el halo de inhibición para los patrones de antibióticos aminoglucósidos y una disminución para el caldo de producción. En el caso de los patrones, el comportamiento fue el esperado, pues está reportado que los aminoglucósidos se activan después del tratamiento con calor, además, son muy termoestables a pH = 3.

El caldo de producción a pesar de mantener actividad después del tratamiento térmico a pH = 3 (lo cual excluye un gran número de antibióticos), sufre una inactivación parcial, comportamiento característico de los antibióticos del grupo de las estreptomicinas.

Se mantuvo la actividad biológica a pH por encima y por debajo de 7 e incluso, se observó un ligero incremento a pH = 3, lo cual es característico de los antibióticos que pertenecen a los aminoglucósidos y las estreptotricinas.²

TABLA I
Variables de control del proceso de purificación

Etapas	Masa ^T	Actividad específica	Actividad antimicrobiana ^T	Grado de pureza	Rendimiento
	(mg)	(mm/mg)	(10 ⁶ mm)	(veces)	(%)
1ra (Caldo)	195 000	0,030	5,85	—	—
4ta (LH-20)	2 960	0,98	2,9	33	49,0
5ta (G-15)	1 160	1,1	1,2	37	21,8

T Total.

CONCLUSIONES

Se aisló un metabolito biológicamente activo (F-20) de un caldo de cultivo producido por una cepa de *Streptomyces resistomicificus*.

Los resultados correspondientes a los ensayos químicos y microbiológicos sugieren que el antibiótico pertenece a la familia de las estreptomicinas.

BIBLIOGRAFIA

1. Cohen M. L. Epidemiology of drug resistance: Implications for a post antimicrobial era. **Science**, **257**, 1050, 1992.
2. Silver L.L. and Bostian, K. A. Discovery and Development of a new antibiotics: The problems of antibiotics resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **37**, 377, 1993.
3. Klundent Jos A.M. and Vliegenthart J.S. **Antimicrobial Agents and Chemother**, **37**, 927, 1993.
4. Holt T.G. **Molecular Microbiology**, **6**, 8, 969, 1992.
5. Tietze E. **J. Basic. Microbiol.**, **3**, 4, 279, 1990.
6. Niebla A., L. González, I. González, N. Montes y C. Vallín SQF-40, un antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces resistomicificus* **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **25**, **51**, **1994**.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Fourth editn. NCCLS document M2-A4 10(7) 1-28, 1995.
8. Chavéz M. A. Temas de Enzimología. Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Parte II. Cap. 8, 210-213, 1990.
9. Lehniger A. L. Bioquímica, 2da Edición. Cap. 4, 1985.
10. Elson-Morgan Method of Biochemical Analysis. Vol. 6, 296, 1958.
11. Merck. Lichrograph Diode Array Detection System L-4500. Optimun HPLC diode array detection for methode development and routine analysis, 1992.