

Nota preliminar sobre la actividad fitotóxica de la hidracida del ácido isonicotínico

por

F. BUSTINZA y M.^a LUISA CALVO SANTAMARIA

En la sesión correspondiente al 19 de junio de 1952 de la Sociedad de Física y de Historia Natural de Ginebra, presentó el Profesor Dr. W. H. Schopfer una comunicación en colaboración con los señores E. Grob y G. Besson titulada: *Recherches sur les inhibiteurs de la croissance et la biogenèse des caroténoïdes. II. L'hydrazide de l'acide maleique et l'hydrazide de l'acide isonicotinique*, y en ella dieron cuenta de que la hidracida del ácido isonicotínico tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las raíces de *Pisum* y que el ácido indolacético antagoniza la acción de dicha hidracida empleada a determinadas concentraciones. En dicho trabajo también señalan que la hidracida del ácido isonicotínico posee actividad anticarotinógena (experiencias en plántulas de *Pisum*) mucho más acentuada que la actividad anticarotinógena que posee la hidracida del ácido maleico y que, en cambio, esta última hidracida posee efecto inhibitor mayor que la hidracida del ácido isonicotínico sobre el crecimiento del *Pisum* y sobre la biogénesis de la clorofila.

En el número de *Farmacia Nueva* correspondiente al mes de junio de ese año publicamos una breve nota sobre la acción fitotóxica de la hidracida del ácido isonicotínico (H. a. i.) y señalábamos en ella que la H. a. i. a determinadas concentraciones inhibe la germinación de las semillas y que a otras concentracio-

nes ejerce un marcado efecto frenador sobre el crecimiento de las raíces y de los tallitos de las plántulas y concretábamos que a las diluciones de 1 en 5.000 y de 1 en 10.000 se apreciaba perfectamente una disminución del crecimiento de las raíces y de los coleóptilos del trigo, y también presentábamos dos fotografías correspondientes a experiencias realizadas el día 18 de mayo y en las cuales se apreciaba claramente el efecto inhibitor de la H. a. i. sobre el crecimiento de las plántulas de altramuza y de rábano. Cuando publicamos esta nota no teníamos noticia de la comunicación casi simultánea del Profesor Schopfer en Ginebra a la Société de Physique et d'Histoire Naturelle, de la cual tuvo conocimiento uno de nosotros (F. B.) en una reunión celebrada en Ginebra el día 11 de julio con el Profesor Dr. F. Chodat y otros colegas suizos. Y pocos días después, el día 23 de julio, tuvo también la oportunidad de escuchar al propio Doctor Schopfer su interesante comunicación en el Congreso de Bioquímica de París titulada «*Etude du mode d'action de la streptomycine et de quelques antibiotiques sur les plantes supérieures*», y en ella el distinguido Profesor de la Universidad de Berna dió cuenta también del efecto frenador de la H. a. i. sobre el crecimiento del *Pisum* y sobre la formación de carotinoides.

Me consta que también otros investigadores —entre ellos el Profesor Nétien, de Lyon— estudian los efectos de la H. a. i. sobre el crecimiento de las plantas, pero hasta el momento en que redactamos estas líneas (20 de noviembre de 1952) no hemos tenido aún la oportunidad de conocer los resultados de sus investigaciones.

La presente nota es una ampliación de la publicada en *Farmacia Nueva* en el mes de junio y corresponde a experiencias realizadas con la H. a. i., con el usnato potásico y con la dihidroestreptomycina en fecha anterior al mes de julio, excepto en la brevísima alusión que hacemos a las hidracidas de los ácidos picolínico y nicotínico, sustancias cuya actividad fitotóxica estamos actualmente ensayando.

* * *

La hidracida del ácido isonitínico posee una extraordinaria actividad frente a diferentes especies de *Mycobacterium*, siendo

algo más activa frente a las estirpes virulentas de *Mycobacterium tuberculosis hominis* y frente a la estirpe BCG del bacilo tuberculoso bovino que frente a las estirpes de *Mycobacterium avium* y de *Mycobacterium saprofitos* (1).

La H. a. i. posee también ligera actividad frente a algunos hongos patógenos, tales como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Microsporium Audouini*, pero es prácticamente inactiva frente a gran número de bacterias saprofitas y patógenas (2).

Debido al espectro antimicrobiano tan estrecho de la H. a. i. pensamos que podría tener interés el tratar de ver si era o no capaz de inhibir la germinación de las semillas y si ejercía algún efecto sobre el crecimiento de las plántulas.

La técnica que hemos seguido es la misma que se detalla en un trabajo anterior (3) y hemos operado con semillas de *Raphanus sativus* (4) y *Lupinus ulbus* (5) y carióspsides de *Triticum compactum* (6).

La germinación se verifica sobre papel de filtro estéril dispuesto en el fondo de placas Petri y a razón de 6 a 8 semillas de altramuz, 12 a 20 de rábano y 20 granos de trigo en cada placa.

Previamente a la colocación de las semillas se vierte sobre el papel en las placas control 10 c. c. de agua destilada y en las demás 10 c. c. de las disoluciones de H. a. i. (7). La germina-

(1) F. Bustinza. «Sobre la hidracida del ácido Isonicotínico». Medica-
menta. Edición Farmacéutica. 20 de mayo de 1952.

(2) F. Bustinza. «Sobre el Instituto Squibb de Investigaciones Mé-
dicas y sobre la hidracida de la actividad antituberculosa de la hidracida
del ácido isonicotínico». Farmacia Nueva, abril 1952.

(3) F. Bustinza y Arturo Caballero. Contribución al estudio de la
influencia de los antibióticos en la germinación de las semillas. Anales
del Jardín Botánico. T. VII. Año 1946.

(4) Las semillas de *Raphanus sativus* nos fueron facilitadas por el
Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas.

(5) Nos fueron facilitadas por el Sr. D. Juan Daza Valdés de su co-
secha en el Jardín Botánico del año 1948.

(6) Nos fueron facilitadas por el Dr. D. Manuel Jordán de Urries,
cosecha del año 1951 en el Jardín Botánico y corresponde a la variedad
Little Club C. I núm. 4.066.

(7) La H. a. i. empleada en nuestras experiencias nos fué facilitada
amablemente por el Dr. Bernstein del Squibb Institute for Medical Re-
search.

ción la efectuamos a 20° C. y examinamos las placas a diario a partir de las 24 horas. Cuando la experiencia dura más de tres días adicionamos cantidades supletorias de agua a los controles o de los líquidos a ensayar en las otras placas.

Nuestros primeros ensayos los realizamos con disoluciones acuosas de H. a. i. al 1 por 100 y al 1 en 250 y observamos que la inhibición de la germinación era completa en las tres plantas ensayadas: *rábano*, *altramuz* y *trigo*.

Luego operamos con disoluciones acuosas de H. a. i. al 1 por 500, 1 por 1.000, 1 por 5.000, 1 por 10.000 y 1 por 20.000.

La fotografía número 1 refleja una de nuestras experiencias con *rábano* y en ella se aprecia bien el efecto frenador de la H. a. i. al 1 por 5.000 en agua sobre el crecimiento de las plántulas del *rábano*.

La fotografía número 2 corresponde a uno de nuestros ensayos con *Lupinus* cuyas semillas se mantuvieron primeramente durante tres días en las placas Petri y después se trasladaron las plántulas a los tubos de cultivo, en los cuales se pusieron las mismas disoluciones que en las placas Petri, es decir, agua en los controles, disoluciones acuosas de H. a. i. al 1 por 5.000 en otros tubos y disoluciones de H. a. i. al 1 por 10.000 en otro lote de tubos. Dicha foto número 2 fué tomada a los ocho días de colocar las plántulas en los tubos y se aprecia claramente la acción frenadora de la hidrácida sobre la actividad del meristemo terminal de la raíz principal, cuya longitud está muy reducida en comparación con la longitud en los tubos de control con agua. También está interferido el crecimiento de las raicillas y del eje hipocotíleo. (Véase también foto número 3.)

La fotografía número 4 refleja algunas de nuestras experiencias con *Triticum compactum* y empleando la H. a. i. a las diluciones de 1 en 500, 1 en 1.000 y 1 en 10.000. A 1 en 500 el desarrollo de las raíces y del coleóptilo es muy pequeño en comparación con los controles en agua. Aun a la dilución de 1 en 10.000 también es bien patente el efecto frenador de la H. a. i.

La fotografía número 5 refleja algunas de nuestras experiencias con *Lupinus* y empleando la H. a. i. a las concentraciones de 1 en 500, 1 en 1.000 y 1 en 10.000. El efecto inhibitor es muy acentuado en las concentraciones al 1 en 500 y al 1 en 1.000 en comparación con el desarrollo de la raíz de los controles en agua,

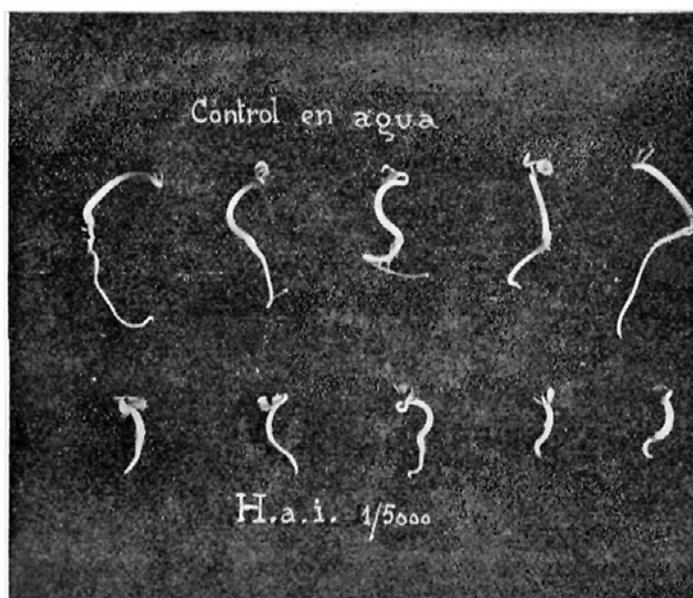


Fig. 1.—Resultado de uno de nuestros ensayos con la hidracida del ácido isonicotínico (H. a. i.) al 1 en 5.000 sobre plántulas de rábano.

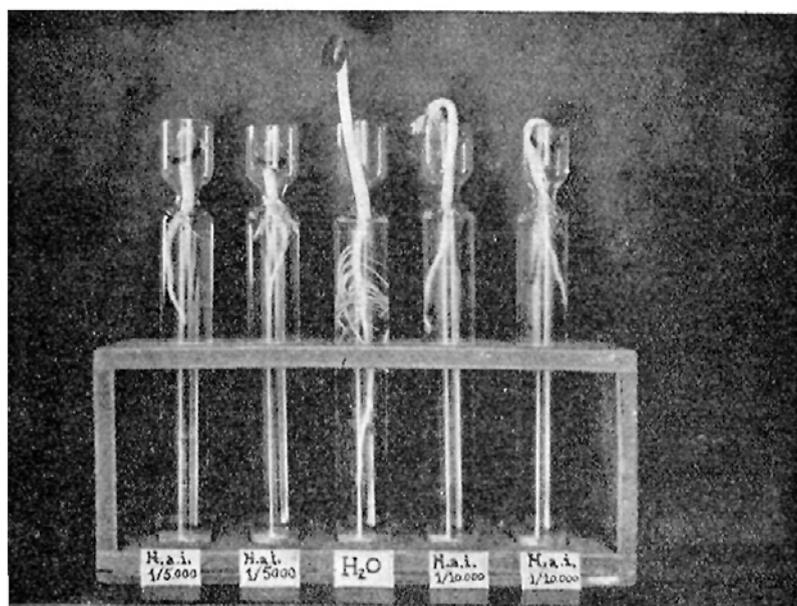


Fig. 2.—Efecto de la hidracida del ácido isonicotínico (H. a. i.) a las diluciones de 1 en 5.000 y de 1 en 10.000 sobre el crecimiento de las plántulas de *Lupinus albus*.

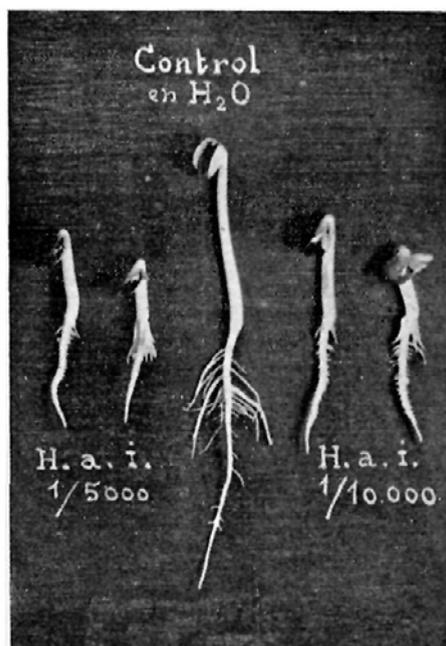


Fig. 3.-Estas plántulas corresponden a las de la figura núm. 2, que se han sacado de los tubos de cultivo para mejor apreciar la longitud relativa de la raíz principal, de las raicillas y del eje hipocotíleo.

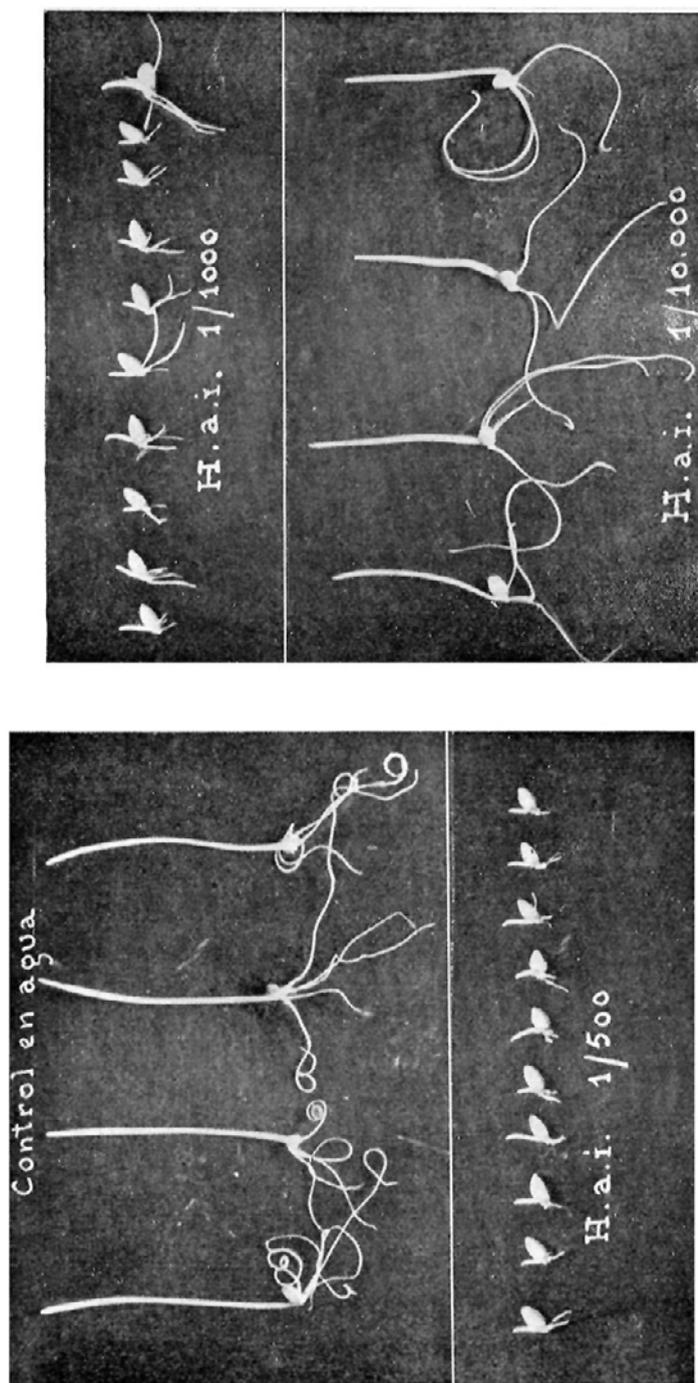


Fig. 4.—Efecto de las disoluciones acuosas de la hidracida del ácido isonicotínico (H. a. i.) a las concentraciones de 1 en 500, 1 en 1.000, y 1 en 10.000 sobre el crecimiento de los coleóptilos y raíces del *Triticum compactum* en comparación con el crecimiento normal en agua.

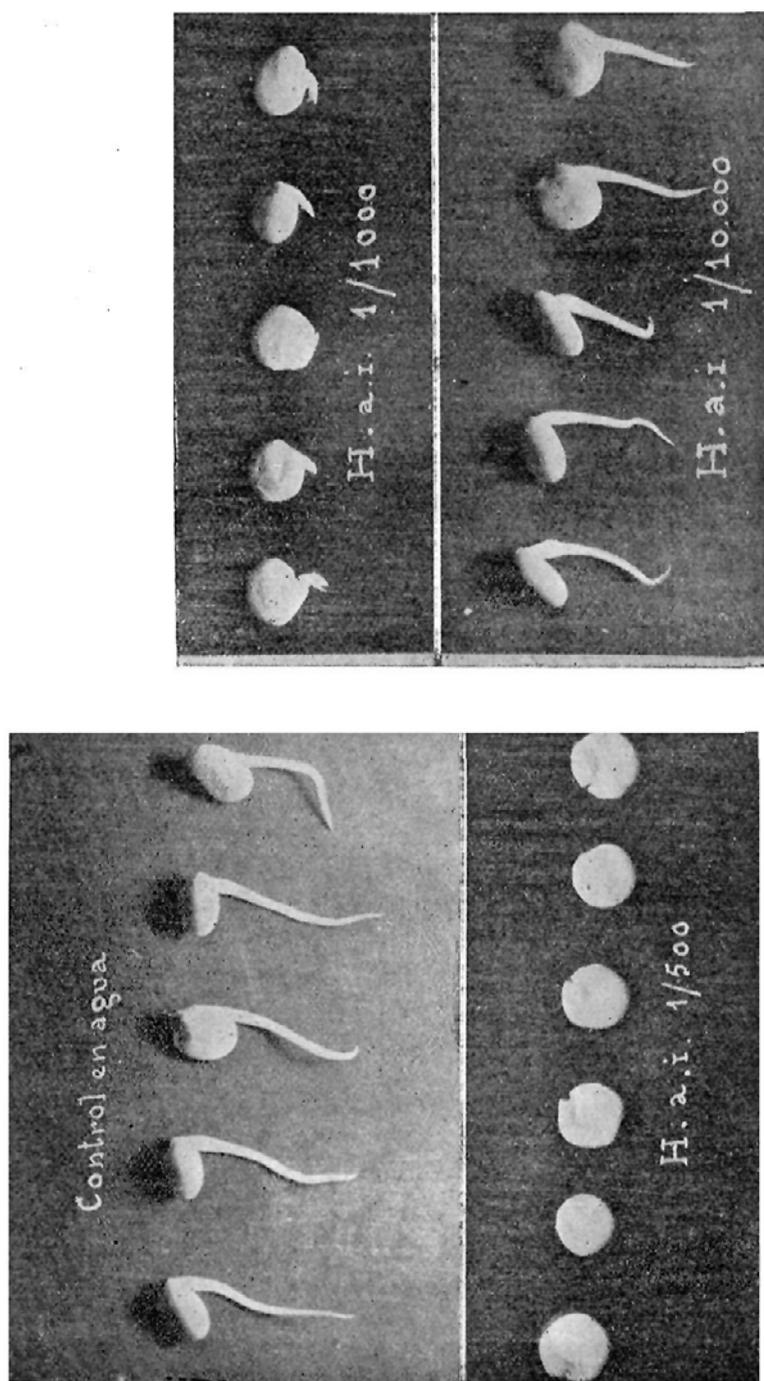


Fig. 5.—Efecto de las disoluciones acuosas de la hidrácida del ácido isonicotínico (H. a. i.) a las concentraciones de 1 en 500, 1 en 1.000, y 1 en 10.000 sobre la germinación de las semillas de *Lupinus albus*.

pero aun a la dilución de 1 en 10.000 la H. a. i. frena el crecimiento de la raíz de las plántulas de altramuz e incluso a la dilución de 1 en 50.000, que es la máxima dilución ensayada, la H. a. i. frena el crecimiento de la raíz de *Lupinus*.

En el cuadro número 1 presentamos el resultado de algunos de nuestros ensayos sobre el efecto de la H. a. i., del Usnato potásico, dihidroestreptomocina (9), mezclas de H. a. i. con usnato potásico y dihidroestreptomocina con H. a. i. sobre *Lupinus* (10).

Cuadro número 1

Efecto de las sustancias que se indican sobre el crecimiento de la raíz de las plántulas del *Lupinus albus*.

Las longitudes fueron medidas a los tres días de iniciarse la germinación a 24° C. y representan en cada lote la longitud media de 50 raíces.

LONGITUD DE LA RAIZ EN LOS CONTROLES EN AGUA: 47 mms.

PRODUCTO ENSAYADO	Longitud media — mms.	Porcentaje de crecimiento en relación con los controles.
H. a. i. al 1 por 5 000.....	33	70,21
» al 1 por 10 000.....	37	78,72
» al 1 por 20.000.....	41	87,23
Usnato potásico al 1 por 5 000.....	25	53,19
» » al 1 por 10.000.....	34,8	74,04
» » al 1 por 50.000.....	40	85,10
H. a. i. y Usnato potásico al 1 por 10 000 de cada sustancia.....	32	68,08
Dihidroestreptomocina sulfato a la dilución de 1.000 unidades por c.c.....	30	63,82
H. a. i. a la dilución de 1 en 20.000 y dihidroestreptomocina sulfato a la dilución de 1.000 u. por c.c.....	25,6	54,46

(9) La dihidroestreptomocina empleada en estas experiencias nos la facilitó el Dr. Palma, Director de Laboratorio Palma de Roma, filial de E. R. Squibb and Sons de New York.

(10) En 1947 Hans T. Euler observó que la estreptomocina inhibe la síntesis de la clorofila; J. M. Wright (Phytotoxic effects of some antibiotics. Annals of Botany Vol. XV No. 60 1951 p-493) ha estudiado la acción fitotóxica de la estreptomocina y su efecto inhibitor de la síntesis de la clorofila y M. Bein en su Tesis doctoral (Institut Botanique Berne, 1952) da cuenta de que la estreptomocina es un poderoso inhibidor del

Si analizamos los datos del cuadro número 1 llegamos a las siguientes conclusiones: La acción de la H. a. i. disminuye con la dilución (11).

La acción del usnato potásico disminuye con la dilución y dicha sustancia es más activa que la H. a. i. en lo que respecta a su acción frenadora del crecimiento de la raíz de *Lupinus*.

Empleados juntos la H. a. i. a la dilución de 1 en 10.000 y el usnato potásico a la dilución de 1 en 10.000 se observa una disminución del crecimiento de la raíz de *Lupinus* mayor que la lograda con cada una de las disoluciones por separado.

Por efecto de la H. a. i. al 1 por 20.000 el crecimiento de la raíz de las plántulas ha disminuído en un 12,76 por 100, y por efecto de la dihidroestreptomocina sulfato a la dilución de 1.000 unidades por c. c. el crecimiento de la raíz de las plántulas de *Lupinus* ha disminuído en 36,17 por 100 y empleando esas dos sustancias, H. a. i. y dihidroestreptomocina a la concentración de 1 en 20.000 de la primera y de 1.000 unidades por c. c. de la segunda el crecimiento en longitud de la raíz de las plántulas de *Lupinus* ha disminuído en un 45,53 por 100 ó sea que se aprecia un fenómeno aditivo bien claro entre ambas sustancias (12).

Aunque las respuestas obtenidas en las experiencias en plantas superiores con antibióticos y sustancias quimioterápicas no permiten deducir que ha de ocurrir lo mismo en los ensayos antibacterianos, sin embargo, se nos ocurrió realizar algunas pruebas de actividad *in vitro* sobre *Mycobacterium avium* de la dihidroestreptomocina y de la H. a. i. aisladas y en disoluciones que con-

crecimiento del meristemo radicular de *Pisum* cultivado asépticamente en medio sintético.

(11) Merced a la amabilidad del Dr. Bernstein, del Squibb Institute for Medical Research hemos podido ensayar recientemente la actividad de las hidracidas de los ácidos picolin-carbónico y nicotínico y hemos apreciado que también interfieren el desarrollo de las plántulas de rábano, altramuz y trigo.

(12) En la comunicación que uno de nosotros F. B. presentó con el Dr. A. Caballero al Congreso Internacional de Microbiología de Copenhague se dió cuenta de que estudiando la acción de 5-nitro-2-furfuraldehído semicarbazona y la acción de la patulina sobre las semillas de *Lactuca sativa*, se había podido observar un fenómeno de *sinergismo* bien neto entre esas dos sustancias y en relación con la inhibición de la germinación de dichas semillas.

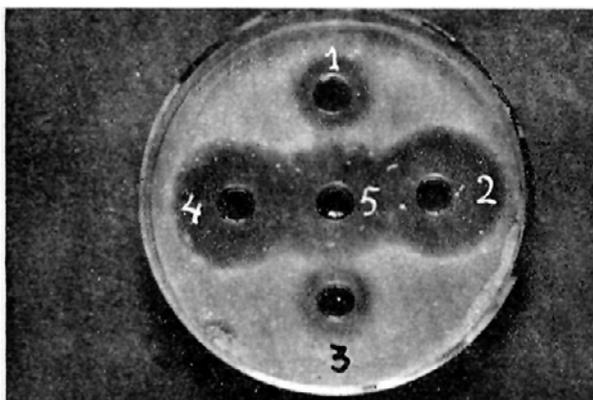


Fig. 6.—Resultado de una de nuestros ensayos de actividades de la H. a. i. frente al *Mycobacterium avium*. Los pocillos 1 y 3 se han llenado con disolución de sulfato de dihidroestreptomicina a la concentración de 10 unidades por c.c. El pocillo 5 se ha llenado con hidracida del ácido isonicotínico a la dilución de 1 en 40.000 y los pocillos 2 y 4 se han llenado con una disolución de H. a. i. al 1 por 40.000 que contenía además 10 unidades de estreptomicina por c.c. en forma de sulfato de dihidroestreptomicina. Los diámetros de inhibición en 2 y 4 son mayores que el diámetro logrado alrededor del 5 como correspondiendo a un efecto aditivo entre la H. a. i. y la dihidroestreptomicina.

tenían ambas sustancias y observamos que en las condiciones en que operamos se lograba también efecto aditivo.

La fotografía número 6 corresponde a uno de nuestros ensayos frente a una estirpe de *Mycobacterium avium*. Los pocillos 1 y 3 se han llenado con disolución de sulfato de dihidroestreptomomicina a la concentración de 10 unidades por c. c. El pocillo 5 se ha llenado con H. a. i. a la dilución de 1 en 40.000 y los pocillos 2 y 4 se han llenado con una disolución acuosa que contenía H. a. i. a la dilución de 1 en 40.000 y además 10 unidades de estreptomomicina por c. c. en forma de sulfato de dihidroestreptomomicina. Los diámetros de inhibición en 2 y en 4 son algo mayores que el logrado alrededor del pocillo 5 y, en consonancia, con un efecto aditivo entre la H. a. i. y la dihidroestreptomomicina (13).

RESUMEN

La hidracida del ácido isonicotínico disuelta en agua a la concentración de 1 en 250 y a mayor concentración inhibe completamente la germinación de las semillas de *Raphanus sativus* y *Lupinus albus* y la germinación de los carióspsides del *Triticum compactum* (Little Club C. I. n.º 4.066).

La hidracida del ácido isonicotínico disuelta en agua a la concentración de 1 en 5.000 frena el crecimiento de la raíz y tallito de las plántulas del *Raphanus sativus*.

(13) Pansy, Stander y Donovick, en su trabajo «*in vitro studies on Isonicotinic acid Hydrasid*», publicado en The American Review of Tuberculosis june 1952 p-761, llegan a la conclusión siguiente: «*The action of a mixture of Streptomycin and Isonicotinic acid Hydrasid on B C G is close to or slightly less than additive*». Y en ese mismo número Szybalski y Bryson publican un trabajo «*Bacterial resistance studies with derivatives of isonicotinic acid*» y llegan a la conclusión en experiencias frente al *Mycobacterium ranae*: «*In combination with streptomycin, neomycin viomycin. Pas or a thiosemicarbazone derivative the action of Isonicotinic acid Hydrasid was purely additive*». Pero Ilavsky, operando sobre la estirpe H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* y sobre estirpes H37Rv de *M. tub.* resistentes a la estreptomomicina, llega a la conclusión de que frente a esas estirpes y en las condiciones que él ha operado hay un efecto sinérgico claro entre la H. a. i. y la estreptomomicina. (Véase «*Synergistic action of Isonicotinic acid Hydrasid and Streptomycin in Vitro*». Am. Rev. of Tub. june 1952, p. 777.)

La hidracida del ácido isonicotínico frena el crecimiento de los coleóptilos y raíces del *Triticum compactum*, aun empleada a las diluciones de 1 en 20.000 en agua.

La hidracida del ácido isonicotínico frena el crecimiento de la raíz y del tallito de las plántulas de *Lupinus albus*, aun empleada a las diluciones de 1 en 50.000 en agua.

Hemos observado cierto efecto aditivo entre la hidracida del ácido isonicotínico y el usnato potásico en relación con su acción frenadora del crecimiento de las raíces de las plántulas del *Lupinus albus*.

Hemos observado un claro efecto aditivo entre la hidracida del ácido isonicotínico y el sulfato de dihidroestreptomycinina en relación con su acción frenadora del crecimiento de las raíces de las plántulas del *Lupinus albus*.

En los ensayos *in vitro* hemos observado una acción aditiva entre la dihidroestreptomycinina y la hidracida del ácido isonicotínico en relación con su actividad *anti-Mycobacterium* frente al *Mycobacterium avium*.

S U M M A R Y

Isonicotinic acid hydrazid (I. a. h.) dissolved in water and at the concentration of 1 in 250 or at greater concentration completely inhibits the germination of the seeds of *Raphanus sativus* and *Lupinus albus* and the germination of the grains of *Triticum compactum*.

I. a. h. at the dilution of 1 in 5.000 in water has inhibitory activity on the growth of the root and stem of seedlings of *Raphanus sativus*.

I. a. h. has inhibitory activity on the growth of coleoptiles and roots of *Triticum compactum* up to the highest dilution tested: 1 in 20.000 of water.

I. a. h. has inhibitory activity on the growth of roots and stems of seedlings of *Lupinus albus* up to the highest dilution tested: 1 in 50.000 of water.

We have observed slight additive effect between I. a. h. and potassium usnate in relation with their inhibitory action on the growth of the roots of the seedlings of *Lupinus albus*.

We have observed an additive effect between I. a. h. and dihydrostreptomycin sulfate in relation with their inhibitory effect on the growth of the roots of seedlings of *Lupinus albus*.

In vitro tests have shown additive inhibitory effect between dihydrostreptomycin and I. a. h. against *Mycobacterium avium*.