

Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifúngicas del ácido úsnico y de algunos de sus derivados

por

FLORENCIO BUSTINZA

En 1946, Bargellini y colaboradores dieron cuenta de que la sal potásica del ácido úsnico es activa frente a *Staph. aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *B. anthracis* y *B. megatherium* (1) e inactiva frente a diversas bacterias Gram negativas.

En 1947, Marshak llamó la atención sobre la gran actividad anti-*Mycobacterium* del ácido úsnico que había obtenido de la *Ramalina reticulata* (2 y 3). En ese mismo año Stoll y colaboradores señalaron la gran actividad anti-*Mycobacterium* de los ácidos úsnicos en su forma dextro, levo y racémica (4). También a fines del 1947 Barry y colaboradores dieron cuenta de la gran actividad del ácido úsnico frente al *Mycobacterium tuberculosis* (5).

(1) G. BARGELLINI, E. DEL PIANO e G. B. MARTINI-BETTÒLO: *Sull'attività antibatterica di due acidi lichenici: acido usnico ed acido vulpinico*. «Atti della Accademia Nazionale dei Lincei», vol. I, fasc. 12, págs. 1252-1255 (1946).

(2) A. MARSHAK: *A crystalline antibacterial substance from the lichen Ramalina reticulata*. «Extracts from Public Health Reports», vol. 62, núm. I January 3, págs. 3-19 (1947).

(3) A. MARSHAK, G. T. BARRY and L. C. CRAIG: *Antibiotic compound isolated from the Lichen Ramalina reticulata*. «Science», vol. 106, págs. 394-395 (1947).

(4) A. STOLL, A. BRACK and J. RENZ: *Die antibakterielle Wirkung der Usninsäure auf Mykobakterien und andere Mikroorganismen*. «Experientia», volumen III/B, pág. 115 (1947).

(5) V. C. BARRY, L. O. ROURKE and D. TWOMEY: *Antitubercular activity of diphenyl ether and related compounds*. «Nature», vol. 160, pág. 800 (1947).

En 1948, en colaboración con el Dr. D. Arturo Caballero López dimos cuenta de nuestras investigaciones con el ácido dextro-úsrico (6), y señalamos su gran actividad anti-*Mycobacterium* más intensa frente a las estirpes virulentas de *Mycobacterium tuberculosis hominis*, que frente al *Myc. tuberculosis avium*. En ese mismo trabajo también dimos cuenta de que al agregar una disolución acuosa de usnato sódico sobre una disolución acuosa de clorhidrato de estreptomina se produce un precipitado que estimamos podría ser un usnato de estreptomina o una mezcla de usnatos. Dicho precipitado era insoluble en el agua, pero era activo *in vitro* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mycoides*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium tuberculosis hominis* (estirpe virulenta H37Rv) y *Mycobacterium tuberculosis avium*. Por ser activo frente a *Escherichia coli* llegamos a la conclusión de que en su composición entraba la estreptomina ya que el ácido úsrico era inactivo *in vitro* frente a dicha bacteria Gram negativa en las condiciones en que realizamos nuestras experiencias.

Es digno de resaltar el hecho de que mientras los investigadores que hemos citado trabajaban con el ácido úsrico, también estaban interesados en el mismo problema los investigadores japoneses Shibata, Ukita, Tamura y Miura, quienes en abril de 1948 publicaron un trabajo (7) sobre la actividad antibacteriana de los ácidos dextro y levoúsricos, y también del racémico, así como también sobre la actividad antibacteriana de algunos de sus derivados, entre ellos el ácido l-diacetilúsrico, el d-diacetilúsrico, el l-dihidroúsrico y el d-diacetildihidroúsrico, y señalaron que la acetilación de los dos grupos oxhidrílicos reduce su actividad anti-*Mycobacterium* a la mitad o a la cuarta parte, y que también se reduce a la cuarta parte la actividad anti-*Mycobacterium* del ácido úsrico al incorporarle dos átomos de hidrógeno en el doble enlace, y que cuando se acetila al ácido dihidroúsrico entonces la

(6) F. BUSTINZA y A. CABALLERO: *Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes*. ANALES DEL JARDÍN BOTÁNICO DE MADRID, tomo VII, págs. 511-548 (1948).

(7) SH. SHIBATA, T. UKITA, T. TAMURA and Y. MIURA: *Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and its derivatives*. «Jap. Med. J.», 1, 2, págs. 152-154 (1948).

actividad originaria del ácido úsnico se reduce a una décimosex-tava parte, por lo que, según los autores japoneses citados, gran parte de la actividad del ácido úsnico se debe a los grupos OH y al doble enlace.

También en 1948 Klosa, en Alemania, estudió la actividad antibacteriana de una sustancia a la que él designó con el nombre de *Evosin*, y que era una mezcla de los ácidos úsnico y evérnico y de otras dos sustancias no identificadas (8).

El investigador finlandés Vartia, en un trabajo que se publicó en los comienzos del 1949 (9), dió cuenta de haber obtenido el ácido l-úsnico de *Cladonia alpestris*, y ensayó y comprobó su actividad en forma de sal sódica frente a dos estirpes de bacilo tuberculoso. Vartia, en otro trabajo que publicó en 1950, dió cuenta de la actividad del ácido l-úsnico obtenido de *Cladonia uncialis* en forma de sal sódica frente a diversas bacterias Gram positivas (10).

También Vartia, en su tesis doctoral (nov. 1950), dió cuenta de la acción del ácido l-úsnico frente a *Candida tropicalis* y *Tricophyton interdigitalis* (11).

Debo señalar que en la página 243 de mi libro *De Koch a Waksman. La estreptomocina y los antibióticos anti-Mycobacterium*, publicado en septiembre de 1948, señalé como resultado de algunas experiencias que realicé con el Dr. A. Caballero que la sal sódica del ácido d-úsnico en las placas inhibía el crecimiento del *Tricophyton mentagrophytes*.

También quiero recordar que el 23 de abril de 1949, con motivo del cursillo internacional que se celebró en la Facultad de Medicina de Lausana por iniciativa del Profesor Hauduroy, y en relación con los bacilos tuberculosos y paratuberculosos, tuve la oportunidad de llamar la atención de los asistentes a dicho cursi-

(8) J. KLOSA: *Antibiotica in Flechten*. «Die Naturwissenschaften», 9-288 (1948).

(9) K. O. VARTIA: *Antibiotics in Lichen*. I. «Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae», vol. 27, fasc. I, págs. 46-54 (1949).

(10) K. O. VARTIA: *Antibiotics in Lichens*. II. «Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae», vol. 28 fasc. I, págs. 7-19 (1950).

(11) K. O. VARTIA: *On antibiotic Effects of Lichens and lichen substances*. Supplement No. 7 (1950) to «Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae».

llo sobre la gran actividad anti-*Mycobacterium in vitro* del ácido úsnico y de sus sales de sodio, de cobalto, de cobre, de oro y de níquel y de los derivados úsnico-estreptomina y úsnico-dihidro-estreptomina, sustancias que con el Dr. Caballero habíamos obtenido y cuya actividad antibacteriana estábamos explorando. Y gracias a la amabilidad de la Dra. Mme. Tanner, colaboradora del Profesor Hauduroy, pude dejar en marcha en Lausana algunas experiencias demostrativas de la actividad anti-*Mycobacterium* de aquellas sustancias, y en el número de «Farmacia Nueva» correspondiente al mes de abril de 1949, al dar cuenta de mis impresiones sobre el Cursillo de Lausana reproduje algunos párrafos de la carta que con fecha 4 de mayo de 1949 me envió amablemente la Dra. Tanner, y en la cual me confirmaba la gran actividad anti-*Mycobacterium* de los derivados del ácido dextro-úsnico que le había llevado.

Decía así la Dra. Tanner :

«Si j'ai tardé a vous donner les résultats de nos expériences, c'est que le bacille tuberculeux aviaire n'avait pas poussé. J'ai refait la même expérience sur le milieu de Löwenstein et j'ai pu constater que l'effet inhibiteur était tel que les colonies apparaissaient tout à la périphérie de la plaque seulement.»

Quant aux bacilles paratuberculeux ils ont donné les résultats suivants :

Souche 6 (*Mycobacterium paratuberculosis* Tannopheos ; origine Institut Pasteur Paris) :

	Diamètre de la zone d'inhibition
Plaque núm. I: 1. U. Co (12).	2,5 cms.
2. U. Na.	2,5 cms.
3. U. dihydro.	2 cms.
4. Proovlenglycol.	0
Plaque núm. II: 1. U. Ni.	2,5 cms.
2. U. Au.	2,5 cms.
3. X.	3 cms.
4. U. Cu.	1,5 cms.

(12) U. Co quiere decir usnato de cobalto; U. Na, usnato sódico; U. dihydro, el derivado úsnico dihidroestreptomina; U. Ni es el usnato de níquel; U. Au es el usnato de oro; X es la oxigenocilina (es una disolución de peróxido de urea, de urea y de 8-hidroxiquinoleína en glicerina. Véase F. BUSTIN-

Souche 71 (*Mycobacterium paratuberculosis* isolé par moi même de la terre en 1943):

Plaque núm. I:	1. U. Co.	4 cms.
	2. U. Au.	3 cms.
	3. U. dihydro.	3,5 cms.
	4. U. Ni.	4 cms.
Plaque núm. II:	1. U. Co.	4 cms.
	2. U. Au.	3 cms.
	3. U. dihydro.	4 cms.
	4. U. Ni.	3 cms.
Plaque núm. III:	1. U. Na.	4,5 cms.
	2. Propylenglycol.	0
	3. U. dihydro.	4 cms.
	4. U. Co.	4 cms.)

Quiero expresar desde estas líneas mi profunda gratitud a la doctora Tanner por las facilidades que me dió y por la ayuda valiosa que me prestó en Lausana para poner en marcha las experiencias cuyo resultado tuvo luego ella la atención de comunicarme.

* * *

Al ser nombrado el Dr. A. Caballero, Profesor de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de Barcelona, he proseguido yo las investigaciones sobre la actividad antibacteriana y antifúngica del ácido dextro-úsrico y de sus derivados, y a continuación daré cuenta de algunos de mis ensayos.

Espectro parcial antibacteriano del usnato sódico

Foto núm. 1.

El medio de cultivo es un caldo agar tampón fosfatos de pH 7. Se han sembrado en dirección radial y hasta el mismo borde

21: *Sobre las propiedades antibacterianas y antifúngicas del peróxido de Urea, asociado a la Urea y a la 8-hidroxiquinolcina.* «Medicina y Cirugía de Guerra», junio 1950; U. Cu es el usnato de cobre. El usnato sódico se disolvió en agua destilada estéril y los demás derivados del ácido úsrico se disolvieron en propilenglicol aproximadamente a la concentración de 1 por 1.000.

del pocillo central con pipeta capilar cultivos en caldo de veinticuatro horas de las bacterias siguientes: *Staphylococcus aureus* estirpe H muy sensible a la penicilina; *Staphylococcus aureus*, estirpe de la Dra. Voureka, muy resistente a la penicilina; *Escherichia coli* (13), *Sarcina lutea* (14), *B. Mycoides* (15) y *B. licheniformis* (16).

El pocillo central se ha llenado con disolución en agua destilada estéril del usnato sódico al 1 por 1.000.

La fotografía ha sido tomada después de incubar la placa durante veinticuatro horas en estufa a 37° C.

Resultados.—La estirpe de estafilococo sensible a la penicilina, la estirpe de estafilococo muy resistente a la penicilina, *Sarcina lutea*, *B. mycoides* y *B. licheniformis*, han sido claramente inhibidas.

Escherichia coli ha crecido perfectamente hasta el mismo borde del pocillo.

Observaciones.—He realizado otras experiencias similares con *Streptococo hemolitico*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella 41* con resultado positivo, es decir, inhibición frente al estreptococo, y negativo frente al bacilo piocianico y a la *Klebsiella* (17).

Actividad antifúngica del usnato sódico

Fotografías núms. 2 y 3.

El medio de cultivo es especial para el desarrollo del *Trichophyton mentagrophytes* a base de extracto de levadura Difco, tryptona Difco, glucosa, agar y agua.

He sembrado la placa con una suspensión de esporas del *Trichophyton mentagrophytes* causante del pie de atleta y de otras dermatomicosis (18).

Los pocillos 1, 2, 3 y 4, se han llenado con disolución de usnato sódico al 1 por 1.000 en agua destilada estéril.

La fotografía núm. 2 ha sido obtenida después de incubar durante cuarenta y ocho horas la placa en la estufa a 26° C., y la fo-

(13) Estirpe B-686 del N. R. R. L. (Peoria-E. U.).

(14) Estirpe que recibí de los Laboratorios Abbott (E. U.).

(15) Estirpe B-615 del N. R. R. L. (Peoria-E. U.).

(16) Estirpe núm. 7.198 del N. C. T. C. de Londres.

(17) Quiero expresar mi gratitud al Sr. D. Juan Daza Valdés, por la preparación de los medios de cultivo empleados en estos ensayos y por su ayuda en las operaciones de extracción del ácido destro-úsico.

(18) Estirpe que me la facilitó el Dr. G. W. Irving (Jr.) descubridor con el Dr. Fontaine de la tomatina.

tografía 3 corresponde a la misma placa, pero después de setenta y dos horas de incubación.

Resultado.—El usnato sódico inhibe el crecimiento del *Tricophyton mentagrophytes*.

Observaciones.—Ensayos realizados con usnato sódico frente a *Candida albicans* (19), *Torula utilis* var. *major* (20) y *Saccharomyces cerevisiae* (21), siguiendo este mismo método de las placas han revelado que el usnato sódico inhibe ligeramente el crecimiento de esas levaduras.

EXPERIENCIAS CON LA USNIMICINA Y CON LA USNIDIHIDROMICINA

Ya anteriormente he señalado que en colaboración con el doctor A. Caballero, y por reacción entre el usnato sódico y el clorhidrato de estreptomycin, obtuvimos en los comienzos de 1948 una sustancia insoluble en el agua y que no logramos cristalizar, y supusimos entonces que pudiera tratarse de un usnato de estreptomycin o de una mezcla de usnatos.

Como el problema de la dilucidación de la naturaleza química de esa sustancia no estaba a nuestro alcance, y sí, en cambio, podía ser estudiado y resuelto con muchísima mayor facilidad y rapidez por los equipos de investigadores que habían participado en el análisis de la estructura molecular de la estreptomycin, decidimos enviar nuestro trabajo, y asimismo cierta cantidad de ácido úsnico a diferentes grupos de investigadores, tanto europeos como norteamericanos, y, entre otros, lo hicimos a los grupos de investigación del *Merck Institute for Therapeutic Research* y al *Squibb Institute for Medical Research*, al objeto de que pudieran ellos complementar nuestra investigación, aclarando la forma en que pudieran estar acopladas las moléculas de estreptomycin con las del ácido úsnico y para que ellos puntualizaran con sus técnicas standardizadas y rigurosas si este nuevo derivado del ácido úsnico y de la estreptomycin pudiera servir en la experimentación animal, y luego en la clínica humana, ya que en nuestra opinión po-

(19) Emplé en su fase levuriforme la estirpe Y-477 del N. R. R. L.

(20) Esta *Torula* la recibí del Profesor Sir Alexander Fleming, quien me la gestionó del Imperial Mycological Institute.

(21) Estirpe Y-367 del N. R. R. L.

drian sumarse los efectos anti-*Mycobacterium* del ácido úsnico con los de la estreptomina, e incluso pensaba yo en si ese derivado úsnico-estreptomínico podría ser activo frente a las estirpes resistentes a la estreptomina, y en ese sentido me expresé en las últimas líneas con que termino el capítulo dedicado a «Los líquenes como fuente de sustancias activas frente a los *Mycobacterium*» de mi libro sobre la estreptomina, publicado en septiembre de 1948, donde, en la página 245, decía yo así:

*¿Actuarán el ácido úsnico y la estreptomina en sinergismo y será el usnicato de estreptomina activo frente a las estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a la estreptomina?...*

He estado esperando con verdadera impaciencia los resultados de las investigaciones de los grupos mencionados. Hasta el presente no han publicado, que yo sepa, dichos resultados, y solamente me han comunicado que nuestra sustancia desde el punto de vista terapéutico no ofrecía interés por los efectos tóxicos del ácido úsnico, y desde el punto de vista químico, los investigadores del Merck Institute for Therapeutic Research, que son los que más brillantes trabajos han realizado en relación con la estructura química de la estreptomina, dudan que se trate de una verdadera sal del ácido úsnico con la estreptomina y piensan, aunque no me lo concretan categóricamente, en si se tratará de una mezcla del componente ácido (úsnico) y de la base (estreptomina).

En vista de estos antecedentes propongo designar con el nombre de *Usnimicina* al precipitado que se obtiene al actuar el usnato sódico sobre el clorhidrato de estreptomina, y con el nombre de *Usnidihidromicina* al que resulta cuando se hace actuar la disolución del usnato sódico con la del clorhidrato de dihidroestreptomina, y sin prejuzgar si realmente son verdaderas sales del ácido úsnico y de las bases respectivas estreptomina y dihidroestreptomina, o si se trata de complejos de adsorción de dichas bases con el ácido úsnico.

Presencia del ácido úsnico en la Usnimicina

Basándome en que el ácido úsnico es activo frente al *Tricophyton mentagrophytes*, y en que la estreptomina no lo es, he

dispuesto las experiencias que vienen reflejadas en las fotografías 4, 5 y 6.

Fotografía núm. 4.

El medio de cultivo es el mismo empleado en las experiencias de la placa correspondiente a la fotografía núm. 3.

Se ha sembrado con suspensión de esporas del *Tricophyton mentagrophytes*.

Los pocillos 1 y 3 se han llenado con disolución acuosa de clorhidrato de estreptomina (22) al título de 125 unidades de estreptomina base por c. c. Los pocillos 2 y 4 se han llenado con una suspensión fina de usnimicina en agua destilada estéril a la concentración de 1 por 1.000.

La fotografía ha sido tomada a las cuarenta y ocho horas de iniciada la incubación en la estufa a 26° C.

Resultado.—La ausencia de inhibición alrededor de los pocillos 1 y 3 y la inhibición alrededor de los pocillos 2 y 4 prueban la presencia de ácido úsnico en la usnimicina.

Fotografías núms. 5 y 6.

El medio de cultivo es el mismo de la experiencia anterior. El hongo es también el *Tricophyton mentagrophytes*.

Los pocillos 1 y 3 se han llenado con disolución acuosa de clorhidrato de estreptomina al título de 125 u. por c. c. Los pocillos 2 y 4 se han llenado con disolución de usnimicina en propilenoglicol al 1 por 1.000. El pocillo 5 contiene solamente propilenoglicol.

La fotografía núm. 5 ha sido tomada a los tres días de incubación a 26° C., y la fotografía núm. 6 ha sido tomada a los seis días de incubación a 26° C.

Resultados.—En la fotografía núm. 5 obsérvese que el propilenoglicol ejerce cierta acción inhibitrice sobre el desarrollo del *Tricophyton mentagrophytes*, por lo que su presencia como disolvente de la usnimicina en los pocillos 2 y 4 explica el porqué los halos de inhibición alrededor de esos pocillos resultan mayores que los halos de inhibición alrededor de los pocillos 2 y 4 de la fotografía núm. 4.

En la fotografía núm. 6 se observa cómo el *Tricophyton* ha vencido y superado a la acción inhibitrice del propilenoglicol, ya que el hongo está ya creciendo alrededor del pocillo núm. 5, que contiene dicho disolvente, y los halos de inhibición alrededor de los

(22) He empleado clorhidrato de estreptomina Merck, lote 7 R 776, cuya actividad era de 625 unidades por miligramo y que amablemente me facilitó el Dr. R. E. Gruber, de Merck and Co. Inc. (E. U.).

pocillos 2 y 4 son también menores que los correspondientes 2 y 4 de la fotografía núm. 5, lo que indica (de acuerdo con lo que se observa alrededor del pocillo 5) que esos halos corresponden a la acción inhibitriz propia del usnato sódico. (Fotos 2 y 3).

Otras experiencias:

Basándome en que el benzol disuelve en frío al ácido úsnico, he tratado de separarlo de la usnimicina, sin conseguirlo; en cambio, de una mezcla de polvo fino de ácido úsnico con polvo fino de clorhidrato de estreptomycin, el benzol separa en frío al ácido úsnico, luego alguna ligazón hay en la usnimicina entre el ácido úsnico y la estreptomycin base.

Si se coloca un poco de usnimicina en un porta y se agrega ácido clorhídrico concentrado, entonces se separa el ácido úsnico, y si evaporamos suavemente a sequedad y agregamos benzol una vez frío el porta, entonces el benzol disuelve al ácido úsnico, y al evaporarse cristaliza el ácido úsnico.

Si disolvemos usnimicina en acetona en frío, al evaporarse no cristaliza el ácido úsnico, sino que queda un residuo amorfo. Pero si tratamos la usnimicina en un porta con ClH concentrado, entonces se consigue separar al ácido úsnico, se evapora suavemente a sequedad, y, una vez frío, se agrega acetona, y por evaporación en el mismo porta bajo cubre se obtiene la cristalización típica en agujas del ácido úsnico.

Presencia de estreptomycin en la usnimicina

Método basado en el empleo de una estirpe de E. coli-estreptomycin-dependiente.

Fotografía núm. 7.

El medio de cultivo es caldo agar a un pH 7.

Se ha sembrado por inundación con una suspensión preparada a partir de un cultivo sólido de *Escherichia coli* *estreptomycin dependiente* que me fué enviado por el Profesor Waksman.

En los pocillos 1 y 3 se ha colocado disolución acuosa en agua estéril de usnato sódico al 1 por 1.000.

Los pocillos 2 y 4 se han llenado con una dispersión fina de la usnimicina en una disolución estéril de tampón fosfatos de pH 7. El pocillo 5 se ha llenado con disolución de clorhidrato de estrepto-

tomicinà en agua destilada estéril y al título de ocho unidades por c. c.

La fotografía ha sido tomada a las cuarenta y ocho horas de incubación a 37° C.

Resultado.—Obsérvese que la estirpe de *E. coli estreptomycin dependiente* solamente ha crecido alrededor del pocillo núm. 5, que contiene estreptomicina, y alrededor de los pocillos 2 y 4, que contienen usnimicina, lo que prueba que la estreptomicina entra en la composición de la usnimicina.

Debo recordar que ni el ácido úsnico ni el usnato sódico inhiben a *Escherichia coli*, y si en esta experiencia no hay crecimiento alrededor de los pocillos 1 y 3, no es por la acción inhibitriz del ácido úsnico, sino sencillamente por que falta la estreptomicina, que es para esa estirpe un factor de crecimiento.

Método basado en la actividad de la estreptomicina frente a bacterias Gram negativas.

Fotografía núm. 8.

El medio de cultivo es *Bacto Streptomycin assay agar* a un pH 8.

Se han sembrado radialmente con pipeta capilar cultivos en caldo de veinticuatro horas de las bacterias siguientes: *E. coli* (estirpe sensible a la estreptomicina), *Klebsiella 41*, *Proteus* sp., *Ps. aeruginosa* y *Mycobacterium 607 SmR*, estirpe estreptomycin resistente que me fué enviada por el Prof. Waksman (1).

El pocillo central se ha llenado con suspensión de usnimicina al 1 por 1.000 en agua destilada estéril.

La fotografía ha sido tomada a las veinticuatro horas de incubación a 37° C.

Resultados.—Las cuatro bacterias Gram negativas *E. coli*, *Klebsiella 41*, *Proteus* sp. y *Ps. aeruginosa* han sido inhibidas en su crecimiento, lo que prueba la presencia de estreptomicina en la usnimicina, ya que el ácido úsnico no interfiere en las condiciones de esta experiencia con el crecimiento de esas bacterias.

El *Mycobacterium 607 SmR estreptomycin resistente*, es sensible a la acción de la usnimicina. Ello puede ser debido al componente úsnico, o ¿a la acción aditiva o quizá sinérgica del úsnico y de la estreptomicina?

(1) Los *Mycobacterium* son Gram positivos.

Presencia de ácido úsnico en la usnidihidromicina

Se demuestra por las mismas técnicas de tratamiento con ácido clorhídrico concentrado y disolución con benzol o con acetona y posterior cristalización, conforme he detallado antes para la investigación de la presencia del ácido úsnico en la usnimicina.

Presencia de dihidroestreptomina en la usnidihidromicina

Método basado en la actividad de la dihidroestreptomina sobre bacterias Gram negativas.

Fotografía núm. 9.

El medio de cultivo es *Bacto Streptomycin assay agar* a un pH 8.

Se han sembrado radialmente con pipeta capilar cultivos en caldo de veinticuatro horas de las bacterias siguientes: *Klebsiella 41*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus* sp. y *B. mycooides* (esta última es Gram positiva).

El pocillo central se ha llenado con suspensión de usnidihidromicina en agua destilada estéril al 1 por 1.000.

La fotografía ha sido tomada a las veinticuatro horas de incubación a 37° C.

Resultados.—Las cuatro bacterias Gram negativas: *Klebsiella 41*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* y *Proteus* sp. han sido claramente inhibidas, lo que prueba la presencia de dihidroestreptomina en la usnidihidromicina.

B. mycooides (bacteria Gram positiva) ha sido también inhibida por la usnimicina, pero esta inhibición no es en este caso debida exclusivamente a la dihidroestreptomina, ya que también el ácido úsnico inhibe a dicha bacteria.

Experiencias con polvos de antibióticos

Fotografía núm. 10.

El medio de cultivo es caldo agar, a un pH 7,5.

Se ha sembrado por inundación con *B. mycooides*.

En 1 se ha puesto un poco de polvo de ácido úsnico; en 2, polvo de clorhidrato de estreptomina; en 3, polvo de usnato sódico, y en 4, polvo de usnimicina (23).

(23) El pocillo central se ha llenado con una disolución que nada tiene que ver con el ácido úsnico ni con la estreptomina.

La fotografía ha sido obtenida a las veinticuatro horas de incubación en la estufa a 37° C.

Resultados.—El ácido úsnico, prácticamente insoluble en el agua, se ha revelado con una ligera actividad. El usnato sódico algo más activo que el ácido úsnico, por ser algo soluble. El clorhidrato de estreptomina se ha disuelto en el medio de cultivo y ha producido clara inhibición, aunque la fotografía no es buena y el polvo de usnimicina revela actividad, debida a sus dos componentes úsnico y estreptomina.

Fotografía núm. 11.

El medio de cultivo es caldo agar, a un pH. 7,5.

Se ha sembrado por inundación con *Mycobacterium phlei*.

En 1, se ha puesto polvo de ácido úsnico; en 2, polvo de usnato sódico; en 3, polvo de clorhidrato de estreptomina; en 4, polvo de sulfato de neomicina (24), y en 5, polvo de usnimicina.

La fotografía ha sido tomada a las cuarenta y ocho horas de incubación en estufa a 37° C.

Resultados.—Se aprecia actividad clara alrededor de todos los polvos.

El clorhidrato de estreptomina 3 y el sulfato de neomicina 4 se han disuelto y se han difundido bien.

El polvo de usnimicina es más activo que los polvos de ácido úsnico y de usnato sódico, lo que prueba que contiene estreptomina además del ácido úsnico.

Fotografía núm. 12.

El medio de cultivo es caldo agar, a un pH. 7,5.

Se ha sembrado por inundación con el *Mycobacterium 607 SmR*, estirpe resistente a la estreptomina.

En 1, se ha puesto polvo de ácido úsnico; en 2, polvo de clorhidrato de estreptomina; en 3, polvo de usnato sódico; en 4, polvo de usnimicina, y en 5, polvo de usnidihidromicina.

Observación.—La estreptomina empleada en esta experiencia, así como también en las experiencias correspondientes a las placas de las fotografías 10 y 11, es un clorhidrato de estreptomina Merck, cuya actividad era de 625 unidades por mg.

Resultados.—El clorhidrato de estreptomina se ha disuelto y ha alcanzado concentración suficiente para producir una inhibición de esta estirpe de *Mycobacterium* resistente (compárese

(24) La neomicina empleada me fué facilitada por el Dr. Lawrence Smith, Director médico del C. S. C. de N.-Y., y su actividad era de 163 unidades por miligramo.

con los halos alrededor del polvo 2 en la fotografía núm. 10, y del polvo 3, en la fotografía núm. 11.

El ácido úsnico en polvo ha producido ligera inhibición. El polvo de usnato sódico ha producido inhibición, y los polvos de usnimicina 4 y de usnidihidromicina 5 han producido inhibiciones muy claras, mucho más netas que las producidas por el ácido úsnico y la estreptomocina separadamente. ¿Sinergismo?

CONCLUSIONES

1.^a El usnato sódico es activo *in vitro* frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a la penicilina.

2.^a El usnato sódico es activo *in vitro* frente a *Sarcina lutea*, *B. licheniformis*, *B. mycoides* y *Streptococo hemolítico*, y es inactivo frente a *Ps. aeruginosa* y *Klebsiella 41*.

3.^a El usnato sódico es activo *in vitro* frente al *Tricophyton mentagrophytes*, y también frente a *Candida albicans*, *Torula utilis* var. *major* y *Saccharomyces cerevisiae*.

4.^a Se ha demostrado la presencia del ácido úsnico en la usnimicina por su actividad frente al *Tricophyton mentagrophytes*, y además separando al ácido de la base mediante el empleo del ácido clorhídrico y extracción y cristalización del ácido úsnico liberado utilizando como disolventes el benzol y la acetona.

5.^a Se ha demostrado la presencia de estreptomocina en la usnimicina mediante el empleo de una estirpe de *Escherichia coli estreptomocin-dependiente*, y por su actividad frente a las bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, estirpe sensible a la estreptomocina; *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp. y *Klebsiella 41*.

6.^a Se ha demostrado la presencia de ácido úsnico en la usnidihidromicina, separando al ácido de la base mediante el empleo del ácido clorhídrico y extracción y cristalización del ácido úsnico liberado, utilizando como disolventes el benzol y la acetona.

7.^a Se ha demostrado la presencia de dihidroestreptomocina en la usnidihidromicina por su actividad frente a las bacterias Gram negativas; *Escherichia coli*, estirpe sensible a la dihidroestreptomocina, *Ps. aeruginosa*, *Proteus* sp. y *Klebsiella 41*.

8.^a El ácido úsnico, el usnato sódico y la usnimicina, en forma de polvo inhiben *in vitro* al *B. mycoides* y *Mycobacterium phlei*.

9.^a El ácido úsnico, el usnato sódico, la usnimicina y la usni-

dihidromicina en forma de polvo inhiben *in vitro* al *Mycobacterium 607 SmR*.

10. La mayor actividad *in vitro* de los polvos de usnimicina y de usnidihidromicina, en comparación con la actividad de los polvos de ácido úsnico, usnato sódico y clorhidrato de estreptomina frente al *Mycobacterium 607 SmR*, hace pensar en un posible sinergismo entre el ácido úsnico y la estreptomina, frente a dicho *Mycobacterium 607 SmR*.

SUMMARY

1. Sodium usnate is active *in vitro* against both penicillin sensitive and resistant strains of *Staphylococcus aureus*.

2. Sodium usnate is active *in vitro* against *Sarcina lutea*, *Bacillus licheniformis*, *B. mycoides* and *Streptococcus β -hemolyticus* and is inactive against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella 41*.

3. Sodium usnate is active *in vitro* against *Tricophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Torula utilis var. major* and *Saccharomyces cerevisiae*.

4. The presence in *Usnimycin* (1) of the usnic acid fraction has been demonstrated by its activity against *Tricophyton mentagrophytes* and also by treatment with ClH that separates the usnic acid from the base and then the usnic acid can be extracted by benzol or by acetone from which solvents the typical crystals of usnic acid can be obtained.

5. The presence of streptomycin in *Usnimycin* has been demonstrated by using *Usnimycin* as an stimulant for the growth of a *Escherichia coli streptomycin dependent strain* and also because *Usnimycin* is active *in vitro* against Gram negative bacteriae such as: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus. sp.* and *Klebsiella 41* which are not sensitive to usnic acid.

6. The presence in *Usnidihydromycin* (2) of the usnic acid fraction has been demonstrated by treatment with ClH that separates the usnic acid from the base and then the usnic acid can be extracted by benzol or acetone from which solvents the typical crystals of usnic acid can be obtained.

7. The presence of dihydrostreptomycin in *Usnidihydromycin* has been demonstrated because *Usnidihydromycin* is active *in vitro* against Gram negative bacteriae such as: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.* and *Klebsiella 41* which are not sensitive to usnic acid.

(1) *Usnimycin* is the name proposed by F. Bustinza to designate the precipitate that is formed when a water dissolution of sodium usnate is added to a water dissolution of a streptomycin salt such as the hydrochloride.

(2) *Usnidihydromycin* is the name proposed by F. Bustinza to designate the precipitate that is formed when a water dissolution of sodium usnate is added to a water dissolution of a dihydrostreptomycin salt such as the hydrochloride.

8. Usnic acid, sodium usnate and *Usnimycin* in powder form are active *in vitro* against *B. mycoides* and *Mycob. phlei*.

9. Usnic acid, sodium usnate, *Usnimycin* and *Usnidihydromycin* in powder form are active *in vitro* against *Mycobacterium 607 SmR*.

10. The greater activity *in vitro* of the powders of *Usnimycin* and *Usnidihydromycin* as compared with the activity *in vitro* of usnic acid, sodium usnate, and chlorhydrate of streptomycin in powder form against *Mycobacterium 607 SmR* makes one think in a possible synergistic effect of usnic acid and streptomycin and usnic acid and dihydrostreptomycin against *Mycobacterium 607 SmR* which is a streptomycin resistant strain.

Laboratorio de Fisiología Vegetal.
Jardín Botánico. Madrid (marzo 1951).

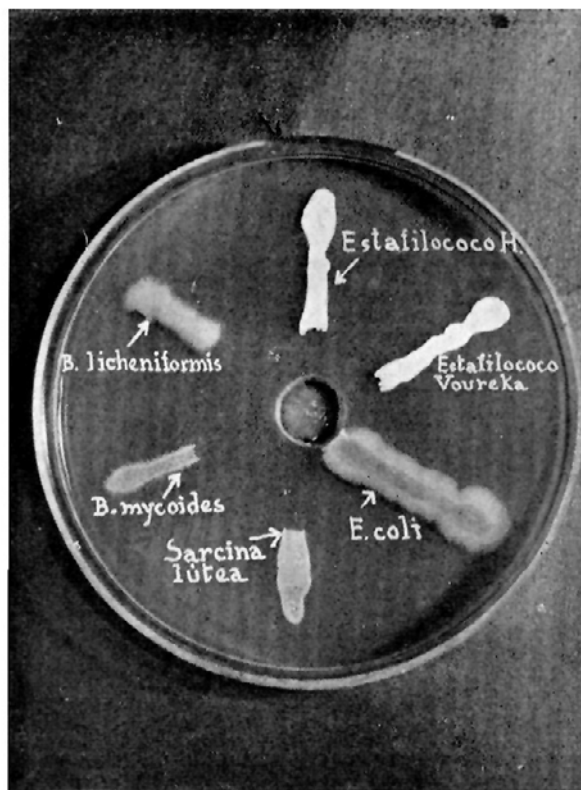


Fig. 1.

El pocillo central se ha llenado con disolución acuosa de usnato sódico al 1 por 1.000.

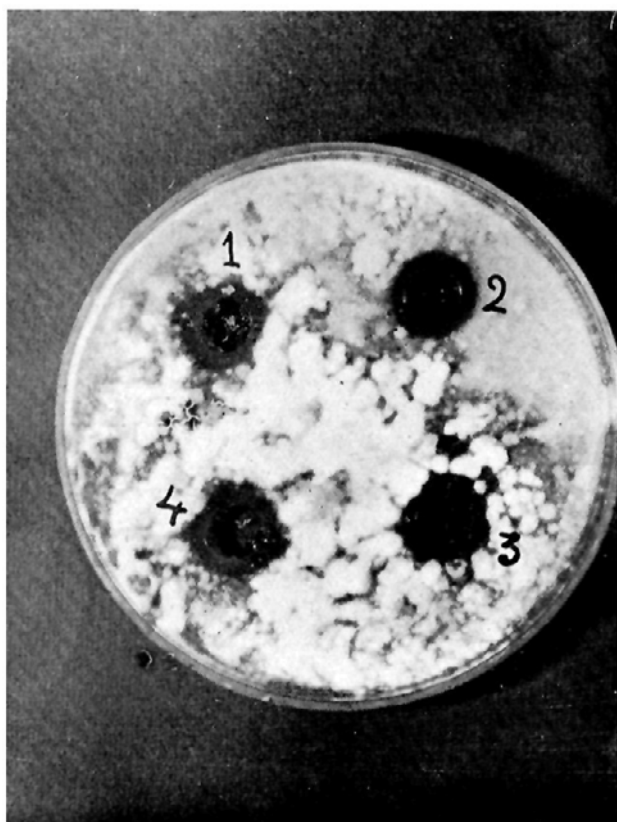


Fig. 2.

La placa se ha sembrado con *Tricophyton mentagrophytes*. En los pocillos se ha colocado disolución acuosa de ysnato sódico al 1 por 1.000.

Fotografía tomada a las 48 horas de incubación.

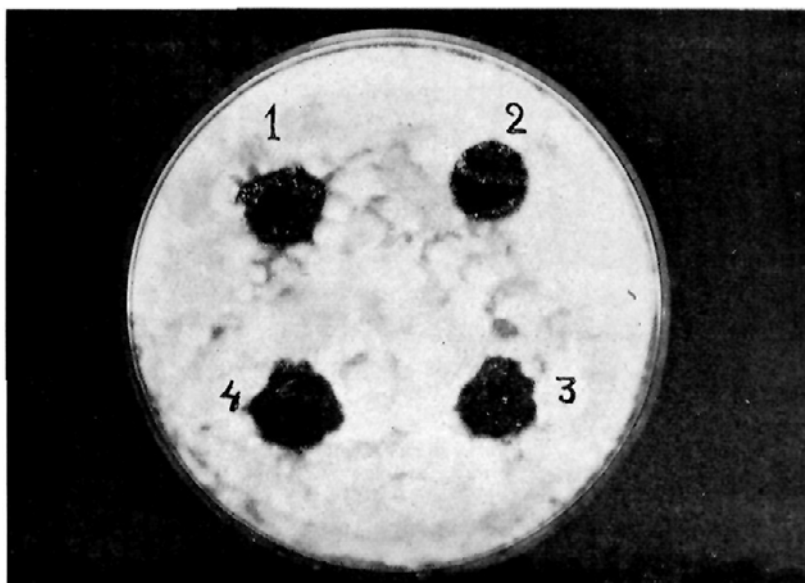


Fig. 3.

La placa se ha sembrado con *Tricophyton mentagrophytes*. En los pocillos se ha colocado disolución acuosa de usnato sódico al 1 por 1.000. Fotografía tomada a las 72 horas de incubación

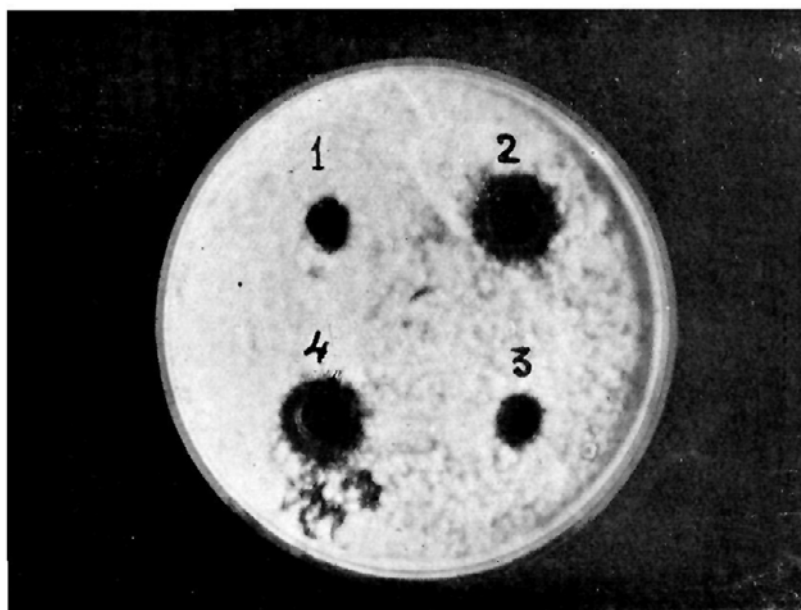


Fig. 4.

Placa sembrada con *Tricophyton mentagrophytes*. Los pocillos 1 y 3 se han llenado con disolución de estreptomina (clorhidrato) a la concentración de 125 u. por c. c. Los pocillos 2 y 4 se han llenado con suspensión de usnimicina en agua estéril a la concentración de 1 por 1.000. Fotografía tomada a las 48 horas de incubación.

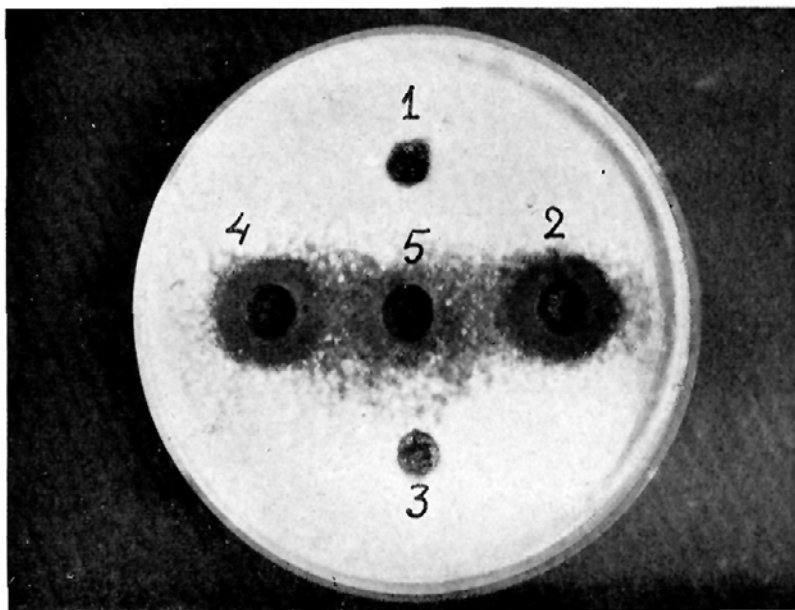


Fig. 5.

Placa sembrada con *Tricophyton mentagrophytes*. Los pocillos 1 y 3 se han llenado con disolución acuosa de clorhidrato de estreptomocina a la concentración de 125 u. por c. c. Los pocillos 2 y 4 se han llenado con disolución de usnimicina en propileno-glicol a la concentración de 1 por 1.000. El pocillo central (5) se ha llenado con propileno-glicol. Fotografía tomada a los tres días de incubación.

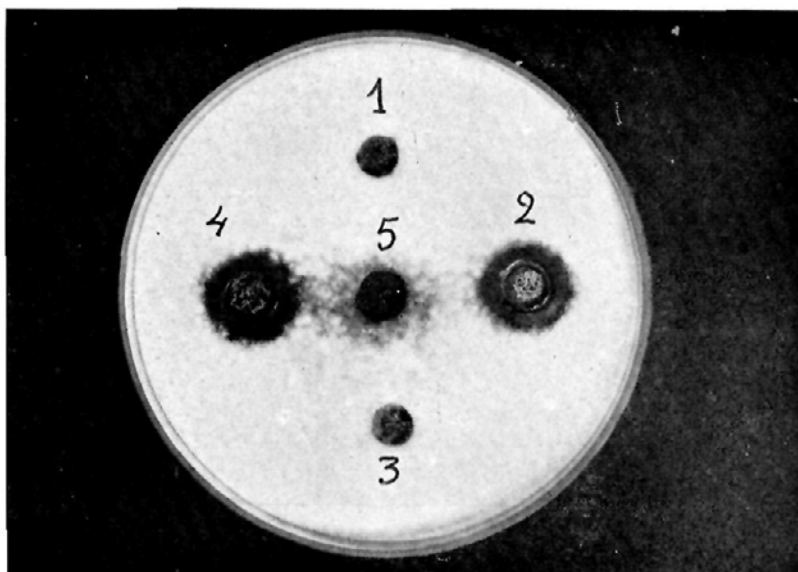


Fig. 6.

Corresponde a la misma experiencia de la fotografía 5, pero la fotografía ha sido tomada a los seis días de incubación.

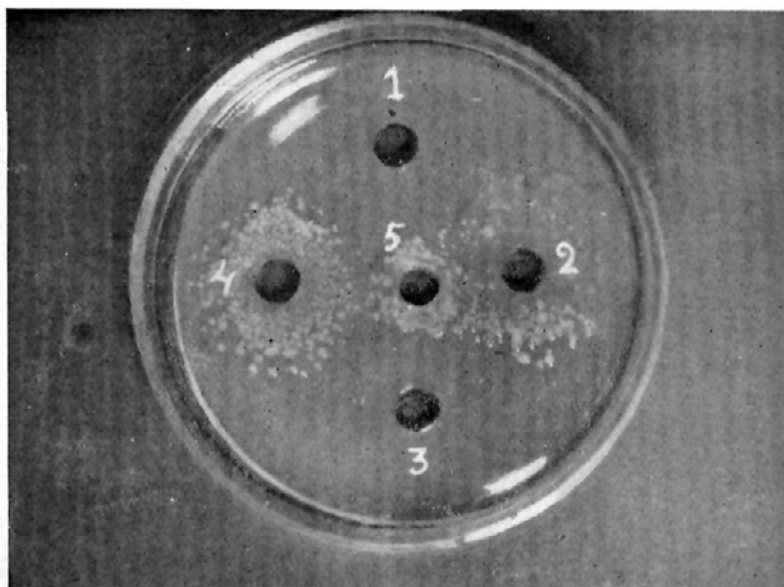


Fig. 7.

La placa se ha sembrado con una estirpe de *E. coli* estreptomycin dependiente. Los pocillos 1 y 3 se han llenado con disolución acuosa de usnato sódico al 1 por 1.000. Los pocillos 2 y 4 se han llenado con una dispersión fina de usnimicina en una disolución estéril de tampón fosfatos de pH 7. El pocillo 5 se ha llenado con una disolución de clorhidrato de estreptomicina en agua destilada estéril al título de 8 u. por c. c.

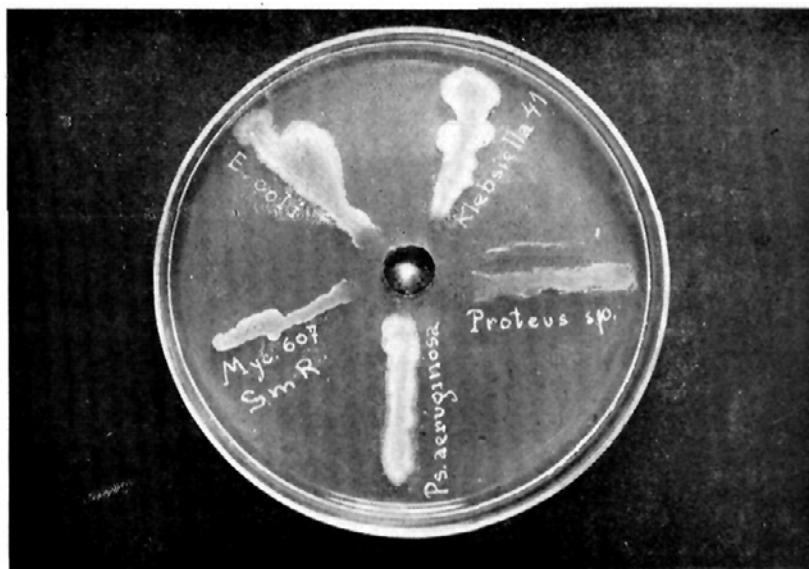


Fig. 8.

El pocillo central se ha llenado con suspensión de usnimicina al 1 por 1.000 en agua destilada estéril.

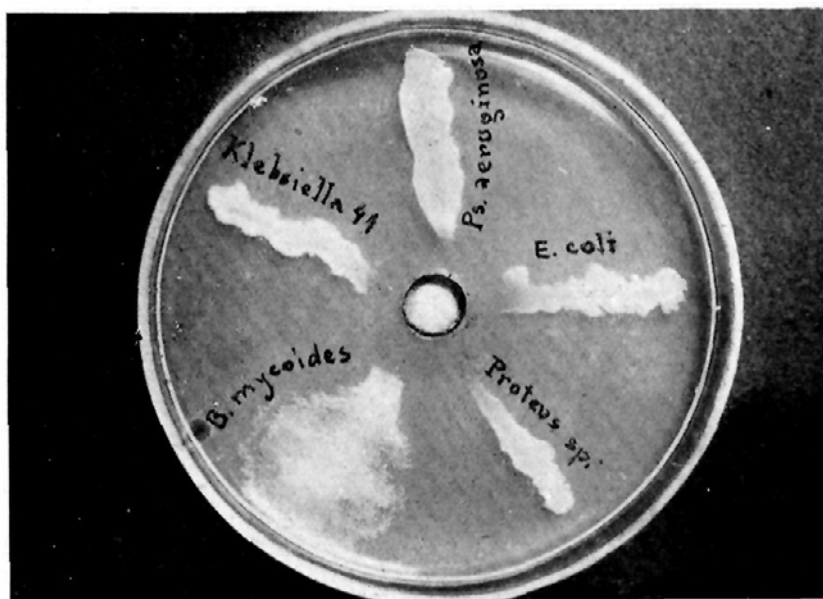


Fig. 9.

El pocillo central se ha llenado con suspensión de usnidihidromicina al 1 por 1.000 en agua destilada estéril.

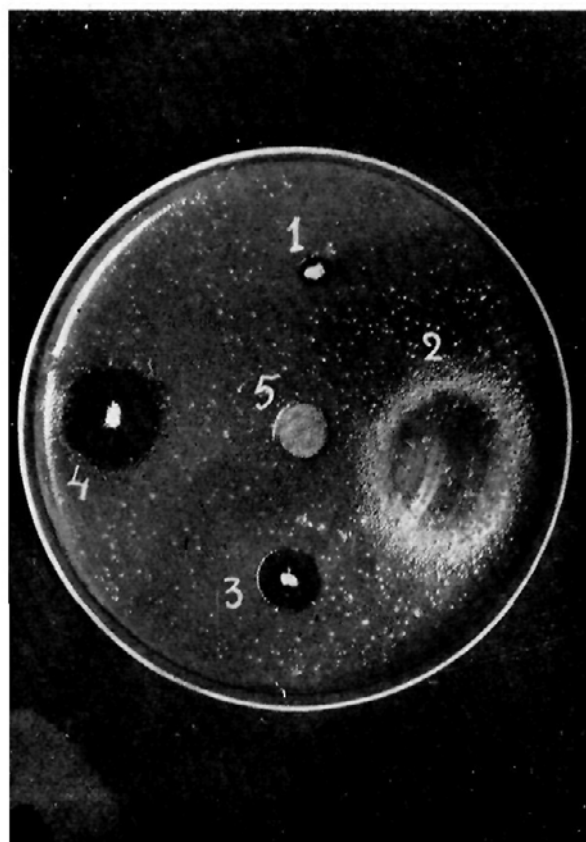


Fig. 10.

La placa se ha sembrado con *B. mycoides*. En 1 se ha puesto polvo de ácido úsnico, en 2 polvo de clorhidrato de estreptomina, en 3 polvo de usnato sódico, en 4 polvo de usnimicina.

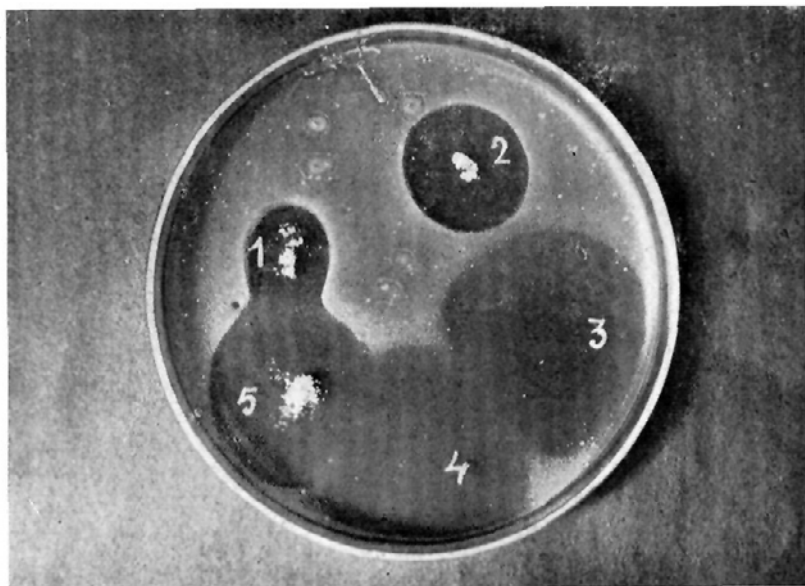


Fig. 11.

Placa sembrada con *Mycobacterium phlei*. En 1 se ha puesto polvo de ácido úsnico, en 2 polvo de usnato-sódico, en 3 polvo de clorhidrato de estreptomina, en 4 polvo de sulfato de neomicina, en 5 polvo de usnimicina.

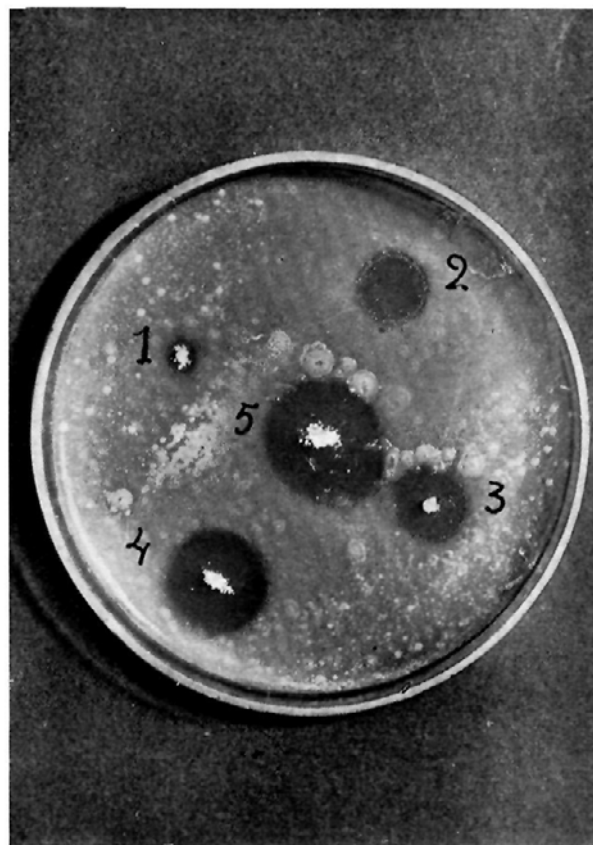


Fig. 12.

Placa sembrada con *Mycobacterium 607 SmR*. En 1 se ha puesto polvo de ácido úsnico, en 2 polvo de clorhidrato de estreptomicina, en 3 polvo de usnato sódico, en 4 polvo de usnimicina y en 5 polvo de usnidihidromicina.