

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E IDENTIFICACIÓN DE BENCENOACETAMIDA Y N-ISOPROPIL-2-(QUINOLIN-2-IL)ACETAMIDA EN EL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Streptomyces* sp. USB 0708

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND IDENTIFICATION OF BENCENOACETAMIDE AND N-ISOPROPYL-2-(QUINOLIN-2-YL) ACETAMIDE IN THE HEXANIC EXTRACT OF *Streptomyces* sp. USB 0708

Shailili Moreno^{1*}, Alfredo Rosas-Romero¹, Antonieta Taddei², Sara Pekerar¹, Julio Herrera¹
Universidad Simón Bolívar, (1) Departamento de Química, (2) Departamento de Biología Celular,
Apartado 89000, Caracas 1080A - Venezuela
*autor de contacto (e-mail: shaililiko@yahoo.com)

Recibido: 27/09/2011 - Evaluado: 18/11/2011 - Aceptado: 09/12/2011

RESUMEN

El objetivo de este estudio es evaluar la actividad antimicrobiana de la cepa *Streptomyces* sp. USB 0708 e identificar algunos constituyentes de su extracto orgánico. La cepa fue aislada de una muestra de suelo de Cumaná, Estado Sucre, Venezuela y se clasificó como *Streptomyces* de acuerdo a sus características morfológicas y bioquímicas. USB 0708 es activa contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. El extracto hexánico de USB 0708 conserva la actividad contra *Staphylococcus aureus*; su análisis por cromatografía gases acoplada a espectrometría de masas permitió identificar la bencenoacetamida, como constituyente minoritario; éste extracto fue separado y sometido a cromatografía de capa fina preparativa, obteniendo una subfracción de la que se logró identificar la N-isopropil-2-(quinolin-2-il)acetamida como constituyente mayoritario, posiblemente responsable de la actividad biológica observada.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the antimicrobial activity of strain *Streptomyces* sp. USB 0708 and identify some constituents in its organic extract. The strain was isolated from Cumaná, State of Sucre, and classified into the genus *Streptomyces* according to their biochemical and morphological characteristics. USB 0708 is active against *E. coli*, *B. cereus* and *S. Aureus*. The hexane extract showed activity against *S. aureus*, and the analysis by gas/mass chromatography showed the presence of bencenoacetamide, as a minor constituent. This extract was separated and partitioned using preparative thin layer chromatography, yielding a subfraction from which we identified N-isopropyl-2-(quinolin-2-yl) acetamide as main constituent, possibly responsible for the observed biological activity.

Palabras clave: acetamidas; *Streptomyces*; antibacterianos; metabolitos bioactivos
Keywords: acetamides; *Streptomyces*; antibacterial; bioactive metabolites

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han jugado un importante rol en la historia del descubrimiento de drogas, de hecho muchos de ellos han expresado actividad biológica y características estructurales únicas (Michael, 2006). Los trabajos de investigación realizados entre 1950 y 2000 permitieron el descubrimiento de 10 mil productos naturales derivados de fuentes microbianas. Los antibióticos descubiertos en este lapso se aislaron principalmente de especies del género *Streptomyces* -familia Actinomycetaceae- (Bérdy, 2005); estos microorganismos son conocidos como importantes productores de metabolitos secundarios bioactivos con gran diversidad estructural, los cuales son ampliamente usados en medicina, veterinaria, agricultura y otras áreas (Strohl, 2004). Por lo tanto, la búsqueda de cepas bioactivas de *Streptomyces* y de sus metabolitos secundarios, es un campo de investigación activo.

Muchos metabolitos aislados de *Streptomyces* presentan el grupo amida en su estructura. Por ejemplo, las acetamidas participan en los procesos biosintéticos de otras sustancias, como ocurre en *S. violaceus* que a través de la Indolacetamida, sintetiza auxinas en la superficie de plantas a las cuales se encuentra asociado simbióticamente (Manulis *et al.*, 1994). Posteriormente, se reportaron compuestos amídicos antitumorales manufacturados por varias especies de este género, así como antibióticos amídicos macrocíclicos producidos por *S. hygroscopicus* (Lewis, 2000). Recientemente, se han reportado nuevos compuestos bioactivos, del tipo imidas cíclicas y alifáticas, en extractos orgánicos de *Streptomyces* sp. (Cheenpracha *et al.*, 2009); Algunos autores reportan el grupo amida asociado a anillos aromáticos, como benzamidas y quinazolininas aisladas de una cepa de *S. tanashiensis*, que además son usadas como agentes terapéuticos contra enfermedades relacionadas a apoptosis excesiva (Guodong *et al.*, 2011); otros investigadores aislaron el 4-fenil-1-naftil-fenil acetamida de *Streptomyces* sp. DPTB16 (Dhanasekaran *et al.*, 2008), y de una cepa de *S. olivaceiscleroticus* (Houssam, 2009); esta fenil acetamida es un potente antifúngico que muestra actividad contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Mucor* sp. y *Penicillium* sp.

Estos antecedentes despertaron interés en la búsqueda de metabolitos bioactivos producidos por cepas autóctonas. En esta investigación se reporta la actividad antibacteriana e identificación de acetamidas en el extracto hexánico de *Streptomyces* sp. USB 0708, proveniente de una zona costera de Cumaná (Estado Sucre, Venezuela). La cepa forma parte de una colección de microorganismos bioactivos previamente aislados y clasificados (Moreno *et al.*, 2011); el trabajo se inicia con el cultivo de la cepa en medio líquido y extracción del sobrenadante con n-hexano; posteriormente se fracciona el extracto con cromatografías preparativas biodirigidas por pruebas de actividad antibacteriana y antifúngica, para finalmente identificar y caracterizar compuestos constituyentes del extracto, aplicando análisis espectroscópicos y espectrométricos convencionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del microorganismo

La cepa de *Streptomyces* sp. USB 0708 se aisló de una muestra de suelo colectada en Cerro Colorado (Parroquia Altigracia, Municipio Sucre, Cumaná, Estado Sucre) usando la técnica de aislamiento de cultivos axénicos en medio ISSA (Inorganic Salt Starch Agar) (Taddei *et al.*, 2006), dicha cepa está disponible en la colección de microorganismos del laboratorio de microbiología de la Universidad Simón Bolívar (USB) (Moreno *et al.*, 2011). La identificación a nivel de género se llevó a cabo previamente mediante sus características bioquímicas (Korn-Wendisch & Kurtzner, 1992), morfológicas (Locci, 1989) y por comparación estadística con cepas reportadas en la literatura (Kaufman & Rousseeuw, 1990).

Fermentación y Obtención del extracto

USB 0708 fue inoculada agregando dos pedazos de 2 cm², de su cultivo sólido en agar ISSA, en 250 mL de medio líquido Mueller-Hinton MH), contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 mL (8 fiolas). La incubación se

llevó acabo en un agitador orbital (Certomat BS-1) a 180 rpm y 28°C por 96 h. Un volumen total de 2 L fue filtrado sobre lana de vidrio, luego el sobrenadante fue extraído con 4 L de n-hexano (Fisher Scientific, grado HPLC). La fase orgánica (MH 0708) fue concentrada por evaporación a presión reducida, a 35°C.

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana, del extracto y de las fracciones, fue determinada mediante la técnica del antibiograma o sensibilidad bacteriana por difusión en discos (Bauer *et al.*, 1966). Se utilizaron las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579); las cepas Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); las levaduras *Candida tropicalis* (MLDM 372) y *Candida albicans* (MLDM 348), obtenidas de la "Micoteca Lorenzo De Montemayor", USB; y los patógenos *Fusarium oxysporum* (MLDM 343) y *Aspergillus flavus* (MLDM 407/p196A). Se utilizó un blanco de solvente y se emplearon blancos de sustancias antibióticas y antifúngicas comerciales, según el bioensayo y el microorganismo patógeno utilizado.

Fraccionamiento del extracto

Al concentrar el extracto hexánico de MH 0708 por evaporación a presión reducida, precipita un sólido bajo la forma de agujas blancas (hs) que asientan casi de inmediato, y fue filtrado al vacío. El sobrenadante es un líquido amarillo (hl).

Purificación por Cromatografía de capa delgada a escala preparativa (CCDP)

Sobre una placa de CCDP de gel de sílice con 0.25 mm de espesor se inyectó, con una micropipeta capilar de vidrio (1 µL), el sólido hs disuelto en cloroformo. La zona de inyección fue observada bajo luz UV revelando una fluorescencia morada (a UV₂₅₄) y una intensa fluorescencia verde en los bordes (a UV₃₆₅). La separación se desarrolló empleando como fase móvil acetato de etilo (AcOEt), con un recorrido de 15 cm. El gel de sílice localizado en cada señal observada bajo lámpara de UV, fue raspado con una espátula metálica e introducido en una columna pequeña, con capa de lana de vidrio previamente colocada, se filtró por gravedad con dos volúmenes (V) de AcOEt, donde V representa el volumen que ocupa el gel de sílice dentro de la columna. El eluato se recogió en un bial a la salida de la columna. Las fracciones obtenidas de esta manera se evaporaron al vacío en un desecador y se rotularon hs1 hasta hs4 en orden descendente con respecto a su valor de R_f. El componente principal de esta fracción se concentra en hs1 (R_f 0,61), las subfracciones restante contienen cantidades minoritarias y decrecientes de este compuesto y otras impurezas a muy baja concentración. Las cromatografías de capa delgada analíticas de hs1 en diferentes sistemas de solventes sugieren la presencia de un solo compuesto en la muestra.

Identificación y caracterización de compuestos

Las subfracciones fueron analizadas por cromatografía de gases con detector de masas (CG/EM) en un cromatógrafo de gases HP5890 Serie II, con capacidad para dividir o no la inyección, acoplado a un espectrómetro de masas HP5971A, con fuente de ionización por impacto electrónico con energía de ionización de 70 Ev. Los espectros de infrarrojo (FT-IR) se realizaron en un espectrofotómetro con transformada de Fourier, BRUKER Tensor 27. Los espectros uni y bidimensional de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en un Espectrómetro BRUKER Avance-500. Los análisis de espectrometría de masa de alta resolución (EM-AR) se realizaron en un espectrómetro de doble enfoque, modelo JMS-AX505WA, marca JEOL, equipado con inyección directa por sonda. Adicionalmente, se utilizó un Fusiómetro Electrothermal equipado con un termómetro de 370°C y ± 1°C de apreciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de la cepa USB 0708

La cepa USB 0708 presenta características macro y microscópicas propias del género *Streptomyces* y estadísticamente es 60% similar a *S. bambergiensis*, este microorganismo es un productor de Bambermicina, antibiótico fosfoglicolípido conocido comercialmente como Flavomicina y es usado en nutrición animal y como promotor de crecimiento (para cerdos, aves de corral, conejos, becerros y ganado). Este metabolito presenta cuatro grupos amida en su estructura y actúa inhibiendo la reproducción bacteriana al intervenir en la biosíntesis de mureína, sustancia estructural de la pared celular de la bacteria, que al ser dañada desencadena la ruptura celular (Buchanan & Gibbons, 1974). Al evaluar su actividad antimicrobiana, USB 0708 inhibió el crecimiento de *E. coli* (53.1%); *B. cereus* (86.8%) y *S. aureus* (83.3%), como muestra de su efecto antibacteriano de amplio espectro.

Actividad antimicrobiana y análisis cromatográfico del extracto hexánico

El extracto hexánico de USB 0708 resultó activo contra *S. aureus* con un diámetro del halo de inhibición de 10 mm, este efecto aunque es menor al ejercido por el antibiótico comercial Sulphamethoxazole / trimethoprin (16 mm) es comparable al mostrado por Gentamicyn (10 mm), este resultado es importante tomando en cuenta que el extracto, a diferencia de los antibióticos, es una mezcla y no una sustancia pura en alta concentración. El análisis por CG/EM de este extracto (Fig. 1) muestra que está constituido por cerca de 23 compuestos, entre los que se identifica la Bencenoacetamida (Fig. 2) como constituyente minoritario (1.62% del área) con un 91% de certeza en la identificación. El cromatograma también evidencia la presencia de un compuesto mayoritario (65.31% del área) que aparece a un TR de 21.2min.

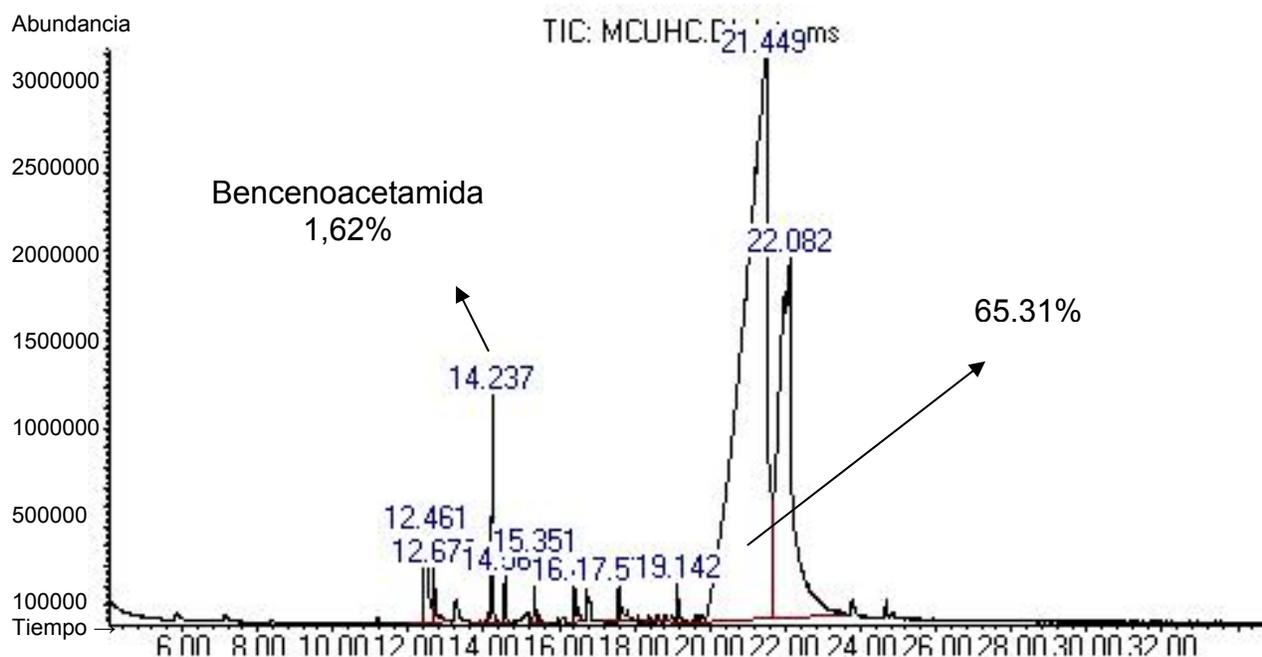


Fig. 1: Cromatograma de iones totales del extracto hexánico de USB 0708.

Aislamiento y Caracterización del Compuesto mayoritario

El compuesto mayoritario, correspondiente a la subfracción hs1, fue obtenido de la CCDP del sólido hs y presentó una temperatura de descomposición de 158°C. Su análisis por EM_AR (M^+ m/z 228.2390, calculada 228.1263) permitió establecer como fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O$ con ocho grados de insaturación. En el espectro de masas se observa una señal a m/e 91 correspondiente a la formación de ion tropilio, que es la ruptura más característica de los compuestos aromáticos ramificados (alquilbencenos) y ocurre por clivaje metílico y posterior expansión del anillo, o iones tropilio sustituidos, normalmente acompañados de un pico a m/e 65 debido a la pérdida de acetileno neutro del mismo (Silverstein & Webster, 1997). Este rompimiento y rearreglo del anillo aromático da origen a la serie de iones aromáticos: $C_5H_5^+$ (m/e 65), $C_4H_3^+$ (m/e 51) y $C_3H_3^+$ (m/e 39). La ausencia de la señal correspondiente al fragmento $NH_2=C=O$ (m/e 44) descarta la presencia de amida primaria en la estructura.

El espectro de FT - IR muestra una banda de absorción para grupo C=O conjugado (1643 cm^{-1}), señales de aromaticidad ($1532, 1495, 1454\text{ cm}^{-1}$), señales a 3090 y 2968 cm^{-1} correspondientes a enlaces C-H sp^2 y sp^3 respectivamente, también muestra señal de grupo NH a 3290 cm^{-1} , que debe tener un solo protón, ya que la presencia de amida primaria ($CONH_2$) fue descartada por el espectro de masas. Los espectros DEPT y ^{13}C RMN confirman la presencia de un metil ($\delta_C 20.02$); un metileno ($\delta_C 36.65$); un metino sp^3 ($\delta_C 30.10$); al menos cuatro metinos sp^2 ($\delta_C 129.16, 128.96, 127.46$ y 122.25); y cuatro carbonos cuaternarios ($\delta_C 162.22, 157.14, 136.45$ y 135.75). El espectro de RMN 1H muestra señales características de anillo bencénico sustituido a un $\delta_H 7,35$ (d, 5H); un grupo metileno ($\delta_H 3,85$, s, 2H); un grupo metino ($\delta_H 3,44$, m, $J = 6,9$, 1H); y dos metilos secundarios ($\delta_H 1,08$, m, $J = 6,9$, 6H) asociados al metino, lo que corresponde a un isopropilo confirmado por la correlación directa de este grupo de espines en el espectro COSY. Esta información permitió identificar a hs1 como N-isopropil-2-(quinolin-2-il)acetamida (Fig. 2).

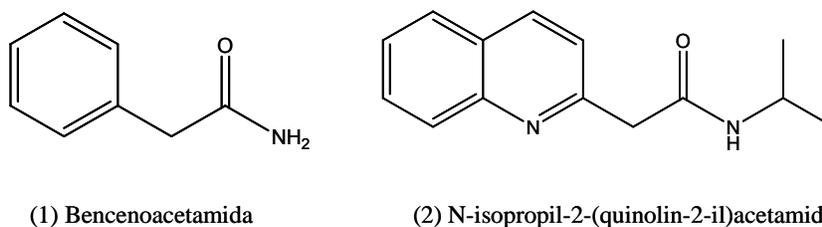


Fig. 2: Estructura de los compuestos amídicos identificados en *Streptomyces* sp. USB 0708.

Aunque no existen reportes de este compuesto (hs1) en *Streptomyces* spp., otros compuestos amídicos asociados a quinolina, con propiedades antimicrobianas y antivirales, han sido previamente aislados de *Streptomyces lavendulae* (Carsten, 2001), *Streptomyces flocculus* y otras cepas de *Streptomyces* y se especula que la quinolina está relacionada al metabolismo del triptófano, presumiblemente vía kinurenina o ácido kinurénico. Los compuestos quinolínicos son de gran interés debido a su amplio rango de actividades biológicas, a su mecanismo de acción y al estudio de diversas estrategias de síntesis utilizadas en su preparación (Meléndez & Kouznetsov, 2005). Esta quinolinacetamida proporciona una excelente oportunidad a los químicos orgánicos de desplegar su creatividad en la construcción de moléculas más complejas en busca de mejorar sustancialmente su actividad biológica.

CONCLUSIONES

La cepa *Streptomyces* sp. USB 0708 posee actividad antibacteriana de amplio espectro. De su extracto hexánico se identificó la bencenoacetamida, como constituyente minoritario, y la N-isopropil-2-(quinolin-2-il)acetamida como constituyente mayoritario, la cual posiblemente sea responsable de la actividad biológica observada. Este es el primer reporte de esta quinolinacetamida en especies del género *Streptomyces*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a FONACIT por el financiamiento a través del proyecto 2009000455, al Decanato de Postgrado y Decanato de Investigación y Desarrollo de la Universidad Simón Bolívar y al DAAD 227.104401.082.

REFERENCIAS

- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. & Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493 - 496.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.*, 58(1), 1-26.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore: The Williams and Willkins Company, pp. 747-829.
- Carsten, C. (2001). In: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. Volumen 15. Edited by Arnold Brossi. National Institutes of Health Bethesda, Maryland. Academic Press, Inc. (London), pp. 71-74.
- Cheenpracha, S., Zhang, H., Mar, A.M.N, Foss, A.P., Foo, S.H., Lai, N.S., *et al.* (2009). Yeast Glycogen Synthase Kinase-3 β Pathway Inhibitors from an Organic Extract of *Streptomyces sp.* *J. Nat. Prod.*, 72(8), 1520-1523.
- Chen, G., Gao, H., Tang, J., Huang, Y., Chen, Y. Wang, Y., *et al.* (2011). Benzamides and Quinazolines from a Mangrove Actinomycetes *Streptomyces sp.* (No. 061316) and Their Inhibiting Caspase-3 Catalytic Activity *in Vitro Chem. Pharm. Bull.*: 59(4), 447-451.
- Dhanasekaran, D., Thajuddin, N. & Panneerselvam, A. (2008). An Antifungal Compound: 4'Phenyl-1-naphthyl-phenylacetamide from *Streptomyces sp.* DPTB16. *Medicine and Biology*, 15(1), 7-12.
- Houssam, M.A. (2009). An Antifungal Agent Produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus*, AZ-SH514. *World Applied Sciences Journal*, 6(11), 1495-1505.
- Kaufman, L. & Rousseeuw, P.J (1990). *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*. EEUU: Wiley-Interscience, New York, pp. 235-236.
- Korn-Wendisch, F. & Kurtzner, H.J. (1992). The family Streptomycetaceae. The Prokaryotes. In *A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* Chapter 41. Berlin, New York, Springer-verlag, pp. 965-968.
- Lewis, J.R. (2000). Amaryllidaceae, muscarine, imidazole, oxazole, thiazole and peptide alkaloids, and other miscellaneous alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 57-84.
- Locci, R. (1989). Streptomycetes and related genera. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G Holt, eds.). Williams and Willkins, Baltimore, pp. 2451-2493.
- Manulis, S., Shafir, H., Epstein, E., Lichter, A. & Barash, I. (1994). Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces spp.* *Microbiology*, 140, 1045-1050.
- Meléndez, C. & Kouznetsov, V. (2005). Alcaloides Quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. *Universitas Scientiarum*, 10(2), 5 -18.
- Michael, S. (2006). In Search of Novel Antibiotics Using a Natural Product Template Approach. In *Combinatorial Synthesis of Natural Product-Based Libraries* Chapter 8 (B. Armed, ed). pp. 185-207.

Moreno, S., Taddei, A., Castelli, C., Llatas, I. & Rosas-Romero, A. (2011). Isolation, identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. From soils of the Sucre State, Venezuela. *Revista de Estudios Transdisciplinarios: 3* (1), <http://www.idea.gob.ve/publicaciones/RETvol3n1.pdf>

Silverstein, R.M. & Webster, F.X. (1997). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley & Sons. 6th edition. New York, EUA, pp. 512.

Strohl, W.R. (2004). Antimicrobials In: *Microbial Diversity and Bioprospecting* (Bull, A.T., Ed), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 336-355.

Taddei, A., Rodríguez, M., Márquez-Vilchez, E. & Castelli, C. (2006). Isolation and identificación of *Streptomyces* spp. From Venezuelan soils: Morphological and Biochemical studies. *Microbiological Research*, 161, 222-231.

