



CONTRIBUTO  
ALLA CONOSCENZA DEL MECCANISMO D'AZIONE  
DELL'ANTIBIOSI TRA MICROORGANISMI

(Nota riassuntiva) (\*)

G. B. MARINI-BETTOLO ED ENRICO DEL PIANTO

SUMMARY. — Postquam Auctores animadverterunt nonnullas ex antibioticis substantiis, quae notae sunt, et plerosque metabolismi microorganismorum fructus, esse reversibilia oxydo-reductionis systemata, experimenta ex chinonibus fecerunt, quibus perspexerunt fere omnes chinones inhibenti vi in *Staphylococcum pyonenen aureum* pollere.

L'antagonismo biologico tra microorganismi, e cioè la proprietà di alcuni funghi e batteri di inibire lo sviluppo di altri funghi e batteri, è già conosciuta da molto tempo in botanica ed in microbiologia [1], senza che ne sia stato approfondito il meccanismo di azione.

L'azione antibiotica, secondo WAKSMAN, può essere distinta in una azione diretta di un microorganismo sull'altro ed in un'azione indiretta dovuta ai prodotti del metabolismo di uno dei microorganismi. Esempi classici dell'antibiosi per azione diretta sono le osservazioni di PASTEUR, il quale riusciva a preservare gli animali da esperimento dall'infezione carbonchiosa, inoculando, insieme col bacillo del carbonchio, batteri banali.

Quanto agli esempi di antibiosi per azione indiretta, possiamo affermare che essi sono attualmente oggetto di numerosi studi, special-

---

(\*) Nota riassuntiva delle Memorie presentate dall'Accademico Pontificio Francesco Giordani il 7 aprile e l'8 ottobre 1945.

Lavoro eseguito nel Laboratorio di Chimica Organica dell'Istituto Chimico della R. Università di Roma.

mente dopo la scoperta della penicillina da parte di FLEMING [2] ed il suo impiego in terapia. Anzi i risultati oltremodo lusinghieri ottenuti con la penicillina hanno indotto in questi ultimi anni numerosi ricercatori ad estendere le attuali conoscenze sull'azione antibiotica presentata sia dai microorganismi che dai prodotti del loro ricambio. Sono state così successivamente scoperte l'actinomicina A e B, la tirotricina, la gramicidina, la piocianina, la gliotossina, la patulina, ecc., tutte sostanze ad azione batteriostatica anche elevata, ma che non sono ancora entrate nella pratica terapeutica perchè presentano, al contrario della penicillina, un'azione tossica sugli organismi superiori.

Solo di alcune di queste sostanze attualmente si conosce con esattezza la costituzione chimica; così ad esempio la piocianina e la olororafina sono semichinoni del gruppo della fenazina, la gliotossina è un derivato eterociclico azotato contenente anche zolfo.

Fino ad oggi il maggior numero di studi chimici sui prodotti del metabolismo dei microorganismi si deve al RAISTRICK, dell'Ospedale delle Malattie tropicali di Londra ed ai suoi Collaboratori, chimici e biologi, tra i quali si devono ricordare R. ROBINSON, A. E. OXFORD, H. HAWORTH e tanti altri ancora.

Esaminando e confrontando i risultati di tutti questi lavori, abbiamo osservato che i numerosi prodotti isolati si possono raggruppare, secondo la loro natura chimica, in sei gruppi distinti, e precisamente: in fenoli (e acidi fenolici), in chinoni (compresi gli antrachinoni), in derivati aliciclici, in derivati eterociclici (comprese le porfirine), in derivati dell'acido metiltetronico, in alcoli e acidi della serie alifatica.

Data la brevità concessa a questa nota non ci soffermiamo ad esaminare singolarmente tutte queste sostanze, ma facciamo rilevare che il maggior numero di esse appartiene al gruppo dei chinoni (spinulosina, fumigatina, citrinina, ecc.) ed ai derivati dell'acido  $\gamma$ -metiltetronico (acido carlico, acido penicillico ecc.)<sup>(1)</sup>.

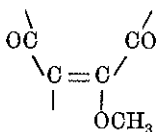
Eseguendo il confronto tra le formule di costituzione di tali sostanze abbiamo osservato come gran parte delle sostanze antibiotiche

---

(1) La completa bibliografia sull'argomento è raccolta nei lavori «in extenso» in corso di pubblicazione sulle «Commentationes Pont. Ac. Scien.».

conosciute nella loro struttura chimica, come pure alcuni prodotti del metabolismo dei microorganismi, appartengono a sistemi reversibili di ossido-riduzione, onde viene spontaneo chiedersi se l'azione antibiotica non possa essere, almeno in parte, legata a tale loro proprietà. Per questo motivo abbiamo rivolto la nostra attenzione allo studio delle sostanze organiche appartenenti a sistemi reversibili di ossido-riduzione, iniziandolo con quello dei chinoni.

Sui chinoni aveva già sperimentato A. Oxford [3], partendo dalla osservazione che la fumigatina, 3-ossi-4-metossi-toluenchinone, prodotto del metabolismo dell'*Aspergillus fumigatus*, possedeva una notevole azione batteriostatica. Per stabilire a quale aggruppamento dovesse attribuirsi tale azione, l'Oxford aveva eseguito prove comparative con quindici chinoni, giungendo alla conclusione che l'azione batteriostatica dei chinoni fosse da ascrivere al gruppo:



che è pure presente nell'acido penicillico. Questa ipotesi non spiega tuttavia il perchè dell'azione batteriostatica di altre sostanze (piocianina, olororafina, ecc.) nelle quali non è presente tale aggruppamento. Invece è interessante notare, come già abbiamo sopra accennato, che non solo i chinoni studiati da A. E. Oxford, ma molte altre sostanze batteriostatiche, che non rientrano nello schema precedente, come i derivati dell'acido  $\gamma$ -metiltetronico, la piocianina, la violaceina, ecc. costituiscono sistemi reversibili di ossido-riduzione.

Per questa ragione abbiamo intrapreso, sin dal gennaio 1945, una serie di esperienze sull'azione batteriostatica dei chinoni al fine di stabilire se effettivamente esista una relazione tra il potenziale di ossido-riduzione delle sostanze e l'azione batteriostatica e se altri chinoni possiedono azione batteriostatica ed in quale grado.

Le esperienze sono state condotte con ventotte chinoni contenenti nella loro molecola l'anello benzenico o i sistemi della naftalina, dell'antracene, del fenantrene e del crisene.

Abbiamo scelto, come primo teste batterico, lo *Staphylococcus pyogenes aureus* per le sue note qualità colturali, che ben si adattano alle

nostre esperienze. Questo infatti è un batterio aerobio e anaerobio facoltativo che tollera assai bene alti scarti di ph e che sviluppa molto rapidamente in terreni ordinari dando in brodo semplice, già nelle prime ore, un'intorbidamento omogeneo. Lo sviluppo delle colture è stato seguito comparando ad occhio nudo l'intorbidamento da esse raggiunto con quello delle colture di controllo.

Per seguire anche le minime variazioni di sviluppo, ci siamo serviti di un metodo nefelometrico, misurando al fotometro di Pulfrich l'intorbidamento raggiunto dalla coltura come valore di opacità relativa.

La semina è stata sempre eseguita con la stessa carica batterica [una goccia (=  $\frac{1}{24}$  di cc.) di brodocoltura di 24 ore]. Si è cercato di usare in tutte le esperienze brodo della stessa composizione e comunque esso è stato sempre controllato rispetto a chinoni per i quali avevamo già fissato il potere batteriostatico.

Alcuni chinoni sono stati sperimentati a diversi potenziali di ossido-riduzione, facendo variare il ph del mezzo. Nella tabella alla pagina seguente sono riassunti i dati sperimentali.

Si può osservare che, sebbene non vi sia uno stretto parallelismo tra l'azione batteriostatica dei chinoni sullo Stafilococco aureo ed il loro potenziale di ossido-riduzione, tuttavia quasi tutti i chinoni sperimentati possiedono, in vario grado, proprietà batteriostatiche, indipendentemente dalla presenza o meno del gruppo che secondo A. E. Oxford è caratteristico.

Queste osservazioni avvalorano l'ipotesi da noi espressa che le proprietà suddette siano da attribuire più che alla loro formula di costituzione, alla loro particolare capacità di ossido-riduzione.

Come si può notare il fenantrenchinone ed il crisenchinone che hanno caratteristiche chimiche molto simili, possiedono uguale potere batteriostatico e cioè inibiscono completamente fino a concentrazioni di 1/200.000, mentre fanno risentire ancora l'azione ritardante sullo sviluppo dello Stafilococco aureo a concentrazioni di 1/1.000.000

Dalla tabella inoltre appare che l'azione batteriostatica dei chinoni viene diminuita dall'introduzione di un gruppo  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  ed  $-\text{OH}$  e che ha inoltre influenza la posizione occupata dal gruppo  $\text{NO}_2$ .

Numero	COMPOSTO	Concentrazione	Azione inibitrice
1	1 — 4 — benzochinone . . . . .	1/10.000	notevolissima
2	idrochinone . . . . .	1/2000	completa a ph 8
3	acido bromanilico (2 — 5 diossi — 3 — 6 — — dibrochinone * . . . . .	1/5000	nulla
4	hromanile (tetrabromochinone)* . . . . .	1/85.000	»
5	2 — 3 — diclorochinone . . . . .	1/10.000	completa
6	cloranile (tetraclorochinone) . . . . .	1/30.000	nulla
7	2 — 6 — dimetossichinone . . . . .	1/50.000	notevolissima
8	2 — 5 — dimetossichinone . . . . .	1/50.000	»
9	timochinone (2 — metil — 5 — isopropil — — chinone) . . . . .	1/27.000	completa
10	3 — 6 — diossi — timochinone . . . . .	1/37.000	parziale
11	para — nitro — fenilchinone . . . . .	1/11.000	completa
12	meta — nitro — fenilchinone . . . . .	1/13.000	»
13	$\alpha$ — naftochinone . . . . .	1/35.000	»
14	3 — ossi — $\alpha$ — naftochinone . . . . .	1/15.000	parziale
15	5 — 8 — diossi — $\alpha$ — naftochinone . . . . .	1/9600	nulla
16	2 — 3 — dicloro — $\alpha$ — naftochinone . . . . .	—	—
17	2 — metil — $\alpha$ — naftochinone . . . . .	1/28.000	completa
18	2 — 3 — dimetil — $\alpha$ — naftochinone * . . . . .	1/25.000	»
19	lapacolo (2 — ossi — 3 amilen-naftochinone)	1/16.000	»
20	$\beta$ — naftochinone . . . . .	1/27.000	»
21	sale sodico dell'acido $\beta$ — naftochinone — — 4 — solfonico . . . . .	1/15.000	parziale
22	alizarina . . . . .	1/30.000	»
23	9 — 10 — fenantrenchinone ** . . . . .	1/200.000	completa
24	9 — 10 — fenantrenchinone — diossima **	1/30.000	»
25	sale di potassio dell'acido fenantrenchi- none — 3 — solfonico . . . . .	1/67.000	»
26	2 — nitro — fenantrenchinone . . . . .	1/100.000	»
27	4 — nitro — fenantrenchinone . . . . .	1/50.000	»
28	4 — ammino — fenantrenchinone . . . . .	1/80.000	»
29	9 — 10 — crisenchinone . . . . .	1/200.000	»

\* Non si è potuto sperimentare a concentrazione superiore a causa della scarsa solubilità del composto.

\*\* Le soluzioni alcoliche madri di tali composti danno intorbidamento se diluite con acqua per cui si deve ammettere che le concentrazioni effettive siano inferiori a quelle teoriche.

Abbiamo iniziato altresì lo studio sulle possibili reazioni che possono intervenire tra chinoni e ammino-acidi e tra chinoni e proteine per cercare d'interpretare il meccanismo d'azione di questi chinoni.

Dai nostri dati risulterebbe una certa relazione tra potere deidrogenante dei chinoni, quale era stato studiato da Langenbeck [5] e la loro azione batteriostatica.

In queste esperienze ci siamo limitati a prendere in esame i soli chinoni, ma desideriamo sin d'ora richiamare l'attenzione sul fatto che numerose sostanze di natura chinonica, pur non possedendo i gruppi  $=CO$  caratteristici dei chinoni, ma possedendo sempre la struttura degli orto e dei para-chinoni, (ad esempio i derivati coloranti del difenil-metano, trifenil-metano, ossazina, tiazina, diazina, acridina, ecc.) vengono usate per la loro azione batteriostatica sia in batteriologia che in terapia. Non è qui il caso di addentrarsi nell'esposizione di numerosi esempi; per accennare solamente ai composti più noti si ricorderà il verde malachite, il verde brillante, il violetto oristalli, che sono tutt'ora usati per la preparazione di noti terreni isolanti per il gruppo tifo-coli; il violetto di metile, la fuosina basica, la pironina, la tionina, che vengono usate per la prova batteriostatica delle brucelle; il bleu di metilene, la cui azione antisettica è ben nota in terapia; ecc.

Molti altri esempi si potrebbero qui citare, ma su questo argomento torneremo in successivi lavori nei quali ci proponiamo di esaminare altri gruppi di composti costituenti anche essi sistemi reversibili di ossido-riduzione funzionanti in determinati intervalli di potenziale, al fine di vedere se anche essi possiedono proprietà batteriostatiche.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] WAKSMAN S. A., «Chron. Bot.», VI, n. 7, 1940.
- [2] FLEMING A., «Brit. Med. Journ. ex. path.», 10, 226, 1929.
- [3] OXFORD A. E., citato da M. KIESE in «Klinische Wochens.», 22 agosto 1945.
- [4] FISCHER E. e SCHRAEDER. «Ber. deut. Chem. Ges.», 43, 525, 1910.  
COOPER E. A. e NICHOLAS S. D., «Journ. Ind. Chem.», 43, 59, 1927.  
GULLAND J. M., «Biochem. Journ.», 26, 32, 1932.  
HILPERT S., «Biochem. Zeit.», 166, 71, 1925.
- [5] LANGENBECK W., «Ber. deut. Chem.», 75, 1483, 1942.