

PENICILINA

ESTUDO GERAL E APLICAÇÃO EM TERAPÊUTICA

HASSIB ASHCAR

Assistente do Diretor do Instituto Adolfo Lutz

ÍNDICE

INTRODUÇÃO

	Págs.
I — ASSOCIAÇÕES E ANTAGONISMOS MICROBIANOS	34
SIMBIOSE	34
METABIOSE	35
ANTIBIOSE	35
Substâncias antibióticas	38
Descoberta da penicilina	41
II — CARACTERES MORFO-BIOLÓGICOS DO <i>PENICILLIUM NOTATUM</i>	
ORIGEM E POSIÇÃO SISTEMÁTICA DO <i>P. NOTATUM</i>	44
CONDIÇÕES DE CULTIVO	44
EXAME MACROSCÓPICO DAS CULTURAS	45
EXAME MICROSCÓPICO DAS CULTURAS	46
CARACTERES BIOQUÍMICOS	47
AÇÃO PATOGENICA	48
CULTURAS SÉCAS DO <i>P. NOTATUM</i>	49
CULTURAS DE <i>P. NOTATUM</i> PARA PRODUÇÃO DE PENICILINA	50
III — PRODUÇÃO DE PENICILINA	56
CONSIDERAÇÕES GERAIS	56
MEIOS DE CULTURA	57
Influência da água	58
Influência dos sais minerais	59
Influência da fonte de carbono	61
Influência da fonte de nitrogénio	62
Composição e preparo dos meios	66
PRODUÇÃO POR CULTIVO EM SUPERFÍCIE	67
Recipientes para produção de penicilina	69
Influência da temperatura	71
Influência do pH	72
Influência do tempo de cultivo	73
Influência das radiações	74
Influência dos gases: CO ₂ , O ₂ e H ₂	74
Influência de outras substâncias	75
Importância da pigmentação do meio	76
PRODUÇÃO POR CULTIVO SUBMERSO	77
PRODUÇÃO EM MEIOS SÓLIDOS E SEMI-SÓLIDOS	81
EXTRAÇÃO DA PENICILINA	82
Extração por solventes orgânicos	83

	Págs.
pelo acetato de amfía	87
pelo clorofórmio	90
pelo álcool n-butílico	90
Extração pelo carvão animal	91
Extração pelo acetato de celulose	93
PURIFICAÇÃO DA PENICILINA	94
Cromatografia	94
Redução pelo amálgama de alumínio	97
Obtenção dos sais da penicilina	98
SECAGEM DA PENICILINA	98
IV — CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA PENICILINA	102
SAIS DA PENICILINA	102
PENICILINA X	103
DERIVADOS DA PENICILINA	104
Ésteres da penicilina	104
Penicilamina	104
Ácido penicílico	105
V — PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA PENICILINA	106
ASPECTO	106
SOLUBILIDADE	106
HIGROSCOPICIDADE	106
DIFUSIBILIDADE	107
FILTRABILIDADE	107
PROPRIEDADE ANTILUMINESCENTE	108
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH	108
SUBSTÂNCIAS QUE INATIVAM A PENICILINA	109
Inativação pela penicillinase	110
VI — DOSAGEM DA PENICILINA	113
CONSIDERAÇÕES GERAIS	113
DESIGNAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	114
UNIDADE OXFORD	115
MÉTODOS DE DOSAGEM	116
Métodos qualitativos	116
Provas com o cogumelo em crescimento	117
Método da goteira em placa	117
Método da cavidade em placa	118
Métodos quantitativos	118
Método do cilindro em placa	119
Preparo do meio de cultura	121
Bactérias de prova (Inoculum)	122
<i>Staphylococcus aureus</i>	122
<i>Bacillus subtilis</i>	124
Cilindros	126
Fatores que influem no método	129
Preparo das placas para dosagem	130
Preparo das amostras para dosagem	131
Preparo do padrão	132
Preparo da curva padrão	133
Medida das zonas de inibição	135
Leitura dos resultados	137
Métodos das diluições seriadas	138
Em placas	138
Em tubos	138
Processo de Schmidt e Moyer	141
Processo de Fleming	143
Processo de Rammelkamp	146
Método turbidimétrico	148

	Págs.
	149
	150
VII — ANÁLISES DE CONTRÔLE DA PENICILINA	151
DOSAGEM DA ATIVIDADE	152
PROVA DE PIROGÊNIO	156
PROVA DE INOCUIDADE	157
DETERMINAÇÃO DE UMIDADE	157
PROVA DE ESTERILIDADE	157
VIII — PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DA PENICILINA	163
MODO DE AÇÃO DA PENICILINA	164
Interferência sobre o metabolismo microbiano	167
Alterações da morfologia e divisão das bactérias	170
PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS	171
Bacteriolítica	171
Bacteriostática e bactericida	172
DEMONSTRAÇÃO DE INIBIÇÕES BACTERIANAS	175
ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS	177
<i>Hemophilus</i>	178
<i>H. influenzae</i>	178
<i>H. pertussis</i>	179
<i>H. ducreyi</i>	180
<i>Corynebacterium acnes</i>	180
<i>Listerella</i>	180
<i>Streptococcus</i>	181
PURIFICAÇÃO DA POLPA VACÍNICA	181
IX — ESTUDO FARMACOLÓGICO DA PENICILINA	183
PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	183
TOXICIDADE DA PENICILINA BRUTA	183
TOXICIDADE DA PENICILINA PURIFICADA	184
Toxicidade dos sais da penicilina	187
Toxicidade dos ésteres da penicilina	187
Toxicidade sobre as células e tecidos	189
AÇÃO SOBRE OS APARELHOS CIRCULATORIO E RESPIRATÓRIO	191
ABSORÇÃO E ELIMINAÇÃO	192
Absorção pela via oral	195
Absorção pelas cavidades do organismo	197
MÉTODOS DE PROLONGAR A AÇÃO DA PENICILINA	197
Pelo retardamento da eliminação	198
Emprêgo do diodrast	198
Emprêgo do ácido p-aminohípicico	199
Pelo retardamento da absorção	199
Pelo uso de veículo oleoso	199
Pela vasoconstrição local	199
ASSOCIAÇÃO DA PENICILINA COM OUTRAS SUBSTÂNCIAS	201
Com as sulfonamidas	201
Com o ácido p-aminobenzóico	201
Com a albumina	202
Com efedrina e anestésicos	202
RESISTÊNCIA DAS BACTÉRIAS A PENICILINA	204
X — APLICAÇÃO DA PENICILINA EM TERAPÊUTICA	207
CONSIDERAÇÕES GERAIS	207
TERAPÊUTICA LOCAL PELA PENICILINA	213
Emprêgo da penicilina bruta	213
Emprêgo da penicilina purificada	214
Nos empiemas	215
Nas oftalmias	216

	Págs.
Nas infecções bucais	217
Nas mastoidites	217
Nas sinusites	218
TERAPÊUTICA SISTÊMICA PELA PENICILINA	218
Terapêutica das infecções estafilocócicas	218
Terapêutica das infecções estreptocócicas	221
Terapêutica das infecções pneumocócicas	224
Terapêutica das infecções gonocócicas	226
Terapêutica das infecções meningocócicas	229
Terapêutica das infecções por bactérias anaeróbias	230
Terapêutica das moléstias por protozoários	232
Terapêutica das moléstias por vírus	238
INDICAÇÕES E CONTRA-INDICAÇÕES DA PENICILINOTERAPIA	239
PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PENICILINA	242
Para injeção endovenosa	242
Para injeção intramuscular	242
Para aplicação tópica	242
POSOLOGIA	243
Modo de emprêgo	243
Dosagem	243
REFERÊNCIAS	246

PENICILINA

ESTUDO GERAL E APLICAÇÃO EM TERAPÊUTICA *

HASSIB ASHCAR

Assistente do Diretor do Instituto Adolfo Lutz

INTRODUÇÃO

A terapêutica das infecções bacterianas, que até poucos anos era essencialmente biológica, possuindo como principais recursos as vacinas e os sôros específicos, começou a sofrer extraordinária transformação, desde 1935, quando GERHARDT DOMAGCK publicou seu notável trabalho intitulado "Contribuições ao estudo da quimioterapia antibacteriana". Tendo demonstrado que a sulfamido-crisoidina curava a infecção estreptocócica experimental em camundongo, adquiriu êste autor o mérito de ter assinalado o marco inicial da atual era da quimioterapia antibacteriana. A partir desta data, o estudo dos compostos sulfonamídicos, sob os aspectos químico, microbiológico e terapêutico, assumiu tal vulto que, no dizer de SÍLVIO LAGO ¹⁶⁰ "a literatura atingiu proporções verdadeiramente notáveis em quase todos os países do mundo". Embora a sulfanilamida constituísse um poderoso recurso terapêutico contra as infecções estreptocócicas, meningocócicas, gonocócicas, pneumocócicas e outras, o seu emprêgo, infelizmente, não deixou de ocasionar acidentes tóxicos mais ou menos graves e até mesmo mortais. Os casos de intolerância à sulfanilamida e a sua ineficiência em certas infecções graves como a septicemia estafilocócica, fizeram com que os pesquisadores lutassem porfiadamente pela conquista de compostos menos tóxicos e de mais amplo poder antimicrobiano. Surgiram, então, novos derivados, como a sulfapiridina, o sulfatiazol e a sulfadiazina (sulfapirimidina). Êstes compostos embora se mostrassem mais ativos que a sulfanilamida, em certas infecções, também não eram destituídos de toxicidade.

(*) Trabalho laureado pela Academia Nacional de Medicina com o prêmio oficial "Academia" de 1945.

Independentemente dos importantes trabalhos que se realizavam no campo das sulfonamidas, numerosos pesquisadores tinham sua atenção voltada para substâncias antimicrobianas elaboradas por cogumelos e bactérias, procurando isolá-las e estudar suas propriedades a fim de verificar se poderiam ou não ter aplicabilidade em terapêutica.

O estudo dessas substâncias antibióticas tomou notável impulso após a maravilhosa descoberta de FLEMING, cujo trabalho básico⁸⁸ publicado em 1929, revelou ao mundo que um cogumelo, do gênero *Penicillium*, produz uma substância praticamente atóxica e de extraordinário poder bacteriostático sobre numerosos germes patogênicos.

Esta poderosa substância antibiótica foi, por FLEMING, denominada penicilina. Estudos posteriores, químicos, farmacológicos e terapêuticos revelaram que esta nova substância, uma vez purificada, realmente não é tóxica e apresenta, tanto "in vitro" como "in vivo", tão alto poder antimicrobiano que é incomparavelmente superior ao mais ativo composto sulfonamídico.

A sua poderosa ação bacteriostática, ainda, ao contrário das sulfonamidas, não é inibida em presença de pus, de tecidos autolisados ou do ácido p-aminobenzóico.

A atividade antibacteriana da penicilina, além de ser mais acentuada contra a maior parte dos germes sensíveis às sulfas, como os estreptococos, gonococos, pneumococos e meningococos, não é influenciada pelo número presente de bactérias. A penicilina é capaz de inibir mesmo na diluição de 1/25.000.000 o crescimento do *Staphylococcus aureus*, que geralmente não é sensível às sulfonamidas.

Por suas extraordinárias propriedades bacterio-inibidoras e terapêuticas, atribuíram-se à penicilina, entre outras, as expressões "yellow magic" e "the most potent weapon".

* * *

Queremos expressar nossa profunda gratidão aos Drs. J. P. de Carvalho Lima e Luís de Sales Gomes, que, na direção do Instituto Adolfo Lutz nos concederam tôdas as facilidades para realizarmos êste trabalho; e ao Dr. José de Toledo Melo que, tendo guiado nossos primeiros passos no campo da Microbiologia, nos orientou, também, na solução de vários problemas das presentes pesquisas.

Nossos agradecimentos aos Drs. Areia Leão e Amadeu Cury, do Instituto Osvaldo Cruz, por nos terem fornecido valioso material

de pesquisa e nos terem mantido a par do progresso de seus estudos inéditos, relativos ao assunto.

Ao Dr. Luís G. da Rocha Azevedo, muito agradecemos pelas preciosas sugestões e por ter em nós despertado e mantido o entusiasmo necessário para a elaboração dêste trabalho.

Nossa gratidão aos colegas e amigos do Instituto Adolfo Lutz, especialmente a D. Cendí de Castro Guimarães, chefe da Secção de Química Farmacêutica, pela inestimável colaboração e por nos ter orientado quanto à extração e purificação da penicilina; e a D. Lígia A. Penteado, Srs. Cassiodoro Moreno e Milton Xavier, pelo constante auxílio técnico prestado no decurso de nossos estudos.

ASSOCIAÇÕES E ANTAGONISMOS MICROBIANOS

Em a natureza, uma espécie microbiana raramente se encontra isolada de outras espécies, de modo que os microrganismos vivem "in natura" sob o aspecto de verdadeiras culturas impuras.

Essa vida em conjunto parece não ser simplesmente acidental, pois, entre os germes que vivem associados, há relações vitais que constituem fatos da maior importância biológica.

Quando os microrganismos, vivendo unidos, encontram uma finalidade que satisfaz os seus interesses e necessidades comuns, dizemos que vivem em simbiose. Temos um fenômeno de metabiose quando, numa associação microbiana, uma dada espécie retira maiores vantagens com ou sem prejuízo de outras.

A antibiose representa o antagonismo, a luta pela vida sustentada por uma espécie microbiana que procura aniquilar uma ou mais espécies concorrentes.

SIMBIOSE

Um dos exemplos mais interessantes de simbiose é dado pelos microrganismos responsáveis pelas modificações do leite, denominadas coalhadas. Assim, no conhecido "Yoghurt", coalhada dos Balkans, vivem em harmonia perfeita, o *Lactobacillus bulgaricus*, um estreptococo e uma levedura. No "Kefir", coalhada natural do Cáucaso, dá-se fenômeno semelhante, mas o lactobacilo é o *L. caucasicus*.

Nestas coalhadas parece que a levedura age regulando o teor em ácido láctico, cujo excesso é nocivo à vida do lactobacilo e do estreptococo.

Nessa verdadeira simbiose, as bactérias produzem o ácido láctico útil à vida da levedura que, metabolizando-o, impede o excesso de ácido no meio, garantindo a existência de suas associadas.

Como vemos, realiza-se, desta forma, um interessante trabalho de mútua beneficência.

Lembremos também a ação de certas bactérias produtoras de catalase que beneficiam o crescimento de outras espécies, formadoras de peróxido de hidrogênio, composto tóxico que é destruído por essa diástase, a medida que vai sendo produzido.²⁵⁷

METABIOSE

Entre os microrganismos encontram-se interessantes exemplos de associação metabiótica. Assim, certas bactérias nitrificadoras (*Nitrobacter*), não sendo capazes de oxidar diretamente a amônia, têm que contar com o nitrito produzido por outras nitro-bactérias (*Nitrosomonas* e *Nitrosococcus*).

Outro exemplo é encontrado entre certas leveduras do gênero *Saccharomyces* em associação com determinadas bactérias do gênero *Acetobacter*, em meio que contém açúcar.

A levedura, a partir dos açúcares, produz álcool que é aproveitado e transformado em ácido acético pelas bactérias que não são capazes de agir diretamente sobre o açúcar. Nesse caso, as bactérias não prestam o menor auxílio à levedura, à custa da qual se mantêm vivendo com ela em perfeita harmonia.

A metabiose é, por assim dizer, uma forma unilateral de simbiose, em que um só microrganismo é beneficiado.

Simbiose e metabiose são denominações convencionais que muitas vezes escapam aos limites determinados pela definição.

Da mesma forma, duas bactérias que na natureza vivem em simbiose podem, em condições experimentais, tornar-se antagônicas.

ANTIBIOSE

A antibiose, como já vimos, significa o antagonismo, a luta pela ânsia de não morrer, sustentada por um microrganismo que procura eliminar as espécies concorrentes.

Ao contrário da simbiose, o fenômeno da antibiose é muito mais freqüente entre os microrganismos e, especialmente nestes últimos anos, tem sido larga e minuciosamente estudado por inúmeros pesquisadores.

Em a natureza podemos encontrar relações antagônicas entre uma bactéria e outra, entre cogumelos e bactérias, entre bactérias e protozoários e assim por diante.

São exemplos nítidos de antibiose a produção de ácido láctico à custa da lactose pelos lactobacilos, e a elaboração de álcool a partir de açúcar pelas leveduras. Tanto o ácido láctico como o álcool são substâncias que impedem a vegetação e, segundo a concentração, podem produzir a morte de numerosas bactérias.

Um exemplo curioso seguido de antibiose encontra-se na associação, no leite, entre as bactérias lácticas e as proteolíticas.

A princípio, o excesso de ácido láctico produzido, sendo neutralizado, à custa das bases amoniacaes elaboradas pelas bactérias proteolíticas, garante vida melhor aos lactobacilos; depois, pelo acúmulo de ácido formado, as bactérias proteolíticas acabam sendo destruídas.

Há casos em que não se sabe qual é o agente da antibiose. Assim, o *Streptococcus lactis* impede o desenvolvimento do *B. subtilis*, não só no leite como em outros meios livres de açúcar, não se conhecendo, ainda, o mecanismo desta ação antibiótica. O mesmo foi observado, por TOLEDO MELO¹⁹³, entre certos lactobacilos e o *B. subtilis* semeados juntamente em leite.

As bactérias produtoras de ácido acético, à custa do álcool etílico, agem sobre as leveduras produtoras de álcool à custa de açúcar, não só pelo ácido acético produzido como também por influência de um fator ainda desconhecido.

Sabe-se, desde muito tempo, que os produtos do metabolismo de um microrganismo podem interferir seriamente sobre o desenvolvimento de outro.

Nos tempos de Pasteur já se havia observado que os animais com tuberculose eram mais resistentes que os sãos, à infecção pelo carbúnculo; posteriormente, foi demonstrado que também "in vitro" existe antagonismo entre os dois bacilos patogênicos.

EMMERICH⁸⁰, em 1900 foi quem primeiro isolou um produto de origem bacteriana, que inibia o crescimento de certos germes patogênicos.

A substância antibacteriana que êle denominou piocianase foi isolada da *Pseudomonas aeruginosa* (*B. piociânico*).

FROST, em 1904, fez estudo detalhado sobre o antagonismo entre certos germes do solo e outros patogênicos. Verificou que os saprófitas do solo produzem substâncias capazes de impedir o crescimento e até mesmo destruir bactérias patogênicas.

MÜHSAM²⁰³, em 1908, verificou que a piocianase impedia o crescimento do bacilo diftérico “in vitro” e obteve resultados satisfatórios, usando-a em casos clínicos. Pode-se considerar a piocianase como a primeira substância antibiótica usada em terapêutica.

VAUDREMER²⁹¹, em 1913, observou que bacilos da tuberculose humana perdiam o poder patogênico, após ficarem em contacto, durante 24 horas a 39°C., com um extrato filtrado de *Aspergillus fumigatus*.

Em 1929, FLEMING⁸⁸ observou que um cogumelo do gênero *Penicillium* era capaz de produzir, em cultivo, uma substância filtrável com acentuadas propriedades inibidoras sobre bactérias Gram-positivas como os estafilococos, estreptococos, pneumococos e alguns cocos Gram-negativos, gonococos e meningococos. O cogumelo produtor foi posteriormente identificado como sendo o *Penicillium notatum* (Westling). Em virtude da grande instabilidade da substância bacteriostática, FLEMING não conseguiu isolá-la e deu o nome de penicilina ao filtrado de uma cultura em caldo do cogumelo que isolou. Esta substância possuía ação seletiva, não inibindo o bacilo de Pfeiffer, o bacilo coli e outros. FLEMING demonstrou que essa substância, pelas suas propriedades bacteriostáticas seletivas, poderia ser usada como agente inibidor no isolamento de certas bactérias, especialmente do *H. influenzae*. Embora não a obtivesse em estado de pureza, verificando que grandes doses não eram tóxicas para os animais e a instilação da conjuntiva humana, repetidamente, não produzia efeitos irritantes, sugeriu o uso da penicilina para o tratamento local e administração hipodérmica em áreas infectadas por germes sensíveis.⁸⁸

Em 1932, CLUTTERBUCK, LOVELL e RAISTRICK modificaram o meio líquido de Czapek-Dox e, cultivando nêlo o *Penicillium notatum*, verificaram a produção de penicilina. Conseguiram, entretanto, isolar apenas um pigmento, a crisogenina, que não apresentava ação antibacteriana.

Em 1935, REID, embora não tivesse também conseguido isolar a penicilina, estudou algumas de suas propriedades, confirmando as observações de FLEMING.

Após a descoberta de FLEMING seguiu-se um período praticamente estacionário que se prolongou até 1937, quando WAKSMAN deu um grande impulso aos estudos sobre os antagonismos microbianos, procurando isolar as substâncias antibióticas.

SUBSTANCIAS ANTIBIÓTICAS

Denominam-se, imprecisamente substâncias antibióticas todos os produtos elaborados, principalmente, por bactérias e cogumelos e que apresentam propriedades antimicrobianas seletivas mais ou menos acentuadas. Estas substâncias diferem dos antissépticos e desinfetantes químicos comuns, por sua ação eletiva sobre determinadas espécies de microrganismos. A sensibilidade dos microrganismos depende da natureza ou da constituição da substância antibiótica. Como veremos adiante, certos germes sensíveis a uma determinada substância antibiótica não o são a outra. As substâncias antibióticas podem agir tanto sobre bactérias como sobre cogumelos ou protozoários. Sobre as bactérias elas podem agir como bacteriostáticas, bacteriolíticas ou bactericidas; sobre os cogumelos, fungistáticas ou fungicidas, segundo apenas impeçam o crescimento ou destruam os fungos.

WAKSMAN³⁰², no IV Congresso Geral da Sociedade de Bacteriologistas Americanos, realizado em Ohio a 28 de Dezembro de 1942, apresentou uma classificação das substâncias antibióticas conhecidas. Este autor, baseando-se na natureza química dessas substâncias, classificou-as nos 7 grupos seguintes:

- | | | |
|-------|------------------------------|--|
| 1.º — | Corpos lipóides | Piocianase, clavacina. |
| 2.º — | Pigmentos | Piocianina, prodigiosina, crisogenina, clororrafina, toxoflavina e actinomicina. |
| 3.º — | Polipeptídios | Gramicidina, tirotricina, lizozima, actinomicetina. |
| 4.º — | Compostos que contêm enxofre | Gliotoxina. |
| 5.º — | Compostos do tipo quinona .. | Citrinina, ácido penicílico, fumigatina e possivelmente penicilina. |
| 6.º — | Bases orgânicas | Estreptotricina. |
| 7.º — | Outros agentes | Fumigacina, etc. |

O próprio WAKSMAN³⁰² estudando o modo de ação das substâncias antibióticas sobre as bactérias, concluiu que elas agem interferindo sobre determinados processos metabólicos essenciais da bactéria, pelas seguintes formas:

1) Por oxidação de uma substância metabólica que deve ser reduzida no processo de nutrição da bactéria.

2) Combinando com o meio nutritivo ou com um dos seus componentes, tornando-o impróprio para a bactéria.

3) Competindo por uma enzima exigida pela bactéria para seu processo metabólico essencial.

- 4) Afetando a tensão superficial da bactéria.
- 5) Influindo sôbre o mecanismo da respiração.
- 6) Interferindo na reprodução da bactéria.

Baseando-se no grau de toxicidade, com relação aos animais, WAKSMAN³⁰² dividiu as substâncias antibióticas em 3 grupos:

- 1.º — Atóxicas ou de pequena to- Penicilina, citrinina, piocianase e acti-
xicidade nomicetina.
- 2.º — Fracamente tóxicas Gramicidina, tirocidina, estreptotricina
e gliotoxina.
- 3.º — Altamente tóxicas Actinomicina.

As possibilidades terapêuticas da maior parte dessas substâncias ainda não são bem conhecidas, pois, foram, em maioria, frutos de pesquisas recentes e seus estudos não estão ainda completos.

Teríamos que nos estender muito, e, fugiríamos do objetivo d'êste trabalho, se fôssemos relatar os estudos feitos sôbre cada uma dessas substâncias.

Queremos lembrar, entretanto, que estudos acurados têm demonstrado que uma dada substância antibiótica pode ser produzida por microrganismos diferentes, assim como um dado microrganismo pode produzir mais de um antibiótico.

Isto explica o fato pelo qual uma determinada substância antibiótica produzida por diversos microrganismos foi descrita pelos autores com denominações diferentes.

Assim, a clavacina elaborada pelo *Aspergillus clavatus*, WAKSMAN e col.³⁰¹; a claviformina isolada do *Penicillium claviforme* por CHAIN e col.⁴⁷; a clavatina produzida pelo *Aspergillus clavatus*, BERGEL e col.²¹ e a patulina isolada do *Penicillium patulum* por RAISTRICK e col.²²⁶ são atualmente, consideradas substâncias idênticas.

WAKSMAN e WOODRUFF²⁹⁴ isolaram do *Actinomyces antibioticus* a actinomicina, composta de 2 frações: A e B. A actinomicina A, dotada de alto poder bacteriostático e fraca atividade bactericida, e a actinomicina B, poderoso bactericida e fraco bacteriostático.

Do *Aspergillus flavus*, MCKEE e MC PHILAMY¹⁸⁹ isolaram uma substância semelhante à penicilina, que denominaram flavacidina; BUSH e GOTH³⁵ extraíram a aspergilina, nome que recomendam mudar para flavicina a fim de evitar a possível confusão com o ácido aspergílico isolado do mesmo cogumelo por WHITE e HILL.³⁰⁸

O *Aspergillus fumigatus* pode produzir a fumigacina³⁰³, a fumigatina¹⁰, o ácido helvólico⁴⁶ e a aspergilina²⁶⁹.

A spinulosina, que foi isolada do *Penicillium spinulosum* (RAISTRICK, H., 1938), foi também obtida de uma raça de *Aspergillus fumigatus*.¹⁰

DUBOS⁷³ obteve, do *Bacillus brevis*, a tirotricina que é composta de duas substâncias isoladas por HOTCHKISS e DUBOS¹⁴⁹: gramicidina e tirocidina. A primeira mais ativa sobre bactérias Gram-positivas e a outra sobre as Gram-negativas.

PRATT e OUTROS²²² obtiveram de culturas de *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa* uma substância que denominaram clorelina, ativa contra germes Gram-positivos e Gram-negativos: *St. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

CAVALLITO, BUCK e SUTER⁴³ isolaram do *Allium sativum* a alicina que, em diluições a 1:125.000, inibe o crescimento de numerosos germes Gram-positivos e Gram-negativos.

O *Penicillium notatum*, além de produzir a penicilina, pode elaborar outras substâncias antibióticas. COULTHARD e col.⁶⁷ obtiveram d'ele uma substância diferente da penicilina que, a princípio, denominaram penicilina A, e que depois, para evitar confusão, passaram a chamar de notatina.

KOCHOLATY^{157 e 158} isolou a penatina; ROBERTS e outros²⁴⁵ e Van BRUGGEN e col.²⁸⁹ isolaram a penicilina B.

A notatina, penatina, penicilina B, elaboradas pelo *Penicillium notatum* (Westling) são também consideradas idênticas, atualmente, diferindo entretanto da penicilina de FLEMING.

Substâncias antibióticas semelhantes à penicilina foram obtidas de diferentes espécies de cogumelos, por diversos pesquisadores; do *Aspergillus flavus*, por BUSH e GOTH³⁵; do *Aspergillus giganteus* Wehm, por PHILPOT²¹⁴; e do *A. parasiticus*, por COOK e LACEY⁶².

Além dessas espécies, FLOREY e col.⁹⁶ verificaram que os seguintes cogumelos também produzem antibióticos semelhantes à penicilina: *P. fluorescens* (6621); *P. rubens* Biourge (6643); *P. avelanum* Thom e Turesson (3751); *P. baculatum* Westl. (3956); e *P. turbatum* Westl. (6523). Os números entre parênteses são da "National Collection of Type Cultures".

ATKINSON¹⁵ examinou 68 culturas de *Penicillium* isoladas de fontes naturais, verificando que 18 eram produtoras de substâncias antibacterianas; dividiu-as em 2 grupos:

O 1.º grupo compreendendo as culturas isoladas dos meios de laboratório e que produzem, no meio de Czapek-Dox modificado, penicilina ativa contra o *Staphylococcus aureus*;

O 2.º grupo constituído por culturas isoladas de frutas e vegetais, produtoras de penicidina e que eram ativas contra a *Eberthella typhosa*.

A penicidina é uma substância antibiótica obtida por ATKINSON¹⁴ de um *Penicillium* cultivado no mesmo meio usado para produção de penicilina. Essa substância é ativa contra germes Gram-positivos e Gram-negativos, inibindo o crescimento do bacilo tífico na diluição 1: 100.000.

DESCOBERTA DA PENICILINA

A penicilina, o mais poderoso agente quimioterápico antibacteriano, como sabemos, é produzido por um cogumelo, *Penicillium notatum*. Sua descoberta, embora tenha sido descrita como puramente acidental, foi, na realidade, o resultado feliz de longos anos de estudo dos inibidores bacterianos por ALEXANDRE FLEMING.

Tendo sido discípulo de ALMROTH WRIGHT, FLEMING durante toda a sua carreira se interessou profundamente pelo estudo da destruição das bactérias pelos leucócitos.

Durante a guerra de 1914-1918, fazendo pesquisas sobre os ferimentos infectados, FLEMING ficara impressionado com a observação de que os leucócitos, possuindo elevado poder antibacteriano, eram, em geral, mais destruídos pelos antissépticos químicos do que as próprias bactérias. Tendo demonstrado que os leucócitos não possuem acentuado poder antibacteriano, concluiu que os antissépticos químicos comuns apresentavam pouco ou nenhum valor no tratamento desses ferimentos sépticos. Era natural, pois, que ele procurasse investigar substâncias antibacterianas que não afetassem os leucócitos ou os tecidos humanos. Tendo prosseguido seus estudos em 1922, FLEMING⁹³ descreveu um poderoso fermento antibacteriano encontrado na clara de ovo de galinha, e nos tecidos ou secreções humanas, ao qual denominou lisozima.

Seis anos mais tarde, em setembro de 1928, no Departamento de Inoculação do St. Mary's Hospital, de Londres, enquanto fazia seus estudos sobre a variação de colônias de estafilococos, FLEMING observou um fato surpreendente. Num lado de uma das placas, deixadas na temperatura do laboratório, havia crescido uma grande colônia de um cogumelo em volta da qual, até uma distância consi-

derável, as colônias de estafilocos, no dizer de FLEMING, foram "indubitavelmente lisadas".

A contaminação, em si, era cousa esperada, pois as placas haviam sido expostas ao ar para o exame microscópico das colônias.

O que surpreendera o pesquisador inglês fôra a apreciável área, ao lado do cogumelo, em que aparecia apenas a sombra das colônias de estafilococos que haviam crescido bem, revelando o aparecimento de um agente "bacteriolítico" elaborado pelo fungo.

Dado seu interêsse pelas substâncias antibacterianas, o exímio pesquisador, com fio de platina transplantou no meio de Sabouraud esporos da colônia do cogumelo contaminante. Examinada a morfologia e os caracteres culturais do cogumelo isolado, FLEMING⁸⁸ observou que era um *Penicillium* que se assemelhava muito ao *Penicillium rubrum* (Biourge) e que não era raro no ambiente do laboratório.

Posteriormente, o próprio FLEMING⁸⁹ verificou que o notável cogumelo se identificava com o *Penicillium notatum* (Westling).

Procurando pesquisar a substância inibidora, FLEMING semeou a cultura pura do *Penicillium* em caldo comum. O cogumelo cresceu na superfície do meio como uma camada com aspecto de feltro. Após uma ou duas semanas, o líquido do meio de cultura diluído de 500 a 800 vezes, impedia completamente o crescimento dos estafilococos. Verificou que a substância inibidora era filtrável e possuía também acentuadas propriedades bacteriostáticas sôbre numerosas bactérias patogênicas.

Demonstrando que a penicilina, inoculada em grandes doses, não era tóxica para animais, e quando aplicada, repetidamente, não irritava a conjuntiva humana, FLEMING abriu caminho para o desenvolvimento do seu emprêgo em terapêutica.

A esta grande descoberta, seguiu-se uma longa série de pesquisas de numerosos autores que estudaram, não só as propriedades da penicilina, como também os caracteres culturais do *Penicillium notatum* e as condições do seu crescimento em meios sintéticos.

As dificuldades encontradas para a extração e purificação da penicilina, em virtude de sua instabilidade, não permitiram que, durante vários anos, tivesse maior aplicação prática.

Sòmente em 1940, CHAIN, FLOREY e col.⁴⁸ conseguiram extrair do meio de cultura um pó pardo cuja solução aquosa era estável por muito tempo e, embora não fôsse uma substância pura, possuía um poder antibacteriano elevado.

No ano seguinte, na Inglaterra, ABRAHAM, CHAIN, FLOREY e outros³, conseguiram um método de produção, extração e purificação da penicilina em quantidade suficiente para permitir seu uso em casos clínicos. Demonstraram êsses autores que tal substância desenvolve uma ação terapêutica considerável em infecções experimentais nos animais e em infecções piógenas no homem.

FLOREY, em 1941, tendo ido aos Estados Unidos e conferenciado com membros do "National Research Council" e do "U. S. Department of Agriculture", despertou-lhes um grande interesse pelo estudo dos métodos de produção e purificação da penicilina. Imediatamente formou-se um núcleo de estudos em Peória, no "Northern Regional Research Laboratory", do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Com a cooperação do "Committee on Medical Research" do "National Research Council", FLOREY encorajou diversas firmas comerciais norte-americanas a empreender a produção em massa da substância tão almejada. Sem dúvida, a grande necessidade de agentes antibacterianos trazida pela guerra atual, contribuiu muito para a rápida produção industrial da penicilina.

Atualmente, algumas dezenas de laboratórios, nos Estados Unidos, Inglaterra e Canadá estão produzindo penicilina, em tal escala, que é suficiente para atender, pelo menos em parte, às necessidades de outros países que ainda não a produzem.

Embora tenha sido obtido o sal sódico em estado de pureza e estudadas suas propriedades químicas, a penicilina é ainda produzida por culturas do *Penicillium notatum*, enquanto numerosos pesquisadores lutam, porfiadamente, pela obtenção do produto sintético.

Recentemente, RAPER, ALEXANDER e COGHILL²³⁸ conseguiram obter uma substância idêntica à penicilina, partindo de culturas do *Penicillium chrysogenum*.

Segundo êstes pesquisadores, o *P. chrysogenum* "N. R. R. L. n.º 1951.B25" produz penicilina tanto por cultivo em superfície como por cultivo submerso. Diante disso, a penicilina deixa de ser um produto exclusivo do metabolismo do *Penicillium notatum*.

II

CARACTERES MORFO-BIOLÓGICOS DO *PENICILLIUM NOTATUM*

Ao iniciarmos nossos estudos em 1941, procuramos, primeiramente, fazer um estudo micológico do *Penicillium notatum*, certos de que o conhecimento detalhado da morfo-biologia do cogumelo era a primeira condição importante para o êxito na produção de penicilina. Estes estudos foram publicados em 1942¹² e reproduzidos, em parte, neste capítulo.

ORIGEM E POSIÇÃO SISTEMÁTICA

O cogumelo produtor da penicilina, isolado em setembro de 1928, por FLEMING, foi, a princípio, considerado como sendo *Penicillium rubrum* (Biourge); mas, posteriormente⁸⁹ foi identificado como *Penicillium notatum* (Westling), espécie que segundo THOM, tinha sido descoberta por WESTLING no hissôpo em putrefação, na Noruega.

A cultura com a qual trabalhamos foi enviada ao Instituto Adolfo Lutz, pelo Dr. CHARLES THOM, do "United States Department of Agriculture", com a indicação: 144-5767 do germe de Fleming. Este microrganismo é classificado no ramo Eumycetes (Engler e Gilg), classe Ascomycetes, ordem Plectascales, família Aspergillaceae, gênero *Penicillium*, espécie *P. notatum* (Westling).

CONDIÇÕES DE CULTIVO

O *penicillium notatum* é um cogumelo estritamente aeróbio crescendo na superfície dos meios líquidos estacionados. Cresce, também, em profundidade como cultura submersa, em meio líquido com suficiente aeração e agitação.

Desenvolve-se bem em temperatura ambiente (18°-28°C). ABRAHAM e col.³ para produção de penicilina, cultivaram-no com sucesso a 24°C.

Verificamos que em geladeira (+4°C) o seu desenvolvimento é muito lento, o mesmo acontecendo em estufa a 37°C. Não é um cogumelo exigente, pois cresce bem nos meios comuns de cultura. O meio de Sabouraud-glicose é satisfatório para os transplantes.

Observamos que no meio de Czapek-Dox, o extrato de levedura em concentração de 1% acelera o crescimento do *P. notatum*, e que o nitrito de sódio (0.3%) em substituição ao nitrato, prejudica acentuadamente o desenvolvimento.

EXAME MACROSCÓPICO DAS CULTURAS

EM MEIOS SÓLIDOS

Caracteres das colônias gigantes: Semeamos uma suspensão de esporos em frascos de Erlenmeyer com meio de Sabouraud-glicose e verificamos, após 5 a 7 dias de incubação, em temperatura ambiente (18°-26°C), o seguinte aspecto: desenvolvimento de uma colônia discóide com alguns centímetros de diâmetro. A face superior da colônia é seca, de aspecto rugoso e de natureza aveludada. Apresenta numerosos sulcos dispostos como raios de circunferência. Quanto à cor e ao aspecto, distinguimos 3 zonas concêntricas: central, intermediária e periférica. A zona central, de cor verde, é mais saliente; possui filamentos mais aéreos e apresenta, na superfície, gôtas amarelas que não molham a colônia. A zona intermediária, de cor branca, com nuances esverdinhas, possui filamentos menos aéreos que se continuam externamente por outros delicadíssimos, como franjas de 2 a 3 milímetros de extensão, aderentes ao meio e que constituem a zona periférica. As gôtas que freqüentemente aparecem na superfície da colônia formam-se à expensas da água do meio de cultura.

A face inferior da colônia é úmida, lisa, de cor branca-amarelada e se apresenta crivada ou fendida, principalmente quando existem gôtas na face superior ou aeróbia. A colônia elabora um pigmento amarelo que se difunde no meio de cultura. No meio de Sabouraud-maltose os caracteres das colônias são semelhantes aos já descritos, apenas com variação na tonalidade das cores.

No meio de Czapek-Dox modificado, com 2% de ágar, os caracteres das colônias se repetem, porém, o pigmento amarelo aparece melhor e se difunde facilmente pelo meio, terminando por corá-lo completamente de amarelo. A fotografia 1 mostra o aspecto de uma colônia gigante de *P. notatum* nesse meio de cultura.

EM MEIOS LÍQUIDOS

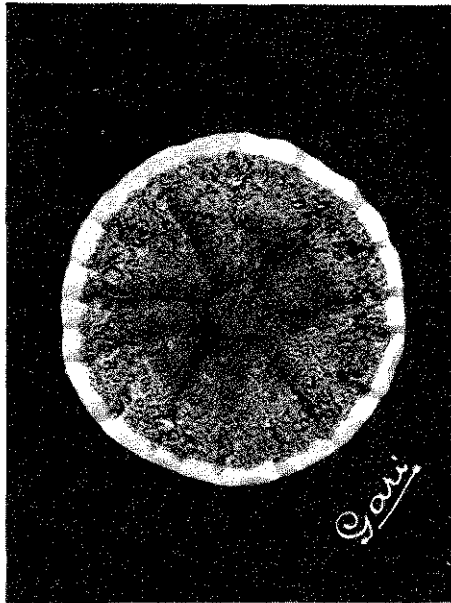
No meio de Czapek-Dox, modificado por CLUTTERBUCK, LOVELL e RAISTRICK²⁷ observamos todos os caracteres já descritos por ABRAHAM e colaboradores³. Em caldo Hottinger o cogumelo desenvolve-se mais lentamente, podendo-se, entretanto, acelerar o crescimento juntando-se a êsse meio 4% de glicose.

Nesses meios líquidos com mais de 2 centímetros de altura, além do crescimento na superfície com aspecto de feltro contínuo e compacto, o cogumelo forma no fundo do frasco um sedimento branco, de aspecto flocoso. O pigmento amarelo acima referido é elaborado pelo micélio superficial e rapidamente se difunde no meio, tornando-o, de incolor, amarelo-ouro. Algumas vezes a produção de pigmento é pequena e o meio fica levemente corado (amarelo pálido); outras vezes, a cor do meio torna-se amarelo-alaranjada, e até avermelhada, quando a produção do pigmento é muito intensa.

EXAME MICROSCÓPICO DAS CULTURAS

As culturas de 2 a 3 dias em temperatura ambiente apresentam micélio desenvolvido constituído por filamentos septados ou hifas retilíneas ou enroladas, anastomosando-se muitas vezes e emitindo ramificações laterais. O micélio dá, também, origem a filamentos férteis denominados conidióforos que sustentam os aparelhos reprodutores do cogumelo. O aparelho reprodutor, chamado conidiano, e que caracteriza o gênero *Penicillium* tem a forma de pincel ou vassoura. Ele é formado por um conidióforo, filamento fértil, que se divide em ramos: êsses por sua vez se subdividem dando rânulos ou, diretamente dão origem às métulas que sustentam células alongadas esporógenas denominadas fiálides ou esterigmatas. Essas últimas geram esporos assexuados chamados conídios que se dispõem em cadeias no seu próprio prolongamento. As fiálides, em número de duas, três ou mais, formam entre si ângulos agudos cujos vértices estão ligados às extremidades distais das métulas, constituindo assim os verticílios.

Observando-se o cogumelo após 5-7 dias de cultivo, verifica-se que aumenta muito o número de aparelhos conidianos, os quais então libertam grande quantidade de exosporos. A fotografia 2 mostra um aspecto do cogumelo nesta fase.



Fotografia 1

Colônia gigante de *Penicillium notatum*, 10 de dias
cultivo em meio de Czapek-Dox mod.

de cultivo, verificamos completa acidificação da glicerina. Nos dias seguintes, observamos a viragem do indicador para o lado alcalino nos tubos de dextrose, sacarose e maltose, enquanto que nos tubos de glicerina a acidificação permaneceu por tempo mais longo (3-4 semanas).

Foram negativas as provas de fermentação de: adonita, amido, arabinose, dextrina, dulcita, esculina, galactose, inulina, inosita, lactose, levulose, manita, rafinose, salicina, sorbita, trealose e xilose.

OUTRAS PROVAS

O cogumelo não acidifica nem coagula o leite, porém cresce bem nesse meio produzindo pigmento amarelo. Não liquefaz a gelatina. Reações de Voges-Proskauer e de vermelho de metila negativas (5 dias).

Não produz indol e não reduz nitratos a nitritos (10 dias).

AÇÃO PATOGENICA

A fim de nos certificarmos se a manipulação do *Penicillium notatum* poderia ou não oferecer perigo de infecção, fizemos inoculações em animais de laboratório. Preparamos uma suspensão de esporos lavando, com 10 cm³ de solução fisiológica, a superfície de uma cultura de 7 dias em meio sólido inclinado.

INOCULAÇÕES EM COELHOS

Injetamos 1 cm³ da suspensão de esporos na veia de um coelho. Noutro injetamos a mesma dose por via subcutânea. 10 dias após reinoculamos com doses idênticas. Não verificamos reações térmicas nem outros sintomas de moléstia, durante 3 meses de observação.

INOCULAÇÕES EM COBAIOS

Em 4 cobaios, cujos pesos variavam de 225 a 330 grs., injetamos 0,5 cm³ de suspensão de esporos, subcutaneamente, na virilha. Inoculamos também a mesma dose num 5.º cobaio, porém, intraperitonealmente. Um dos 4 primeiros morreu 24 horas após. A autópsia nada revelou, a não ser leve hiperemia no ponto de inoculação. 10 dias após, os 4 cobaios restantes foram reinoculados com as mesmas doses. Uma semana depois da 2.ª inoculação, morreu o cobaio injetado intraperitonealmente. A autópsia nada revelou. O exame

histo-patológico do pulmão, feito pelo Dr. João Montenegro, revelou apenas hiperemia e infiltração peri-vascular. O exame do fígado só demonstrou discreta infiltração peri-vascular. As culturas desses órgãos foram negativas para o cogumelo em estudo. Após 3 meses de observação, os 3 cobaios restantes continuavam normais. Sacrificamos um e semeamos fragmentos de fígado, pulmão e baço em meio de Sabouraud-glicose, resultando culturas negativas.

INOCULAÇÕES EM CAMUNDONGOS

Inoculamos 0,2 cm³ da suspensão de esporos em 10 camundongos de 20 a 25 grs., sendo em 5 por via intraperitoneal e, nos 5 restantes, por via subcutânea. 10 dias após foram reinoculados com as mesmas doses. Todos sobreviveram e não apresentaram quaisquer sintomas de moléstia, durante 3 meses de observação. Após esse tempo, sacrificamos 2 camundongos e retiramos fragmentos de fígado, pulmão e baço, que foram semeados em meio de Sabouraud-glicose, com resultados negativos.

CULTURAS SÊCAS DO *P. NOTATUM*

Tendo, em 1941, semeado o *P. notatum* no meio de Czapek-Dox com 5% de extrato de levedura, em frascos de Roux, e deixando-os expostos durante vários meses, à temperatura ambiente, obtivemos culturas sêcas. Estas apresentavam-se com o aspecto de pó escuro, côr de cacau, formado principalmente por esporos de morfologia normal e fragmentos de micélio ou hifas.

Essas culturas sêcas, transplantadas para os meios habituais, reproduziram o cogumelo com todos os seus caracteres morfológicos e bioquímicos, inclusive a propriedade de elaborar penicilina. Interessados, então, na obtenção de culturas sêcas para fins de conservação, começamos a usar um processo mais rápido de secagem. Após o crescimento do cogumelo no mesmo meio, distribuído em tubos de hemólise (1 cm³) obtivemos as culturas sêcas em poucos dias de permanência em estufa, a 37°C.

Fechados esses tubos à chama de um bico de Bunsen, conservamos em temperatura ambiente até o presente. 3 deles foram abertos dois anos após a secagem e semeados nos meios de Sabouraud e Czapek-Dox. De um dos 3 tubos não recuperamos a cultura, porém dos restantes obtivemos cultivos normais que revelaram elevada capacidade penicilinógena.

Atualmente, secamos as nossas culturas de *Penicillium notatum* pelo método líofilo empregado para vários fins.

A técnica que adotamos foi a seguinte: distribuímos, estérilmente, a cada tubo de hemólise, 0,5 cm³ de sôro normal de cavalo. A cada tubo transplantamos uma alça de platina carregada de esporos de uma cultura de 7 dias do *P. notatum* em meio inclinado de Sabouraud; (obtêm-se na alça uma quantidade grande de esporos, tocando-a previamente no sôro contido em cada tubo). Os tubos, com os esporos suspensos no sôro sanguíneo, são imediatamente refrigerados a -40°C, para a congelação que precede a secagem a vácuo. A refrigeração obtêm-se com misturas de neve carbônica e álcool. O fechamento dos tubos é feito após a secagem com bico de Bunsen. Essas preparações liofilizadas devem ser, preferivelmente, conservadas em geladeira.

Embora ainda não possuamos longa experiência, temos a impressão que êsse é um meio ótimo de secagem, pois obtivemos culturas ativas, sem exceção, de vários tubos fechados durante mais de um ano.

A secagem constitui um dos métodos mais eficientes para prevenir a degeneração das culturas do *Penicillium notatum*.

Como sabemos, de modo geral, todos os germes conservados por repiques em meios artificiais tendem à degeneração. Isto acontece também com o *P. notatum*, que, ao lado das modificações de aspecto cultural, apresenta diminuição e até perda da atividade penicilinógena.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ recomendam misturar os esporos de cultura ativa, com areia ou terra, em tubos, antes da secagem em baixa temperatura.

Êstes autores usam essas culturas sêcas como material de semeadura para produção de penicilina, pois julgam que as culturas assim conservadas mantêm a atividade penicilinógena, indefinidamente.

CULTURA DE *P. NOTATUM* PARA PRODUÇÃO DE PENICILINA

Em qualquer escala de produção de penicilina, experimental ou industrial, por meio de cultivo em superfície ou em profundidade, o êxito depende, primeiramente, da capacidade penicilinógena da cultura do *P. notatum*.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ verificaram que raças de *P. notatum* de origens as mais diversas, apresentam diferenças muito grandes na capacidade de produzir penicilina e afirmam que há mais possibilidade de se obter rendimento ótimo, começando a trabalhar com a melhor raça possível do cogumelo, do que iniciar com modificações do meio e das condições de cultivo. Para se alcançar uma produção ótima e constante deve-se, primeiramente, conseguir o seguinte:

1.º) Obter a cultura mais ativa de *P. notatum*, por isolamento e controle da atividade penicilinógena;

2.º) Manter a cultura selecionada em condições que impeçam a degeneração e a diminuição da capacidade elaboradora de penicilina.

OBTENÇÃO DE CULTURAS MUITO ATIVAS

Esta tarefa torna-se mais simples quando se dispõe de várias raças de *P. notatum* usadas por laboratórios diversos para produção de penicilina. Devemos lembrar, que a maior parte das culturas então utilizadas, derivam da raça 144-5767, original de Fleming.

Outras raças, entretanto, foram usadas e verificou-se que as variações da atividade são também devidas à melhor adaptação de uma determinada raça a um dado meio de cultura. Essas novas raças são conhecidas pelo nome do pesquisador ou do laboratório em que foram isoladas ou adaptadas.

Em nossa coleção possuímos numerosas raças de *Penicillium notatum*, entre as quais temos obtido melhores resultados com as seguintes: raça 144-5767, recebida do Dr. Charles Thom e cedida pelo Dr. J. P. Carvalho Lima, diretor do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo; raça Squibb 832, recebida do Dr. Ruy Vieira da Rocha, da Faculdade de Medicina de Porto Alegre; e a raça N. R. R. L. 1249. B21 do "Northern Regional Research Laboratory" de Peória, cedida pelos Drs. Areia Leão e Amadeu Cury, do Instituto Osvaldo Cruz, do Rio de Janeiro.

Podemos admitir que se consiga uma ou mais raças ainda com maior atividade do que as conhecidas, todavia, devemos lembrar que RAPER e COGHILL²³⁹ isolando 50 cogumelos azuis ou verdes, de frutas, de alimentos, do sólo, etc., verificaram que nenhum era o *P. notatum*. Em numerosas pesquisas feitas, apenas em um por cento encontraram o referido cogumelo.

KOCHOLATY¹⁵⁶ experimentando 5 raças de *Penicillium notatum* verificou, também, que elas variam muito na propriedade de produzir penicilina.

Diante do exposto, para se obter a melhor cultura possível, é aconselhável fazer provas de seleção com as melhores raças que pela origem ou caracteres morfológicos se supõem ativas. Identifica-se melhor, fazendo provas comparativas num meio favorável. Estas provas de seleção, para que tenham valor, devem ser feitas, pelo menos, em triplicata e são necessárias dosagens diárias, num período de 5 a 14 dias.

A pesquisa da capacidade penicilinógena só é valiosa quando as culturas são puras, e para se ter maior segurança disso é necessário fazer, previamente, o isolamento de colônias em placas ou frascos de ampla superfície com meio de Sabouraud ou outro adequado. Para esse isolamento, preferimos o meio de Czapek-Dox modificado, com 2% de ágar, por ser um meio claro, permitindo exame melhor da face inferior das colônias.

As colônias, isoladas em placa, podem apresentar caracteres culturais diferentes. Algumas esporulam abundantemente, com esporos de cor verde e outras quase não frutificam, apresentando micélio esbranquiçado de aspecto cottonoso.

CLUTTERBUCK e col., em 1932, já haviam isolado dois tipos de colônias e verificaram que somente as colônias verdes revelavam atividade penicilinógena, enquanto os tipos de "flobose" eram inativos.

Embora as raças ativas, em geral, produzam grande quantidade de esporos, há raças que esporulam pouco e revelam boa atividade.

Temos observado que a raça N. R. R. L. n.º 1249. B21, embora esporule menos que a raça Squibb 832, possui capacidade igual e às vezes superior de produção de penicilina por cultivo em superfície.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶, após uma série de experiências, chegaram à conclusão de que a capacidade de produzir penicilina não está associada a qualquer característica cultural das raças do *P. notatum*. Acham, entretanto, que sob o ponto de vista da produção de penicilina em larga escala, uma propriedade essencial é a esporulação intensa.

HANSEN, citado por NEGRONI e FISCHER²⁰⁷, fez interessantes estudos sobre esporulação, quanto a constituição genética.

Esse autor estudou 900 culturas, de isolamentos unicelulares, pertencentes a 30 gêneros diferentes de *Fungi imperfecti* esporulados, e verificou que 50% delas apresentavam, quanto à esporulação, uma constituição heterocariótica, contendo dois componentes fundamentais que denominou M e C. Mediante isolamentos contínuos, chegou a obter um tipo M puro, correspondente à cultura com predomínio do micélio vegetativo e esporulação mínima ou nula, e, um tipo C puro, caracterizado por produção abundante de esporos ou conídios.

NEGRONI e FISCHER²⁰⁷, partindo de 3 culturas de *P. notatum*, fizeram, de cada uma, numerosos isolamentos unicelulares, a fim de estudar a relação entre a capacidade de esporulação e a de produzir penicilina.

Verificaram que as culturas isoladas do tipo M não possuíam capacidade penicilinógena; as do tipo MC (híbrido) são pouco ativas e as do tipo C são as de maior atividade elaboradora de penicilina. Tomando uma cultura tipo C, aparentemente pura, fizeram 10 isolamentos unicelulares, de 2.^a geração, e, comparando essas culturas, quanto à atividade penicilinógena, por dosagem em placa, obtiveram os seguintes resultados: 2 culturas deram uma zona de inibição de 20mm; 5 deram uma zona de 25mm, e 3 uma de 26mm. Por essas interessantes observações, podemos concluir que a capacidade produtora de penicilina, varia na espécie *P. notatum*, de uma raça para outra; na mesma raça, de uma colônia para outra; e, na mesma colônia de uma célula para outra.

Outros estudos nesse sentido foram feitos por POTENCORVO e GEMMEL²¹⁸. Estes pesquisadores, submetendo colônias do *Penicillium notatum* à ação dos raios X, obtiveram, em abundância, “sectores” de mutação que ocasionalmente apareciam sem irradiação (Fotografia 3). Todos os “sectores” isolados deram origem à raças variantes que diferiam da colônia original pelas propriedades morfológicas e metabólicas.

BAKER¹⁸ fez um estudo citológico do *P. notatum* Westling e verificou que os conídios apresentam, predominantemente, um único núcleo, embora ocasionalmente possam aparecer conídios binucleados. Admitiu várias possibilidades de combinação de fatores genéticos dando os seguintes tipos: C, M, CM, CC ou MM, dependendo do número de núcleos por conídio.

As mutações dependeriam de esporos homotípicos, genéticamente puros.

Consegue-se eliminar o efeito da heterocariose nos cultivos, semeando cultura originária de esporo único, exceto o caso, aliás raro, do esporo único ser binucleado (CC ou MM) ou heterotípico (CM).

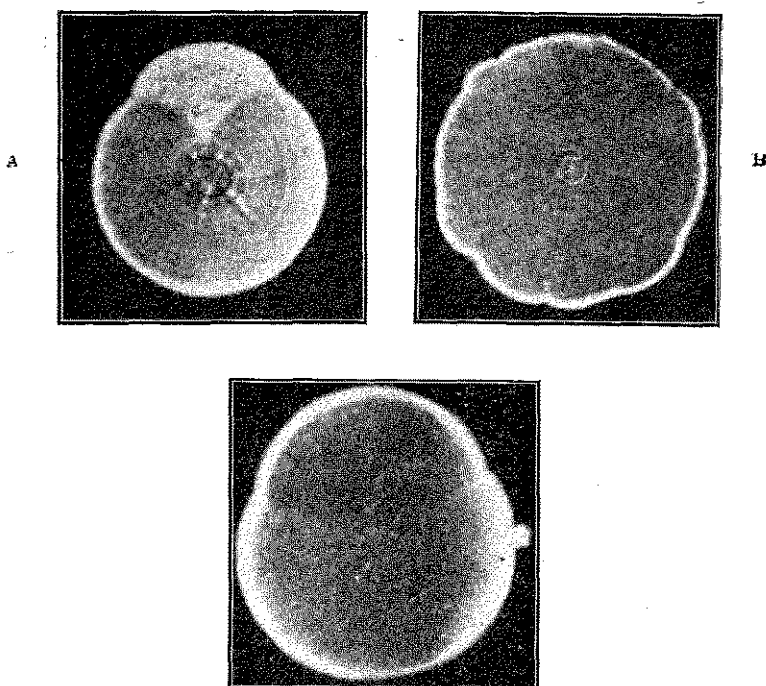
Estas observações nos levam a admitir que a atividade penicilinógena é determinada por fatores inerentes à própria célula micótica, provavelmente cromosômicos.

Assim sendo, a seleção das culturas assume aspecto muito mais delicado e profundo, exigindo a perícia e paciência dos geneticistas.

CONSERVAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CULTURAS

As culturas de *P. notatum*, mantidas por repiques freqüentes nos meios artificiais, tendem a perder, parcial ou totalmente sua capacidade penicilinógena.

Fotografia 3



- A — Colônia de *Penicillium notatum*: "setor espontâneo".
 B — Colônia irradiada mostrando os "setores" de mutação.
 C — Duas colônias de graus diferentes de crescimento que se confluíram competindo pelo mesmo terreno.

Não só o *Penicillium notatum*, mas em geral todos os germes continuamente repicados, em meios artificiais, tendem à degeneração.

Especialmente nas indústrias de penicilina, essa tendência à degeneração exige rigorosa vigilância e controle das culturas.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ observaram que um dos indícios de que uma cultura de *P. notatum* está apta a perder sua atividade produtora de penicilina, pode ser freqüentemente observado nas culturas esporuladas do cogumelo, particularmente em superfícies de ágar. As culturas, deixadas em incubação alguns dias além do tempo da esporulação máxima, começam a apresentar crescimentos isolados que representam, podemos dizer, as colônias tipo M (miceliano). A princípio esses crescimentos se apresentam como pontos brancos cotonosos que se desenvolvem e progressivamente se disseminam pela superfície do meio. Culturas com este aspecto não devem ser usadas para fins de produção.

Um dos meios mais seguros de prevenir a degeneração biológica da capacidade penicilínogena das culturas é reduzir ao mínimo o número de repiques até o momento da semeadura para produção. Pela secagem das culturas obtém-se esse desiderato.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ recomendam, como já vimos a conservação, em estado seco, de esporos de culturas selecionadas, em tubos com areia ou terra conservados em baixa temperatura. Essas culturas mantêm intensa atividade penicilínogena indefinidamente; contudo deve-se controlar a atividade dos esporos logo após o processo de secagem¹⁰⁶. Cremos que tão bons resultados podem também ser obtidos pela secagem dos esporos em soro sanguíneo normal, pelo processo líofilo cuja técnica descrevemos em páginas anteriores.

As culturas secas constituem o material para produção de esporos que serão diretamente semeados no meio líquido de produção de penicilina.

III

PRODUÇÃO DE PENICILINA

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A produção de penicilina, quer em escala experimental quer industrial, é ainda realizada por cultivo do *Penicillium notatum* em meios de cultura sob condições adequadas de incubação, enquanto está por se desvendar um método sintético de produção.

A preparação de penicilina para fins experimentais não apresenta grandes dificuldades, podendo ser feita em qualquer laboratório provido de instalações e materiais comumente usados no estudo ou fabrico de produtos biológicos e químicos. O problema, entretanto, assume uma complexidade considerável, quando se visa a produção de penicilina em larga escala, para fins terapêuticos.

A produção industrial, apresenta dificuldades de ordem técnica, de que os seguintes fatos dão idéia:

1) O rendimento de penicilina nos meios de cultura é relativamente pequeno, exigindo a manipulação ou mecanização de grandes volumes de líquido nutritivo;

2) Os meios devem ser previamente esterilizados e as sementeiras dos esporos do cogumelo devem ser feitas assépticamente, pois certos germes de contaminação destroem a penicilina;

3) A extração, além de requerer grandes volumes de solventes orgânicos, deve ser rápida e exige refrigeração de toda massa líquida porque a penicilina, na temperatura ambiente, é muito instável em soluções muito ácidas ou alcalinas;

4) A purificação, secagem e controle da penicilina exigem dispendiosa aparelhagem, além de numeroso pessoal técnico especializado.

Os meios de cultura para a produção em larga escala devem ser, preferivelmente, de consistência líquida, que facilita a manipulação e mecanização da penicilina bruta ou seja o líquido de cultura filtrado em que cresceu o *Penicillium notatum* e produziu a substância ativa. Os meios de consistência sólida ou semi-sólida podem

servir para produção em pequena escala, sendo impróprios para a produção industrial, pelas dificuldades maiores que apresentam na fase de extração da penicilina.

Com os meios líquidos a produção pode ser feita pelo cultivo do *P. notatum* em superfície usando frascos que permitem ampla área de crescimento, ou por cultivo submerso, usando dornas munidas de aparelhagem para aeração e agitação do meio.

Seja qual fôr a escala de produção ou o método de cultivo do cogumelo, podemos considerar na fabricação da penicilina duas fases: a primeira, microbiológica ou de fermentação; a segunda, físico-química, compreendendo: a extração e purificação da penicilina.

A fase microbiológica compreende: 1) o preparo do inoculum (esporos de *P. notatum*); 2) o preparo do meio de cultura; 3) plantio e manutenção da cultura em condições ótimas de produção e 4) contrôle até se obter rendimento máximo de penicilina.

MEIOS DE CULTURA

FLEMING, quando publicou seu trabalho em 1929, achava que o caldo comum, usado em bacteriologia, era o meio mais próprio para a produção de penicilina.

Posteriormente⁵⁹ obteve melhor rendimento usando caldo de digestão triptica. Cultivou o *P. notatum* a 20°C, durante 6 a 7 dias e obteve amostras de penicilina bruta que inibiam completamente o crescimento de estafilococos na diluição de 1:800.

Em 1932 CLUTTERBUCK, LOVELL e RAISTRICK modificaram o meio sintético de Czapeck-Dox e usaram-no para a produção de penicilina.

Nesse meio, contendo apenas sais minerais e glicose, verificaram a elaboração de penicilina, porém só conseguiram isolar um pigmento — a crisogenina — que não apresentava ação antibacteriana⁵⁷.

A fórmula do meio de Czapek-Dox modificado é a seguinte:

NaNO ₃	3,0	grs.
H ₂ KPO ₄	1,0	grs.
KCl	0,5	grs.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	grs.
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	grs.
Glicose anidra	40,0	grs.
Agua destilada	1000	cm ³

Durante muito tempo êsse meio foi usado para a produção de penicilina e cremos que todos os que trabalharam no assunto o experimentaram.

Verificando-se que com grandes volumes dêsse meio o rendimento de penicilina era pequeno, foram tentadas novas modificações. Alterou-se a fonte de carbono (hidrocarbonada), a fonte de nitrogênio e as outras substâncias a fim de se conhecerem os elementos químicos e as substâncias que favorecem o crescimento do *P. notatum* e aumentam a produção de penicilina.

Segundo FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶, entre todos ou quase todos os meios sintéticos experimentados, o meio com açúcar mascavo de HOBBY, MEYER e CHAFFEE¹⁴⁴ foi o melhor para a produção de penicilina.

A sua composição é a seguinte:

	%
Açúcar mascavo	2,0
NaNO ₃	0,35
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
KCl	0,05
H ₂ KPO ₄	0,15
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,015

Com um grande número de modificações feitas nesse meio de HOBBY e col. não se obteve melhora muito apreciável; entretanto, aumentando-se o teor do nitrato de sódio para 0,60% houve maior atividade penicilinógena¹⁰⁶.

Como adiante veremos, a fonte de nitrogênio é importantíssima e os melhores resultados são obtidos com meios contendo substâncias nitrogenadas, orgânicas ou naturais, tais como aminoácidos, peptonas, água de cozimento de cereais, especialmente milho.

Analisemos a importância das fontes de água, sais minerais, carbono, nitrogênio e outros componentes dos meios de cultura, inclusive os fatores ou condições que influem muito na produção da penicilina.

INFLUÊNCIA DA ÁGUA

ABRAHAM e col.³ verificaram que a água de torneira de Oxford era tão boa como a água destilada para a produção da penicilina.

Em São Paulo, fizemos experiências comparando a água destilada e de torneira e não observamos diferenças apreciáveis na elaboração da substância antibiótica.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶, entretanto, notaram irregularidade na formação da penicilina comparando as duas águas. É o seguinte o relato desses pesquisadores: “Num período de várias semanas, em meio de açúcar mascavo, simples ou adicionado de glicerina, e mesmo em meios orgânicos, a água de torneira, repetidamente, mostrou-se superior à água destilada. Depois, gradualmente a eficiência da água de torneira foi diminuindo até o ponto de não mais ser melhor que a água destilada. Esta particular seqüência de acontecimentos ocorreu em 1942 durante os meses de inverno e primavera, sendo a mudança um tanto relacionada com o advento do verão. Presumivelmente, a composição da água de torneira tornou-se bastante modificada como resultado da mudança de estação nas condições do solo”.

Essas interessantes observações lembram a importância de se fazer, periodicamente, um controle pelas análises químico-bacteriológicas da água de abastecimento usada para a produção industrial de penicilina.

Esse controle torna-se mais necessário nos casos em que a água usada não sofre qualquer tratamento prévio, pois, determinadas substâncias metálicas, oxidantes, assim como enzimas bacterianas, destroem a penicilina.

INFLUÊNCIA DOS SAIS MINERAIS

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ verificaram que, no meio de Hobby, Meyer e Chaffee¹⁴⁴, o FeSO_4 e KCl podem ser completamente eliminados e o teor de K_2KPO_4 diminuído consideravelmente, sem reduzir a atividade penicilinógena. Devemos nos lembrar, entretanto, de que os diferentes tipos de açúcar mascavo favorecem tanto mais a produção de penicilina quanto menor é o grau de pureza e que os referidos sais minerais ou outros elementos podem estar nêles contidos.

KOCHOLATY¹⁵⁶, substituindo no meio de Czapek-Dox modificado, o $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mgrs.%) por quantidades equivalentes dos sulfatos de Zn, Cp e Mn, verificou que somente o sal de manganês é superior ao de ferro na produção de penicilina. Observou também que o zinco comparado com o ferro favorece o desenvolvimento do cogumelo, mas diminui a atividade penicilinógena.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ fizeram estudo minucioso sobre a influência do zinco no crescimento e na atividade do *P. notatum*. Verificaram que o crescimento é notavelmente aumentado com 1

a 10 miligramas por litro de sulfato de zinco; acima de 10 mgrs. o zinco torna-se tóxico.

Obtiveram aumento na produção de penicilina, adicionando ao meio de cultura 1 a 3 miligramas de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Esta concentração permanece ótima independentemente da presença de quantidades diferentes de outros metais pesados (Mn, Fe, Cp) em várias combinações¹⁰⁶.

Êsses autores acham que o zinco estimula a atividade penicilínogena, provavelmente por acelerar a elevação do pH por oxidação do ácido glucônico, formado pelo cogumelo, que é responsável pela acidez do meio. Por outro lado, dizem que "o consumo posterior do ácido glucônico junto com o ion nitrato deixa um acúmulo de Na^+ que eleva o pH". Essas explicações nos parecem discrepantes, pois, se a elevação do pH fôr dependente da libertação dos ions Na^+ no meio, não seria necessária a interferência do zinco para a neutralização do ácido glucônico. Ao nosso ver o fenômeno se realiza de outra forma. O zinco, em teor adequado, acelerando o crescimento do *P. notatum*^{156 e 106}, mui provavelmente determina, simultâneamente, o consumo mais rápido dos ions NO_3^- do nitrato de sódio, e, por conseqüência, libertação mais rápida dos ions Na^+ que iriam diretamente combinar-se com o ácido glucônico, elevando o pH do meio.

Os mesmos pesquisadores¹⁰⁶ acham que existe um certo balanço entre as concentrações de carboidrato e zinco. As concentrações maiores de carboidrato determinam acúmulo maior de ácido glucônico e, por conseqüência, acidez mais intensa. Dentro de certos limites, a adição de mais zinco tende a contrapor-se a êste efeito, e a duração dos valores baixos de pH é apreciavelmente diminuída. Percebe-se que isso somente vem dar apôio à interpretação que há pouco sugerimos.

O *P. notatum*, num meio deficiente em Zn, produz na superfície uma película fina, lisa, com mui pouca esporulação, apresentando aspecto esbranquiçado. Ao contrário, com quantidades que se aproximam do ótimo, o crescimento é consideravelmente acelerado, a película superficial é bastante espessa, rugosa e de côr verde pela abundante esporulação.

Quando o teor em zinco é suficiente, observa-se, invariavelmente, a formação de pigmento (crisogenina) que dá a intensa côr amarela do meio¹⁰⁶.

CHALLINOR e MC NAUGHTAN⁵⁰, em poucas experiências que fizeram, observaram que havia aumento na produção de penicilina quando se adicionava carbonato de cálcio ao meio. A quantidade adicionada foi de 5 cm³ de uma suspensão aquosa a 10% de CaCO₃ em 200 cm³ de meio.

INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO

A glicose é uma das fontes de carbono mais usadas para enriquecimento dos meios de cultura em geral.

O meio de Czapek-Dox modificado, usado pelos pesquisadores de Oxford para produção de penicilina, continha êsse açúcar na proporção de 4%, embora FLEMING⁸⁸ já tivesse relatado que no caldo comum a adição de glicose ou sacarose que são fermentados pelo *P. notatum*, com produção de ácido, retarda ou previne a elaboração da penicilina.

A glicose, embora acelere o crescimento do *P. notatum*, apresenta o inconveniente de acidificar muito o meio pela formação abundante de ácido glucônico, que diminui o rendimento de penicilina. A quantidade de ácido glucônico formada pelo cogumelo é proporcional a concentração de glicose no meio.

KOCHOLATY¹⁵⁶ fez algumas experiências para analisar a utilização da glicose e verificou que usando 100 ou 40 gramas dêsse açúcar por litro de meio de Czapek-Dox, 90% ou mais de glicose era metabolizada até o momento da produção máxima de penicilina. Pode-se diminuir a produção de ácido glucônico, reduzindo a quantidade de glicose. Com a adição de carbonato de cálcio pode-se também diminuir a acidificação do meio. Melhores resultados, entretanto, são obtidos com o uso da lactose, que não é rapidamente transformada em ácido orgânico.

O grau da acidez como de alcalinidade tem muita importância, pois, num meio com pH abaixo de 5.0 a atividade penicilinógena é inibida ou, possivelmente, destruída a penicilina formada, e em pH acima de 8.0 êsse antibiótico tende a perder a atividade. Por isso, obtêm-se melhores resultados usando a lactose, que não é rapidamente transformada em ácido orgânico.

TAYLOR²⁷⁵, experimentando em caldo de infusão de coração, várias concentrações de lactose, maltose, sacarose e dextrose, verificou que a lactose a 5% foi a que deu títulos mais altos de penicilina.

Segundo FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ entre todos ou quase todos os meios sintéticos, o de Hobby, Meyer e Chaffee¹⁴⁴, que contem açú-

car mascavo como fonte de carbono, foi o melhor para a produção de penicilina. Várias outras fontes de carbono foram estudadas para substituir, nesse meio, o açúcar mascavo.

Esse açúcar mostrou-se superior ao citrato de sódio, succinato, acetato, piruvato, oxalacetato, gluconato, lactato, malato, álcool etílico e manita. A glicose, lactose e maltose foram, entretanto, comparáveis¹⁰⁶.

NEGRONI e FISCHER²⁰⁵ fizeram um estudo auxanográfico de vários hidratos de carbono, semeando esporos de *P. notatum* no meio sólido de Lodder (1934), distribuindo-os em placas. Nos setores dessas placas em que foram adicionadas em substância a glicose, galactose, lactose, maltose e sacarose, o cogumelo cresceu com a mesma intensidade e com um pouco mais de exuberância no sector com rafinose; entretanto, com amido quase não cresceu.

Estudando a influência das fontes de carbono sobre a produção de penicilina, verificaram que, no meio líquido de Czapek, o amido a 1% deu melhores resultados. A glicose na concentração de 0,25% a 4% não parece influir na produção da substância antibiótica e o citrato de sódio a 0,5% revelou ser péssima fonte de carbono.

O cogumelo utiliza gradualmente o amido e, por isso, provavelmente, o pH do meio não baixa tanto como com a glicose. A glicerina foi experimentada como fonte acessória de carbono por não apresentar o inconveniente de ser convertida pelo *P. notatum* em ácido glucônico como acontece com a glicose.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶, em certa experiência, juntaram ao meio de Hobby, Meyer e Chaffee¹⁴⁴, 2,5% de glicerina e conseguiram praticamente o dobro do rendimento em penicilina do obtido com o meio controle sem glicerina. Essa concentração de glicerina favoreceu o crescimento do cogumelo, aumentando o peso da película, que atinge cerca do dobro da película do meio controle.

Esse efeito benéfico na produção da penicilina não pôde ser confirmado com outro lote de glicerina¹⁰⁶.

INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO

As fontes de nitrogênio nos meios de cultura exercem influência extraordinária na produção da penicilina. Foi, adicionando aos meios sintéticos fontes adequadas de nitrogênio, que se conseguiram rendimentos muito maiores de penicilina, permitindo que essa subs-

tância transpuzesse as paredes do laboratório e se tornasse o melhor agente antibacteriano em terapêutica clínica.

O caldo comum, usado primeiramente por FLEMING⁸⁸ para a produção de penicilina, possui como fonte de nitrogênio peptona e proteínas da carne.

Esse pesquisador obteve, posteriormente⁸⁹, melhores resultados cultivando o *P. notatum* em caldo de digestão triptica. Como sabemos, pela digestão da proteína animal resultam, a princípio, albumoses, peptonas e ácidos aminados.

NEGRONI e FISCHER²⁰⁶ verificaram que a adição de 1 por mil de sulfato de protamina, ao meio de cultura, impede o desenvolvimento do *P. notatum*. Verificaram, também, que a asparagina (0,5%) é fonte inadequada de N para a produção de penicilina e acham que a peptona parece ser a melhor fonte de nitrogênio. Usando a Bactotriptona Difco (1%) obtiveram resultados ainda um pouco melhores do que com a Bactopeptona.

Pela adição de 1% de peptona Parke Davis ao meio de Czapek-Dox modificado, verificamos aumento apreciável na produção de penicilina.

KOCHOLATY¹⁵⁶ substituindo, no meio artificial de Czapek-Dox, o NaNO_3 por sulfato de amônio verificou diminuição da produção de penicilina.

FOSTER e WOODRUFF¹⁶⁶ acham que nos meios sintéticos o nitrato é superior a numerosas fontes puras de nitrogênio, inclusive aminoácidos usados individualmente.

Ao analisarmos a influência dos sais minerais vimos a importância dos ions Na^+ do nitrato de sódio na elevação do pH do meio e, por conseqüência, o aumento da produção de penicilina.

O nitrato de sódio é um dos componentes básicos dos meios de cultura para produção de penicilina.

No meio de Czapek-Dox modificado é usado na proporção de 3% e, no meio de Hobby, Meyer e Chaffee, 3,5 gramas por litro.

Numerosas outras fontes de nitrogênio foram também experimentadas, com o fim de aumentar a elaboração da substância antibacteriana.

O leite total e sôro de leite usados na concentração de 20%, produziram intenso crescimento do cogumelo, sem aumentar o rendimento em penicilina²⁵¹.

Segundo VIEIRA DA ROCHA²⁵¹ a "Imperial Chemical Industries" usa para a produção de penicilina um meio contendo como fonte de

N, além do nitrato de sódio (0,5%) um hidrolisado de caseína (0,25%).

MODERN, ILLA e ARZENO²⁰² prepararam um hidrolisado de caseína da seguinte forma: a 500 grs. de caseína juntam-se 3 litros de HCl 9 normal e aquece-se, com refluxo, durante 18 horas. Destila-se logo o HCl e adiciona-se um litro de água quente (80-90°C); ajusta-se o pH a 5.5 e descora-se com carvão animal. Finalmente, completa-se o volume de 4 litros com água.

VIEIRA DA ROCHA²⁵¹, adicionando a meios sintéticos lactosados, água de cereais (3%) obteve ótimos resultados, confirmando observações de autores americanos. Acrescentando, ainda, água de côco, os resultados foram melhores. Este autor usou também leite de côco vendido no comércio, que é retirado do endosperma do *Cocos nucifera*, o côco da Bahia e dele somente utilizou o suco obtido por expressão e filtração em gaze. Verificou que a diluição a 1:400 dava ótimos resultados.

A água natural do côco maduro, com densidade de 1,025, contém, além de outras substâncias nutritivas, aproximadamente, 0.1% de nitrogênio orgânico²⁵¹.

AREIA LEÃO¹⁶⁴, chefe da Secção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, substituindo a água de um meio peptonado, por infusão de alfafa a 1%, obteve aumento apreciável e constante na produção de penicilina.

CLIFTON⁵⁶ adicionando ao meio de Czapek-Dox ao invés de extrato de levedura, o "corn steep liquor" obteve rendimento dobrado de penicilina.

MODERN, ILLA e ARZENO²⁰² usaram a água de maceração do milho, conhecida ainda nos Estados Unidos por "corn steep water" para aumentar a produção de penicilina nos meios de cultura. Obtiveram os melhores resultados diluindo a 1/4 o "corn steep liquor" com densidade 19° Bé e contendo, aproximadamente, 40% de proteínas²⁰².

Após termos feito numerosas experiências com as diferentes fontes de nitrogênio, já citadas, verificamos que a água de maceração do milho "corn steep water" é incomparavelmente a melhor. Usamos o "corn steep water" das Refinações de Milho Brasil S/A, instaladas em São Paulo. Segundo informações que obtivemos de um representante de referida indústria, o "corn steep water" é o líquido aquoso resultante da maceração inicial dos grãos do milho

maduro e sêco. Essa maceração é feita em água, a temperatura de 49°C., e com passagem contínua de uma corrente de SO₂, durante 30 horas. Essa água de “lavagem do milho” que era antes desprezada é, atualmente, pelo menos em parte, aproveitada para a produção de penicilina. Sua densidade a 15°C. varia de 3,0 a 3,8 graus Baumé, e a acidez total em HCl varia de 0,60 a 0,64. Os líquidos que recebemos apresentavam consistência fluida, cheiro próprio e côr amarela forte e aspecto turvo. Verificamos que o “corn steep water” por si só é um bom meio de cultura, contaminando-se facilmente, dando abundante crescimento de germes, especialmente leveduras. Concentrando-se êsse líquido evita-se a contaminação e reduz-se o volume tornando mais fácil sua manipulação. Não dispondo de aparelhagem para concentração a vácuo em baixa temperatura, fizemos a concentração do “corn steep water” por ebulição, reduzindo seu volume ao décimo. Obtivemos, assim, um líquido muito denso “corn steep liquor” de côr castanho-escuro, com apreciável precipitado. Sua densidade a 15°C. era aproximadamente 28° Bé. Obtivemos o máximo da produção de penicilina usando êste líquido de consistência xaroposa na proporção de 5%. Segundo dados que nos foram gentilmente fornecidos pelas Refinações de Milho Brasil S/A, a composição do “corn steep water” a 28°,8 Bé é a seguinte:

água	59,4
cinzas	6,3
dextrina	0,4
açúcar redutor (dextrose)	5,1
ácido láctico	4,1
zeína	4,1
zeinina	0,4
albumina	0,7
proteose	1,4
peptona	4,4
ac. Alif. mono-amino	7,4
arginina	0,1
lisina	0,3
histidina	0,1
proleína	3,1
amoníaco	0,4
fitina	4,2

Por essa análise podemos apreciar a riqueza do “corn steep water” como fonte de nitrogênio, encerrando numerosos aminoácidos, peptona e proteína.

Não sabemos ainda qual a substância ou substâncias que entram na sua composição complexa, determinando aumento notável na produção da penicilina.

COMPOSIÇÃO E PREPARO DOS MEIOS

No início dêste capítulo apresentamos as fórmulas dos meios de Czapek-Dox modificado e a do meio de Hobby, Meyer e Chaffee¹⁴⁴, que segundo FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ foi dos meios sintéticos o que permitiu maior rendimento de penicilina.

Resultados realmente satisfatórios, que permitiram a produção da penicilina em larga escala foram obtidos com meios enriquecidos de substâncias nitrogenadas naturais. CLIFTON⁵⁶ usou com sucesso a água de maceração do milho "corn steep liquor". COOK e TULLOCH⁶⁴, usando um meio lactosado com extrato de ervilhas, obtiveram em média 50 a 85 Unidades Oxford por cm³ de meio. Êsses resultados são apreciavelmente elevados, comparados com o meio de Czapek-Dox modificado, no qual a maioria dos pesquisadores obtiveram apenas 2 a 4 Unidades Oxford por cm³.

RAPER, ALEXANDER e COGHILL²³⁸ conseguiram obter 110 a 140 Unidades Oxford num meio recomendado pelo Dr. A. J. MOYER, cuja composição é a seguinte:

Lactose	40,00	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	
H ₂ KPO ₄	0,50	
NaNO ₃	3,00	
ZnSO ₄	0,01	
"Corn steeping liquor"	90	cm ³
Água destilada q. s.	1.000	cm ³ .

Os referidos resultados foram obtidos em 5 a 6 dias com o *Penicillium notatum* NRRL 1249. B 21, porém com a raça NRRL 832 o rendimento foi aproximadamente 55 a 65 unidades por cm³. Por êste exemplo pode-se avaliar a importância da cultura do *Penicillium notatum* na produção de penicilina.

Ainda não pudemos experimentar o meio usado por RAPER, ALEXANDER e COGHILL²³⁸ pois o trabalho dêsses autores foi consultado recentemente. As mais variadas modificações do meio de HOBBY, MEYER e CHAFFEE¹⁴⁴, entretanto, foram experimentadas por nós, e verificamos que se obtêm resultados satisfatórios nos meios adicionados de água de maceração do milho concentrada ou "corn

steep liquor”, cujo estudo fizemos ao tratarmos das fontes de nitrogênio. Os melhores resultados que obtivemos com a raça NRRL 1249. B21 foram num meio contendo “corn steep liquor”, cuja fórmula é a seguinte:

Lactose	35,0	grs.
Glicose	5,0	grs.
NaNO ₃	3,0	grs.
H ₂ KPO ₄	0,25	gr.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,125	gr.
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,005	gr.
“Corn steep liquor” a 28° Bé	50	cm ³ .
Água destilada q. s.	1.000	cm ³ .

O meio foi distribuído em quantidades de 125 cm³ em frascos de Erlenmeyer e esterilizado a 120°C. durante 20 minutos.

A incubação foi feita em câmara cuja temperatura oscilou de 22°C. a 26°C. Apesar dessa variação de temperatura, conseguimos obter, após 8 a 10 dias de cultivo, 80 a 100 Unidades Oxford por cm³ do meio, inibindo completamente o *Staphylococcus aureus* H na diluição 1/4.000 — 1/5.000.

Praticamente com dois litros dessa penicilina bruta pode-se preparar (calculando a perda de cerca de 50%) 100.000 Unidades Oxford de penicilina purificada.

PRODUÇÃO POR CULTIVO EM SUPERFÍCIE

O estudo sistemático sobre os fatores que interferem na produção de penicilina por cultivo em superfície, foi, primeiramente, feito por ABRAHAM e col.³ Esses autores, usando um processo de dosagem que apenas permitia determinar grandes diferenças da atividade da penicilina, não puderam completar o estudo dos referidos fatores, em vista das variações muito numerosas e frequentemente interdependentes. Entretanto, puderam tirar as seguintes conclusões:

1.º) a produção de P. parece depender de uma ampla tensão de oxigênio; o cogumelo não cresce em meio anaeróbio;

2.º) o cogumelo cresce satisfatoriamente a 24°C.; em temperaturas inferiores o crescimento é retardado; como a colheita de meio é efetuada no incubador, não foram estudadas temperaturas mais elevadas, sendo 24°C. o limite ótimo superior. FLEMING⁸⁸,

em sua descrição original, relatou que o cogumelo não cresce a 37°C., o que foi confirmado;

3.º) as tentativas grosseiras para mudar o pH do meio, ou mantê-lo constante, não determinaram aumento notável da produção da P; diga-se o mesmo do acréscimo de uma quantidade de fosfato tampão 10 vezes superior à normal;

4.º) a espessura do meio não deve ultrapassar 1,5 a 2 cms.; sendo mais profundo do que 2 cms. a difusão é visivelmente inadequada, podendo ser então observadas duas camadas distintas, sendo a superior amarela e a inferior incolor;

5.º) quando o meio está pronto para a colheita pode ser retirado por baixo do micélio e substituído por outro fresco, no qual haverá produção ulterior de P, mais ou menos na metade do tempo exigido para a produção inicial; o meio pode ser mudado várias vezes desta maneira; em uma única partida o meio foi renovado 14 vezes;

6.º) o cogumelo deve crescer e a colheita e substituição do meio devem ser feitas sob as mais estritas condições de esterilidade, pois a P é destruída por certas bactérias¹.

7.º) o acréscimo de extrato de levedura (GLADSTONE e FIELDS — 1940) acelera o crescimento do cogumelo mas não afeta a produção da P; no crescimento em grande escala sempre usamos o extrato de levedura; o meio inicial de cultura contém 10% desse extrato, mas o meio usado para a substituição contém apenas 2,5%; o efeito acelerador da levedura não é prejudicado pela autoclavagem prolongada a uma temperatura elevada; a "marmite" ou o extrato de malte não agem sobre a média de crescimento ou sobre a produção da P;

8.º) a produção não é sensivelmente afetada quando se duplica ou se reduz à metade a concentração do meio;

9.º) substituindo-se o nitrato de sódio pelo lactato de amônio, o pH do meio cai abaixo de 3, interrompendo-se quase o crescimento; ajustando-se o pH a cerca de 6.5 o crescimento continua e o meio acaba por tornar-se muito alcalino; a produção de P é muito pequena;

10.º) o nitrato de sódio pode ser substituído inteira ou parcialmente por peptona ou produtos da digestão péptica e trípica dos músculos; ao invés de glicose pode-se usar a sacarose ou maltose, sem alteração material da produção de P;

11.º) ocasionalmente uma cultura produz pouca ou nenhuma P. Se bem que geralmente isso possa ser atribuído à contaminação

bacteriana, em alguns casos não pôde ser provada a contaminação, levantando-se a suspeita de que a produção da P fôsse função variável e facilmente modificável do cogumelo. A fim de pesquisar êste fato foram feitas culturas puras de células isoladas de 2 culturas, uma das quais tinha produzido P e a outra não. Cinco culturas puras da primeira e nove da última foram inoculadas em triplicata em frascos contendo meio, observando-se o título da P. Não se pôde verificar qualquer diferença entre as diversas culturas, demonstrando-se que o cogumelo não tinha perdido a sua propriedade de formar P. As possibilidades de que o insucesso tivesse sido devido à contaminação por outro cogumelo foi estudada, não podendo porém ser confirmada”.

RECIPIENTES PARA PRODUÇÃO DE PENICILINA

ABRAHAM e col.³, os primeiros pesquisadores que produziram penicilina em escala suficiente para tratamento de numerosos casos clínicos, experimentaram muitos tipos de recipientes e escolheram um frasco de cerâmica, de forma retangular, medindo 27,5 centímetros de comprimento, 22 de largura e 6 de altura.

Os frascos são vidrados somente na face interna, tornando-os menos dispendiosos e de mais fácil manipulação, diminuindo a sua tendência a deslizar quando superpostos para autoclavagem, sementeira, etc. Os gargalos desses frascos diferem dos das garrafas de Roux por serem implantados obliquamente e próximos a um dos ângulos do recipiente.

Esse último detalhe é interessante porque, facilitando a adaptação dos frascos, diminui o volume a ser ocupado no autoclave e impede que os tampões sejam molhados durante a esterilização.

Distribuindo-se um litro de meio em cada um desses recipientes obtém-se, quando deitados, uma altura do líquido de cerca de 1,7 centímetros³.

Esses recipientes, apesar das vantagens apontadas, também apresentam certos inconvenientes; sendo opacos, não permitem o controle do crescimento, da produção de pigmento ou da contaminação das culturas, e, possuindo paredes retas e perpendiculares, permitem, por qualquer movimento a imersão da película do cogumelo formada na superfície, com prejuízo da produção de penicilina.

Atualmente, usam-se mais freqüentemente, recipientes de vidro, frascos grandes cilíndricos, com capacidade geralmente de 8 a 10 litros. Esses frascos, uma vez deitados, apresentam lateralmente

as paredes curvas, o que impede que o micélio mergulhe no meio com facilidade. Entretanto, êstes frascos têm o inconveniente de ocupar grande volume no autoclave para esterilização e, sendo cilíndricos, precisam ser apoiados para não se movimentarem durante a incubação.

Diante disso, idealizamos um tipo de frasco de vidro de forma, e dimensões semelhantes aos descritos por ABRAHAM e col.³, porém, com as paredes laterais curvas e a superior e inferior planas.

A figura I mostra o formato e as dimensões dêste novo modelo de frasco.

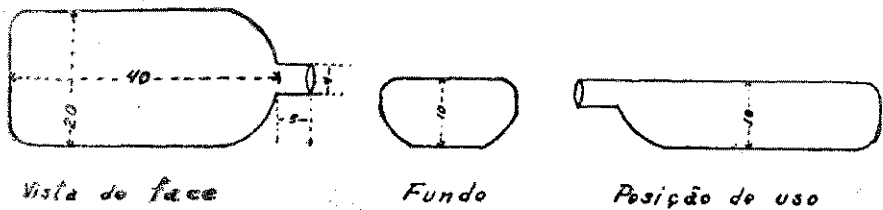


Figura I

Formato e dimensões em centímetros do novo modelo de frasco proposto para produção de penicilina, em superfície.

Construída a fôrma de madeira dêste novo modelo verificamos que se apoia bem em qualquer face. O fundo tem uma parte plana que permite ao modelo estacionar de pé. Pelos cálculos prévios que fizemos cada frasco poderá comportar 1.300 cm³ de líquido com altura de cêrca de 2 centímetros.

Embora, ainda, não nos tenha sido possível obtê-los para experimentá-los na produção, julgamos que deverão dar ótimos resultados pelos motivos já apontados.

Como vimos, a altura ótima do meio para produção de penicilina por cultivo em superfície é, segundo ABRAHAM e col.³, 1,7 a 2,0 centímetros. Pode-se obter, entretanto, bons rendimentos de penicilina em recipientes de formas diversas desde que seja prevista a relação entre o volume de líquido de cultura e a área ou superfície do mesmo.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ verificaram que em qualquer frasco a relação $\frac{V}{A}$ tem influência importante no rendimento final de penicilina. Observaram que camadas menos espêssas são mais favoráveis para a formação da substância ativa.

Usando frascos de tamanhos diferentes em que a relação $\frac{\text{volume}}{\text{área}}$ é constante, o frasco menor dá maior e mais rápida elaboração de penicilina¹⁰⁶.

Na interpretação dos resultados de produção de penicilina, o tamanho do frasco e o volume do meio são fatores importantes que devem ser considerados. O volume do meio deve ser, no máximo, 1/5 do volume do frasco, para se obter os melhores resultados na produção por cultivo em superfície.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Um dos fatores físicos mais importantes na produção de penicilina ou de qualquer substância antibiótica, por meio de culturas, é, sem dúvida, a temperatura de incubação. É possível que a temperatura ótima para uma dada raça de *Penicillium notatum* não corresponda exatamente à de outra. Cremos que pequenas variações podem ser dependentes de outras condições de cultivo, como o grau de adaptação de uma das raças a determinado meio de cultura.

CLUTTERBUCK, LOVELL e RAISTRICK⁵⁷ cultivaram o *Penicillium notatum* a 25°C. e os pesquisadores de Oxford³ a 24°C., e em nenhuma temperatura inferior a essa obtiveram melhor rendimento de penicilina. Não tendo experimentado outras mais elevadas, consideraram 24°C. o limite ótimo superior.

KOCHOLATY¹⁵⁶, entretanto, usou exclusivamente a temperatura de 28°C. Certos fatos parecem indicar que as condições ótimas de crescimento não o são necessariamente para a produção de penicilina. Esse autor observou que em cultura de *P. notatum*, incubada a cerca de 20°C., embora se tenha formado película delgada e tenha o seu crescimento sido retardado, a produção de substância antibacteriana foi quase idêntica à do cogumelo incubado a 28°C.

Adicionando ao meio CaCO₃ verificou, após 14 dias de incubação a 28°C. que embora a película fôsse fina como papel, com ausência absoluta de pigmentação, a produção de substância antibacteriana era ainda normal.

Outra observação interessante foi a seguinte: tomou um frasco de cultura do cogumelo em meio líquido, após ter atingido o máximo de produção da substância antibacteriana e colocou-o na geladeira; verificou, após alguns dias, aumento de atividade antibacteriana.

Estas experiências, embora isoladas, indicam que a temperatura ótima de crescimento não corresponde à da produção de penicilina. Pode-se, provavelmente, fazer coincidir as duas temperaturas me-

diante adaptação da cultura e contrôlo contínuo num mesmo meio de produção.

INFLUÊNCIA DO pH

Ao tratarmos da influência da fonte de carbono na produção de penicilina, vimos a ação prejudicial do ácido glucônico formado pela fermentação da glicose. Este inativa a penicilina pelo acentuado abaixamento do pH do meio de cultura.

CHALLINOR e MC NAUGHTAN⁵⁰ observaram que, adicionando ao meio de Czapek-Dox um tampão de fosfato, o rendimento em penicilina era bem maior. Resultados semelhantes podem ser obtidos adicionando-se ao meio carbonato de cálcio.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ semeando o *P. notatum* no meio de Czapek-Dox modificado, com pH inicial 6.5 e incubando a 25°C., verificaram que o pH baixa a 3.0 — 4.0 e permanece baixo, ao contrário do que verificaram ABRAHAM e col.³, isto é, após a acidificação há ascensão do pH, que atinge 7.0 — 8.0.

Observamos no meio de Czapek-Dox modificado, ao contrário das verificações de FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶, resultados semelhantes aos dos pesquisadores de Oxford³. O pH do meio, inicialmente em torno de 6.0, pela fermentação da glicose pode baixar muito, chegando a 2.0, entre o 4º e 5º dias de cultivo do *P. notatum*; depois se eleva até ficar alcalino, com pH acima de 8.0.

Em torno da neutralidade (pH 7.0) obtém-se o máximo de produção de penicilina; este ponto foi por nós verificado após 9 a 10 dias de cultivo do cogumelo.

As divergências apontadas quanto às mudanças do pH no meio de Czapek-Dox modificado por CLUTTERBUCK, LOVELL e RAISTRICK⁵⁷, podem ser explicadas pelo grau maior ou menor de pureza dos ingredientes. Ao analisarmos a influência dos sais minerais, chamamos a atenção para a importância do Zn, em quantidades mínimas, na elevação do pH do meio e, conseqüentemente, na produção de penicilina. É possível que os ingredientes usados pelos pesquisadores americanos¹⁰⁶ não contivessem como impureza traços suficientes de zinco. A penicilina é mais estável entre pH 5.0 e 7.0. Segundo BERGER²² o pH de máxima estabilidade é 6.4. ABRAHAM e col.³ indicam como reação inicial do meio pH 6.0-7.0 enquanto TAYLOR²⁷⁵ recomenda pH inicial igual a 4.4-5.0.

A acidêz do meio abaixo de 5.0 impede a formação da penicilina ou tende a destruir a já formada; e pH acima de 7.8 tende a inativá-la.

O abaixamento do pH do meio de cultura, além de diminuir o rendimento de penicilina, interfere sobre o metabolismo do *P. notatum*, no sentido de favorecer a elaboração de outra substância antibiótica, a notatina, penicilina B ou penatina.

Segundo FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁶ a notatina é produzida pelo *P. notatum*, quando a acidez do meio atinge pH 3.0-4.0 e aí permanece por algum tempo antes de se elevar. Os melhores rendimentos de penicilina são obtidos quando o pH do meio não cai tão baixo e sobe rapidamente para 6.0-8.5¹⁰⁶ já analisámos a vantagem que apresenta a lactose sobre a glicose, não sendo tão rapidamente convertida em ácido orgânico, por ação fermentativa do *Penicillium notatum*.

Excluída a dosagem da atividade antibacteriana, a melhor indicação do momento de produção máxima de penicilina é dada pelo pH do meio de cultura, que deve estar em torno da neutralidade.

INFLUENCIA DO TEMPO DE CULTIVO

Na produção de penicilina, especialmente em escala industrial, o tempo gasto representa importantíssimo fator econômico. Em virtude das dificuldades de obtenção da penicilina, os pesquisadores têm visado o máximo rendimento, no menor tempo possível.

As pesquisas feitas por numerosos investigadores resultaram em grande aumento na produção total da penicilina; entretanto, quanto ao tempo de cultivo, pouco se conseguiu além das primeiras observações de FLEMING⁸⁸.

O descobridor da penicilina verificara que, em caldo comum, o máximo de produção de substância antibacteriana era obtido após 8 dias de cultivo em temperatura ambiente.

No meio de Czapek-Dox modificado, CLUTTERBUCK e col.⁵⁷ verificaram que a produção era mais lenta, atingindo o máximo entre 16 a 21 dias. Observamos o máximo entre 9 e 10 dias.

Foram experimentadas numerosas substâncias adicionadas ao meio de cultivo a fim de acelerar o crescimento do cogumelo e diminuir o tempo de elaboração do antibiótico. O extrato de levedura de 2,5 a 10% foi usado por ABRAHAM e col.³.

Em páginas anteriores estudámos a influência de outras substâncias.

CHALLINOR⁴⁹ conseguiu diminuir o tempo de produção máxima, usando meio tamponado (com mistura de fosfatos) ao qual adicio-

nou pequenas quantidades de líquido de cultura retirado 11 dias após o crescimento do *P. notatum*.

O líquido de cultura adicionado, parece ter estimulado o cogumelo que produziu, em 5-6 dias, quantidades de penicilina igual, pelo menos, à que produziu em 10-11 dias.

Segundo FLEMING, o índice de crescimento do *Penicillium notatum* e a produção de penicilina são mais rápidos à medida que aumenta a temperatura de 18°C a 24°C.

INFLUÊNCIA DAS RADIAÇÕES

REID²⁴⁰, em 1935, fez interessantes provas para verificar a influência dos raios luminosos sobre a produção de penicilina em cultura.

Submeteu as culturas à ação dos raios de uma lâmpada a arco de carbono com filtro de quartzo, incluindo os ultravioletas, infravermelhos e outros raios luminosos. Verificou ação deletéria sobre a produção de substância inibidora. As culturas de *P. notatum*, crescendo em frascos de vidro Pyrex, foram expostas aos raios da referida fonte luminosa, durante 15 minutos diários, durante o período de incubação. O autor tomou cuidados para evitar a contaminação pela exposição à luz e o aquecimento da cultura pela lâmpada.

Nessas condições, os filtrados das culturas não continham penicilina, demonstrando que a substância inibidora não havia sido produzida ou, se produzida, havia sido destruída pela ação dos raios luminosos.

JAHIEL e outros¹⁵⁰ baseando-se no princípio pelo qual as irradiações de pequenas quantidades de radon, ou outras substâncias radioativas, ao contrário das grandes, excitam o crescimento dos seres vivos, fizeram experiências com o *Penicillium notatum*. Submeteram a cultura em meio de Czapek-Dox modificado (pH 6.0) à ação do radon, cujas emanações radioativas se difundiam através das paredes de tubos de porcelana. As "células" que constituíam a fonte de irradiação foram preparadas para produzir diariamente cerca de 7 microcuries. Verificaram que as culturas irradiadas produziram o máximo de penicilina, 2 a 3 dias antes das culturas de controle.

INFLUÊNCIA DOS GASES: CO₂, O₂ e H₂

NEGRONI²⁰⁴, estudando a influência de alguns fatores físicos e químicos sobre a produção da penicilina, depreendeu que muitas das

condições físico-químicas que determinam a produção máxima de toxina alfa-hemolítica e de enterotoxina do *Staphylococcus aureus* são as que proporcionam, também, o rendimento máximo de penicilina.

O gás carbônico, entretanto, constitui exceção. Enquanto a produção de alfa-hemolisina estafilocócica é aumentada cultivando-se o germe em atmosfera que contenha 20% de CO₂, a referida atmosfera, renovada diariamente, prejudica o desenvolvimento do *Penicillium notatum* (raça Fleming) e a produção de penicilina²⁰⁴.

REID²⁴⁰, considerando que o oxigênio exerce papel importante na produção de toxinas, experimentou aumentar a concentração desse gás no meio e na atmosfera em que cresciam culturas do cogumelo. Fêz passar, por um tubo através do meio de cultura, uma corrente de oxigênio durante 15 minutos diários, de modo a desprender 100 bôlhas de gás por minuto.

Nessas condições, o oxigênio produziu apreciável aumento no crescimento do cogumelo e na formação de pigmento, porém, não houve produção de substância inibidora ou, se produzida, houve destruição por ação do gás.

Resultados idênticos foram obtidos com culturas tratadas do mesmo modo com correntes de CO₂ ou de hidrogênio²⁴⁰.

INFLUÊNCIA DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS

Na tentativa de aumentar o rendimento de penicilina, foram adicionadas aos meios de cultura as mais variadas substâncias e sob as formas mais diversas.

ZOBELL³¹⁶ já havia verificado que o vidro, substâncias plásticas, porcelana, areia, kieselguhr e outros materiais inertes, sob a forma de partículas exercem efeito favorável sobre a atividade bacteriana. Observou que essa ação é geralmente evidente em meios nutritivos diluídos. As partículas dos referidos materiais agem como "superfície ativa", concentrando, por adsorção, as substâncias orgânicas do meio.

Muitas das bactérias encontradas na água do mar são, no dizer de ZOBELL³¹⁶, sésseis, crescendo, exclusiva ou preferencialmente aderentes à uma superfície sólida, onde a concentração da matéria orgânica, por adsorção, é maior. O tamanho das partículas tem grande importância, pois, as partículas maiores do que as bactérias

são mais benéficas do que as menores, que até podem ser prejudiciais.

CONN e CONN (1940), citados por ZOBPELL³¹⁶, acham que o efeito estimulador da bactéria é devido, além de outros fatores, ao aumento de superfície.

NEGRONI²⁰⁴, colocando uma camada de papel de filtro no caldo simples de cultura, obteve crescimento rápido e exuberante do *P. notatum*, com produção maior de penicilina, atingindo o máximo do 4º ao 5º dia.

MAC CLEAN¹⁸⁰ havia observado que o papel de filtro, o kieselguhr e o caulim adsorvem uma substância existente no caldo comum e que destrói a toxina produzida pelo estafilococo ou inibe a sua produção. No caso da penicilina, NEGRONI também acha que, provavelmente, o papel de filtro favorece a produção, por fenômeno físico de adsorção.

SCHWARTZMAN²⁶⁴, adicionando aos meios de cultura sacos de celofane de superfície adequada, verificara aumento de crescimento e de produção de penicilina em superfície ou em culturas submersas, em raças de *P. notatum*. Esse efeito benéfico também ocorre quando a relação $\frac{V}{A}$ (Volume/Área) é desfavorável. Verificou que o celofane produz estabilização acentuada do pH, durante a produção de penicilina nos meios de cultura.

IMPORTÂNCIA DA PIGMENTAÇÃO DO MEIO

Uma das características das culturas de *P. notatum* é a produção de pigmento amarelo, denominado crisogenina. A pigmentação aparece regularmente após a frutificação do cogumelo e pode se tornar mais intensa, apresentando cor vermelho-alaranjada deixando-se prolongar o tempo de incubação. Essa pigmentação é melhor observada no meio de Czapek-Dox modificado. Fato interessante é que ela e a penicilina são elaboradas simultaneamente no meio, pelo *P. notatum*.

REID²⁴⁰ verificou, pela adsorção com carvão, que o pigmento e a substância inibidora eram removidos do meio de cultura. Por outro lado, a extração em clorofórmio retirou parte do pigmento sem afetar a intensidade das propriedades inibidoras do filtrado. A exposição à luz impede a produção da substância inibidora e não afeta a produção de pigmento. Do mesmo modo, agem o oxigênio, o hidrogênio e o CO₂. O aquecimento produz perda da atividade

inibidora, sem alterar a intensidade da pigmentação. Depreende-se dessas observações que há estreita relação entre a produção de pigmento e a de penicilina.

Durante os vários anos que trabalhamos no assunto, encontramos, esporadicamente, algumas culturas em meio líquido de Czapek-Dox modificado que não apresentavam a menor pigmentação. O cogumelo formava película delgada, de aspecto esbranquiçado, característico da degeneração da cultura, que era do tipo M (miceliário). Todas as vezes que o meio não apresentava pigmentação não possuía, também, atividade inibidora para o *Staphylococcus aureus*.

A existência de substância antibacteriana no líquido de cultura do *P. notatum* era sempre acompanhada de pigmentação. A recíproca entretanto não é verdadeira, pois, muitas vezes, havia intensa pigmentação e não observamos qualquer propriedade inibidora.

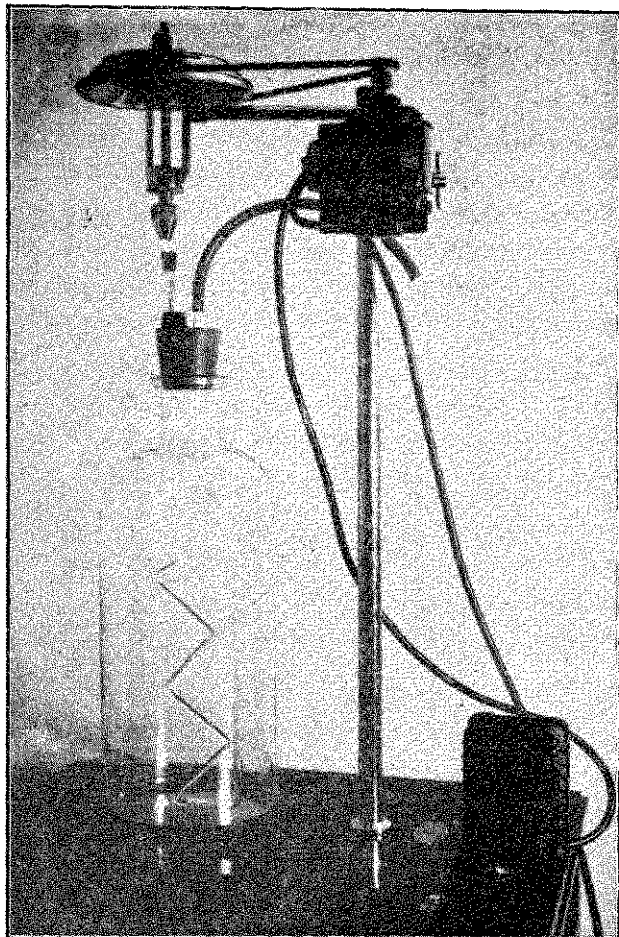
O pigmento não possui ação antibacteriana e pode ser separado da substância ativa, como veremos adiante, por extrações em solventes orgânicos e por cromatografia.

Podemos concluir que tanto o pigmento como a penicilina são produtos do metabolismo do *P. notatum* estreitamente relacionados, possuindo propriedades diferentes.

PRODUÇÃO POR CULTIVO SUBMERSO

É processo que parece simplificar muito a produção da penicilina em escala industrial. Para nos certificarmos de suas vantagens sobre o do cultivo em superfície, procuramos fazer algumas experiências de produção por esse método, que segundo CALLAHAM³⁷ está sendo usado nos Estados Unidos e cujos detalhes ainda não foram divulgados.

Com o fim apenas de verificar as possíveis vantagens de produção de penicilina com culturas submersas de *P. notatum* construímos um "piloto", como mostra a fotografia 4, usando um recipiente de vidro "Pyrex" com capacidade de cerca de 10 litros. Na ausência de outras possibilidades, preferimos o dito recipiente por ser transparente e alto, permitindo observação melhor da cultura submersa. Fechamos a boca larga do recipiente com rolha de borra-



Fotografia 4

Aparelho montado para experiência de produção de penicilina, por cultivo submerso.

cha, com perfurações que davam passagem a tubos de vidro para os seguintes fins:

- 1.º um tubo longo que atingia o fundo do recipiente, destinado à entrada de ar estéril para garantir a aerobiose;
- 2.º um tubo curto que apenas ultrapassava a face inferior da rolha, destinado à saída do ar e à sementeira do cogumelo;
- 3.º outro tubo igualmente curto, porém mais calibroso, que dava passagem a um impulsor longo de vidro, destinado à agitação do meio e da cultura.

A aeração foi feita por meio de um compressor de ar; antes de entrar no recipiente esterilizado com o meio de cultura, filtramos o ar, previamente, em camada de óleo e depois em tubo com algodão estéril para evitar contaminação. Conseguimos agitação satisfatória, usando impulsor de vidro dobrado em “zig-zag”, cuja extremidade inferior quase atingia o fundo do recipiente e a superior ligada a um agitador elétrico que dava 120 rotações por minuto.

Preparamos o inoculum para 7 litros de meio, da seguinte maneira: semeamos esporos de uma cultura de *P. notatum* em meio de Sabouraud num frasco de Fernbach contendo 200 cm³ de meio e deixamos incubar a 22-26°C. até a formação de pequenas colônias que tinham o aspecto de pontos brancos. Isso se dava após cerca de 36 horas de incubação. Então agitamos o frasco e com pipeta transportamos assépticamente, toda cultura jovem ao recipiente de produção.

Usamos para a preparação do inoculum, e para produção, o mesmo meio de cultura com água de milho, adicionando 1:1.000 de carbonato de cálcio, para evitar o excesso de acidez. Pela aeração contínua, o cogumelo, que é estritamente aeróbio, recebia o ar indispensável ao seu crescimento e às suas atividades metabólicas. Pela agitação mantivemos o meio homogêneamente arejado, conseguindo disseminar as “colônias” do *P. notatum* igualmente por toda massa líquida.

Observamos que a agitação deve ser contínua, pois, se fôr interrompida, as “colônias” do cogumelo que assumem a forma de flocos e aspecto esbranquiçado, lembrando miolo de pão branco, aglomeram-se pouco a pouco e, por gravidade, vão se sedimentando, formando massa volumosa no fundo do recipiente. Nestas condições, a aeração das culturas torna-se muito reduzida, o que diminui consideravelmente o crescimento do cogumelo.

Em cultivo submerso o *P. notatum* produz penicilina, sem esporular e, as colônias em forma de flocos brancos são do tipo M (miceliano). Este fato é interessantíssimo, pois, em cultivo em superfície, só as culturas tipo C (conidiano ou esporular) são boas produtoras de penicilina.

Usamos nestas experiências preliminares a raça 832 Squibb, que é uma cultura de *P. notatum* dotada de boa capacidade penicilínogena por cultivo em superfície. Com esta cultura os resultados foram praticamente nulos. Cultivando o referido cogumelo no mesmo meio, porém, em superfície os resultados foram satisfatórios.

Previstas as condições da aeração, agitação, pudemos concluir que a raça Squibb 832 não possui boa capacidade penicilínogena em profundidade. Estamos atualmente experimentando outras raças de *Penicillium* a fim de observar resultados melhores. O trabalho recente de RAPER, ALEXANDER e COGHILL²³⁸ veio dar apoio à nossa observação. Estes autores assim se expressaram: "Many strains which showed good yields in surface culture proved disappointing when studied in a submerged condition".

RAPER, ALEXANDER e COGHILL estudaram 241 culturas diferentes, pertencentes ao grupo *Penicillium notatum* — *chrysogenum* e verificaram que 24, apenas, eram capazes de produzir quantidades dosáveis de penicilina. Nenhuma delas era mais ativa do que o *Penicillium notatum* NRRL. 1249. B 21 para a produção de penicilina em superfície. Verificaram, também, que várias culturas eram capazes de elaborar penicilina por cultivo submerso, com rendimento igual ao obtido por cultivo em superfície com *P. notatum* NRRL 832 (55-65 unidades por cm³).

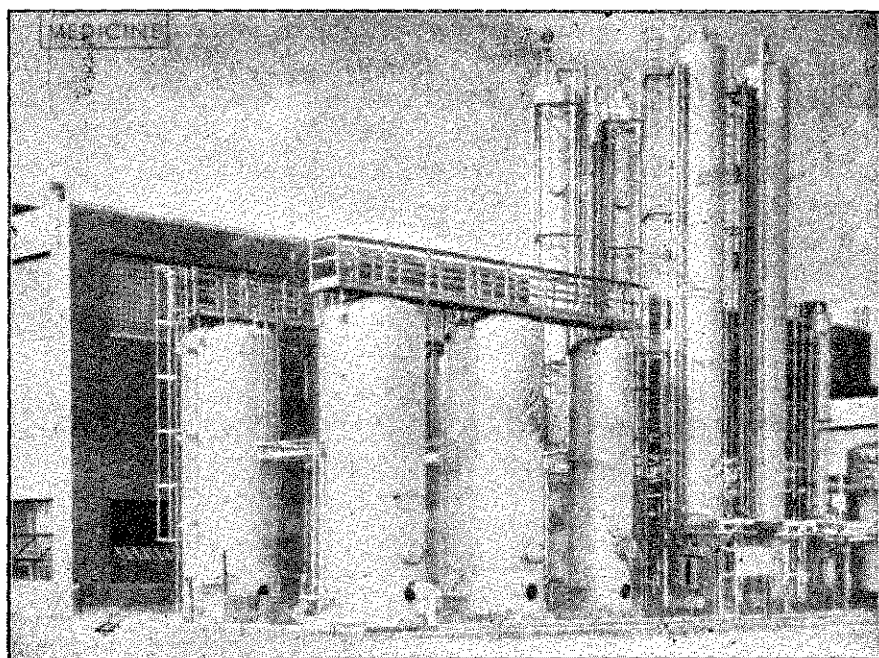
A cultura NRRL 1951 (P. S. 46) *P. chrysogenum* mostrou-se consideravelmente ativa tanto em cultivo submerso como em superfície.

As provas foram feitas no seguinte meio recomendado pelo Dr. A. J. MOYER:

Lactose	20,0	grs.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	gr.
H ₂ KPO ₄	0,50	gr.
NaNO ₃	3,0	grs.
Zn (como ZnSO ₄)	0,01	gr.
"Corn steeping liquor"	40	cm ³
Água destilada q. s.	1.000	cm ³

O meio foi distribuído, em quantidades de 125 cm³, em frascos de Erlenmeyer de 300 cm³ e esterilizados a 121°C. durante 20 minutos. Antes da inoculação dos esporos RAPER e col.²³⁸ adicionaram a cada frasco 1 grama de CaCO₃. Cada frasco foi semeado com 1 cm³ de suspensão densa de esporos (verde escura). Usaram água contendo 1:10.000 de lauril sulfonato de sódio para obter suspensão uniforme. Os frascos incubados a 24°C. eram agitados por meio de agitadores de Ross-Kershaw, de modo a se ter velocidade de 200 a 210 rotações por minuto. Com a cultura NRRL 832 obtiveram rendimento de 45-60 unidades por cm³, em 4 a 5 dias.

Diante desses estudos depreende-se a importância da seleção e da adaptação das raças para produção de penicilina em cultivo submerso. A principal vantagem deste método sobre o do cultivo em superfície, é poder ser feita a produção de penicilina bruta em número de recipientes incomparavelmente menor. Reproduzimos a fotografia 5 que vimos numa revista norte-americana ("Life", de 17 de julho de 1944) de uma grande indústria de penicilina que usa, para cultivo submerso, dornas com capacidade de 15.000 galões que podem comportar cerca de 45 toneladas de meio de cultura.



Fotografia 5
Vista de uma indústria de penicilina, mostrando o equipamento para recuperação de solventes.

PRODUÇÃO EM MEIOS SÓLIDOS E SEMI-SÓLIDOS

O cultivo em meios sólidos ou semi-sólidos despertou, desde o início, interesse dos pesquisadores porque nêles se obtém o máximo de produção de penicilina em menos tempo que nos meios líquidos.

RAO e DE, citados por LINHARES¹⁷¹, verificaram que o *P. notatum* cultivado em meio semi-sólido produzia o máximo de atividade antistafilocócica, no terceiro dia de incubação.

VIEIRA DA ROCHA ²⁵¹ observou crescimento rápido e exuberante do cogumelo, com elevada produção de penicilina, no seguinte meio sólido:

Ágar	15,0 grs.	..
Peptona	12,0 grs.	
Água de côco a 1/200 q. s.	1.000	cm ³

Nesse meio, a produção já era acentuada no 5.^o dia e aumentava gradualmente até o 7.^o.

NEGRONI e FISCHER ²⁰⁸, usando meio semi-sólido à base de farelo, verificaram que é necessário prolongar a incubação até que o cogumelo tenha metabolizado completamente a fonte hidrocarbonada, para se obter o máximo de produção de penicilina.

Assim, submetendo o farelo, previamente, à ação enzimática do *P. notatum* durante 4 dias, a 28°C. (50 grs. de farelo e 150 cm³ de água destilada), e depois adicionando água peptonada e manitada (100 cm³) e passando a incubar a 24°C., obtiveram resultados bem melhores. Verificaram que a ação enzimática do cogumelo é favorecida, fazendo-se passar, diariamente, uma corrente de ar e que a melhor concentração de manita a ser adicionada é 0,1%.

MODERN, ILLA e ARZENO ²⁰² prepararam um meio semi-sólido, adicionando 80 gramas de farelo a 200 cm³ de líquido nutritivo de pH 7.0-7.2, à base de sais minerais, água de maceração de milho e hidrolisado de caseína. Nesse meio cultivaram o *P. notatum* e obtiveram, sistematicamente, rendimento de 50 Unidades Oxford por cm³.

A produção de penicilina em meios sólidos e semi-sólidos, embora seja apenas interessante sob o ponto de vista experimental, pode dar rendimentos semelhantes aos dos meios líquidos; entretanto, é inadequada para a produção em larga escala por apresentar maiores dificuldades na manipulação e mecanização.

EXTRAÇÃO DA PENICILINA

A extração da penicilina produzida nos meios de cultura deve ser feita imediatamente após ter-se verificado que a atividade antibacteriana atingiu o máximo. O pH do meio em torno da neutralidade é, como já vimos, precioso indício de que a cultura produziu o máximo de penicilina. O único método seguro conhecido é, porém a dosagem da atividade antibacteriana, que analisaremos adiante.

Produzida a penicilina nos meios de cultura, separa-se o líquido das partículas em suspensão e da massa do cogumelo, que são desprezadas. Pode-se obter o líquido límpido por filtração ou por centrifugação.

A filtração pode ser feita primeiramente através de tela metálica galvanizada (16 malhas por cm^2) para separar as partículas grosseiras e os micélios; depois, em filtro de tecido de algodão para tornar o meio límpido. Aachamos que, nessa fase, a filtração a vácuo, por meio de filtro-prensa deve ser adequada para fins industriais.

A separação por centrifugação é, sem dúvida, mais prática e mais própria para grandes quantidades de meio de cultura. Centrifugas de aço inoxidável, semelhantes às turbinas usadas em tinturarias, devem dar bons resultados.

Obtido o líquido límpido passa-se à fase físico-química de produção, que começa com a extração da penicilina.

Pela extração separam-se os sais minerais e outras substâncias inativas do líquido de cultura.

Por extrações sucessivas isola-se e concentra-se o produto para purificação ulterior, que pode ser feita por cromatografia e outros processos que veremos adiante.

Pode-se isolar a penicilina do líquido límpido de cultura por dois processos:

- 1.º) extração em solventes orgânicos;
- 2.º) adsorção em carvão animal ativado ou outros adsorventes.

EXTRAÇÃO POR SOLVENTES ORGANICOS

O éter, o clorofórmio, os acetatos de amila, etila e butila, o butanol são adequados porque dissolvem a penicilina e são mui pouco solúveis em água; além disso, podem ser separados dela mecânicamente, por possuírem diferença suficiente de densidade. Para fins industriais, em condições outras de igualdade, deve-se preferir o solvente orgânico que seja menos solúvel em água e que apresente maior diferença de densidade.

ABRAHAM e colaboradores³ conseguiram extrair a penicilina em solventes, acidificando com ácido fosfórico o líquido de cultura a pH 2.0.

A acidificação, embora tenha ação destrutiva sobre a penicilina, é necessária para tornar possível a passagem da mesma para o solvente orgânico. Parece que a acidificação diminui a solubili-

dade, na água, da penicilina, que passa, então, para o acetato de amila, éter, etc.

Para reduzir ao mínimo a destruição da penicilina em pH tão baixo, a extração deve ser feita o mais rapidamente possível e em temperatura não superior a 7°C.

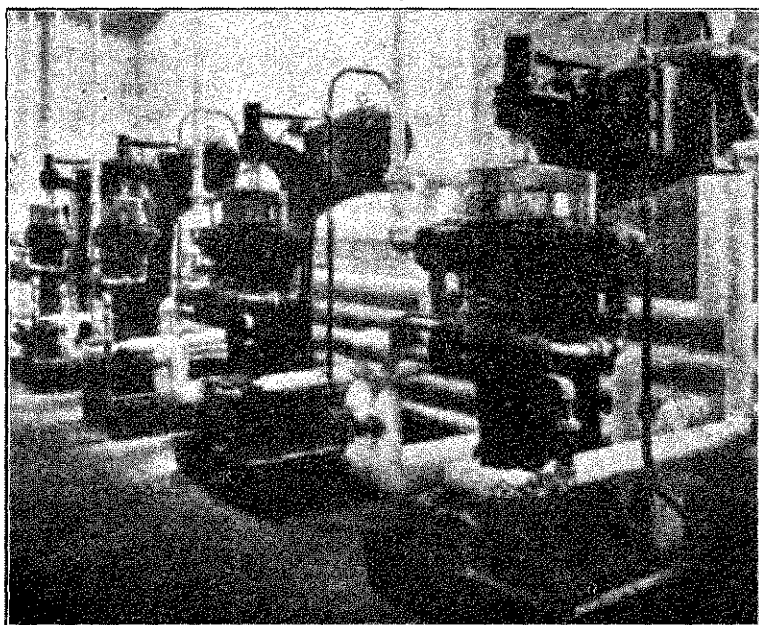
Separa-se o extrato por decantação ou, melhor, por meio de centrífugas separadoras de jacto contínuo, como as modernas desnatadeiras de leite.

ABRAHAM e colaboradores³ usaram, sem descrever detalhes, um "counter-current apparatus" com o qual podiam extrair no máximo 80% da penicilina.

Trabalhando-se com pequenas quantidades pode-se fazer a extração em funis de separação. Embora seja processo demorado e cansativo o rendimento é maior, atingindo 90-95%.

Desde que a diferença entre a densidade do solvente orgânico e da água seja maior do que 0.1, consegue-se a separação com grande facilidade, usando centrífuga separadora.

Segundo CALLAHAM³⁷, que fez interessante reportagem sobre a produção da penicilina em larga escala, a "Commercial Solvents



Fotografia 6

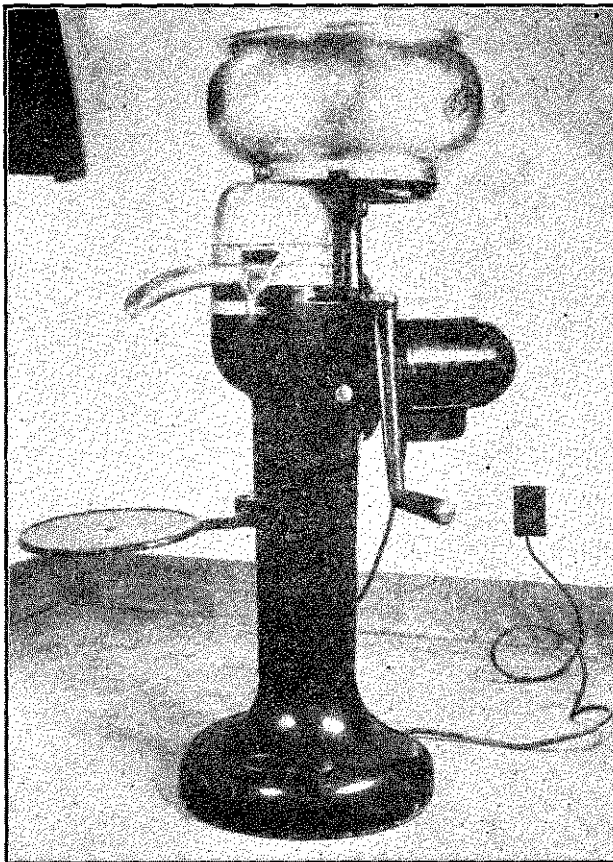
Super-centrífugas que giram a 15.000 r.p.m. destinadas à separação de solventes orgânicos, durante as fases de concentração da penicilina.

Corporation” de Terre Haute, Indiana, U. S. A., para separar os solventes orgânicos, durante as fases de concentração, usa super-centrífugas que giram a 15.000 rotações por minuto.

A fotografia 6 mostra um conjunto dessas centrífugas.

Resultados satisfatórios obtivemos com centrífuga separadora que dava 9.000 a 11.000 rotações por minuto.

É centrífuga, primariamente destinada à desnatação de leite e de fabricação norte-americana “Internacional” “S 5”. Como se vê na fotografia 7 pode ser acionada por manivela ou por motor conjugado.



Fotografia 7

Centrífuga separadora “Internacional S 5” usada na separação de solventes, durante as fases de extração e concentração da penicilina.

A parte principal dessa centrífuga é o “tambor” ou “bôlo” giratório (vêr fig. II) que se adapta ao eixo da centrífuga acionada por motor monofásico de 1/4 HP. No “bôlo” piriforme penetram, emulsionados, por agitação, o solvente orgânico e a água que, passando pelas perfurações de uma pilha de 36 discos em alta rotação, por diferença de densidade separam-se, saindo sob a forma de jactos contínuos, por 2 orifícios diferentes do “bôlo”, podendo ser coletados separadamente.

Como a extração se faz em meio ácido, preferimos usar “bôlo” e “discos” de aço inoxidável.

Esta centrífuga ainda serve para recuperação dos solventes orgânicos usados na extração. Conseguem-se isso centrifugando a mistura em partes iguais do solvente usado e água destilada alcalinizada a pH 8.0 com lixívia de soda. Por êste processo rápido, poupa-se o dispêndio de tempo e material com a recuperação dos solventes por destilação.

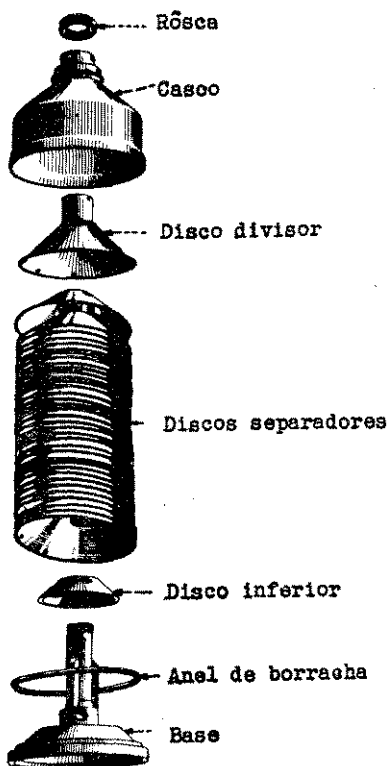


Figura II
“Bolo” ou “tambor” da centrífuga anterior, mostrando os discos perfurados para separação de solventes.

Extração pelo acetato de amila.

Para extração de penicilina em pequena escala, por meio de solventes orgânicos, ABRAHAM e CHAIN⁴ usaram o seguinte método: “O líquido de cultura é refrigerado em geladeira a 4°C, acidificado com ácido fosfórico a pH 1.9 e extraído em porções de 2 litros com igual volume de acetato de amila. Este solvente remove 90-95% da substância ativa. Extrai-se, em solução aquosa a penicilina do acetato de amila, por agitação de porções de 2 litros com 400 cm³ de água, adicionando, em pequenas quantidades, barita N/30 com agitação intensa até atingir o pH 6.2-6.4.

A temperatura durante estas operações não deve exceder 7°C. Geralmente são necessários 30-40 cm³ de barita N/30 para cada lote de 2 litros e usa-se nova água somente após a extração de dez lotes de 2 litros de acetato de amila. Quase toda penicilina é recuperada por este processo. Lava-se novamente o acetato de amila restante, com água (sem adição posterior de barita), para remover partes residuais do primeiro extrato forte. Obtém-se o primeiro extrato, que é uma solução aquosa, fortemente pigmentada, cor vermelho-marrom, com volume aproximadamente 40 vezes menor que o do acetato de amila empregado. Filtra-se essa solução e tratasse com carvão animal “B. D. H.” (40-60 gramas por litro). Usando-se quantidade certa de carvão, perde-se, por esse tratamento, mui pouca penicilina, porém, remove-se grande parte do pigmento inativo.

Convém determinar para cada partida, numa pequena amostra, a quantidade de carvão necessária para remover o máximo de pigmento com perda mínima de atividade da penicilina.

Filtra-se a solução e lava-se o carvão residual, adicionando a água de lavagem à solução.

Resfria-se a 4°C. e junta-se 1/3 do seu volume de éter “anestésico.”

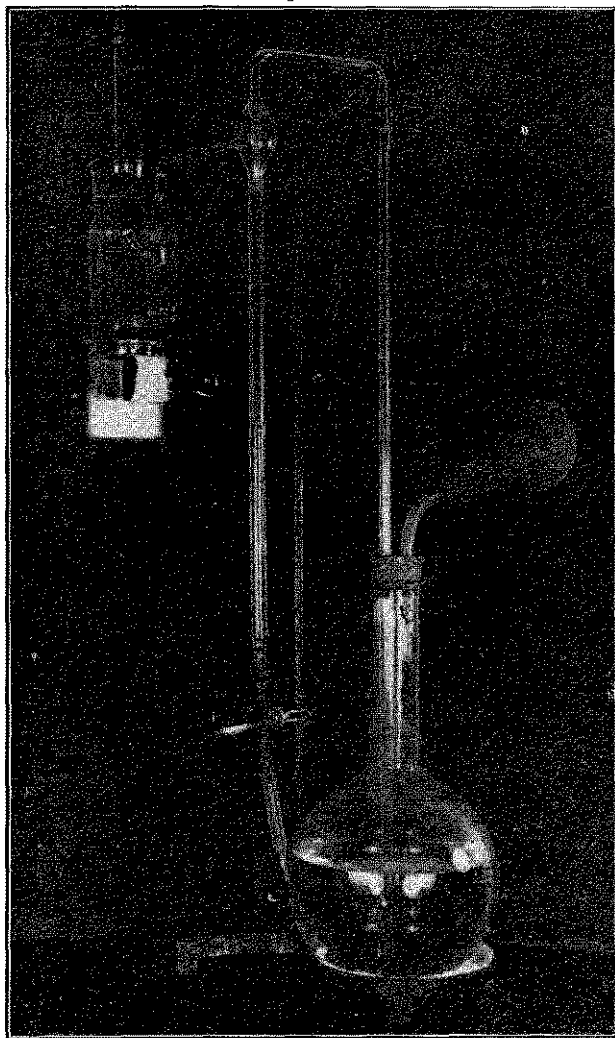
Acidifica-se a camada aquosa a pH 1.9 com ácido fosfórico a 10% e extrai-se agitando vigorosamente. Faz-se assim 3 extrações sucessivas com éter, não deixando a temperatura subir acima de 4°C.

A purificação posterior é feita por cromatografia, fazendo-se passar o extrato etéreo concentrado de penicilina através de coluna de alumina segundo BROCKMANN.

A fim de obter penicilina para nossos estudos experimentais, usamos numerosas vezes o método ora descrito e verificamos que

dá rendimento ótimo; entretanto, é muito trabalhoso e exige grandes volumes de solventes orgânicos. Tentamos por várias maneiras simplificá-lo, porém, a modificação que nos pareceu mais interessante foi a substituição do acetato de amila por $1/5$ do seu volume de acetato de butila.

Outra modificação que também achamos interessante é a substituição do hidróxido de bário (barita) por hidróxido de amônio com o mesmo título N/30.



Fotografia 8
Aparelho proposto para conservação e distribuição de solução de barita.

A solução de barita usada por ABRAHAM e colaboradores apresenta o inconveniente de ser facilmente carbonatada, por ação do CO_2 do ar. Pela formação do carbonato de bário, insolúvel, a partir do $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a solução fica com título diminuído, turva e com precipitado. O uso da barita é necessário na última fase da extração, quando se deseja obter o sal de bário da penicilina ou o sal sódico a partir do bórico. Conseguimos remover os inconvenientes que apresentam as soluções de barita conservadas em frascos que não impedem que elas fiquem expostas ao ar, com o uso de um aparelho de vidro que idealizamos em colaboração com o Dr. Mário S. Penteadó, químico-chefe do Instituto Adolfo Lutz. A fotografia 8 mostra o aparelho montado e pronto para o uso e a figura III, seus detalhes.

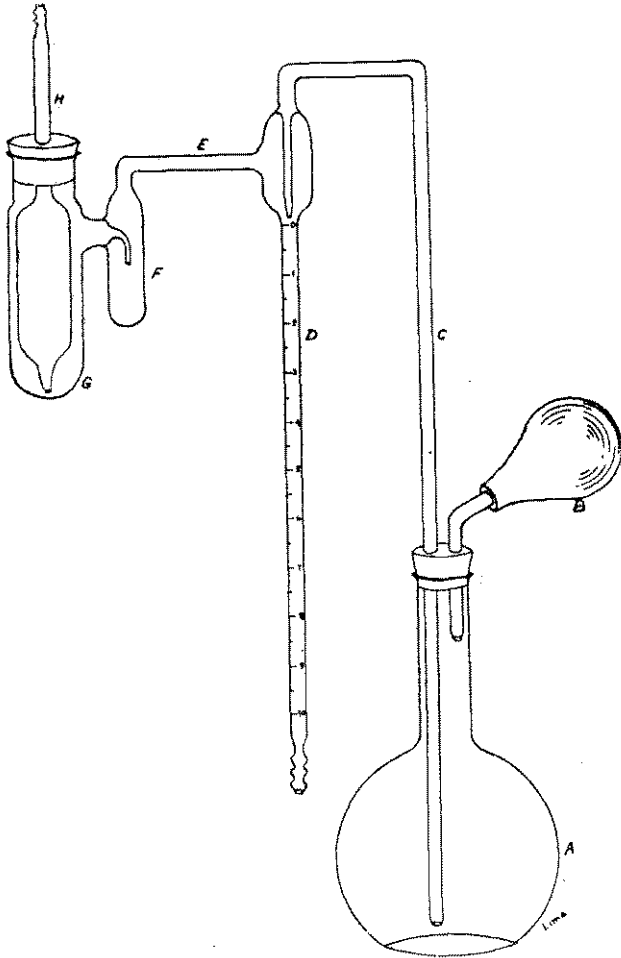


Figura III

Detalhes das partes componentes do aparelho anterior.

Consiste em um balão de vidro neutro (A) no qual se coloca a solução de barita recém-preparada; um insuflador de borracha (B) que, comprimido, faz a solução sair por um tubo de vidro (C) ligado a uma bureta calibrada (D) e também ligado a um outro tubo (E) que termina numa válvula de segurança (F) ligada a uma ampôla aberta (G). Essa ampôla contém lixívia de soda que retem o CO_2 do ar que penetra no aparelho por um tubo (H). A válvula de segurança (F), no caso de refluxo, impede que a soda passe para a bureta.

Extração pelo clorofórmio:

MEYER e colaboradores¹⁹⁵ extraíram a penicilina pelo clorofórmio usando o seguinte processo: "Acidifica-se o líquido de cultura pH 3.0-4.0, satura-se com sulfato de amônio e extrai-se com clorofórmio. Recupera-se a substância ativa do extrato clorofórmico concentrado, por meio de fosfato tampão a pH 7.2. Repete-se a extração pelo clorofórmio e tampão e separam-se os pigmentos menos ácidos da fração mais ativa, por extração em clorofórmio, em valores de pH diferentes.

Obtém-se a penicilina dos extratos concentrados, sob a forma de ácido livre, por precipitação pelo éter de petróleo, ou sob a forma de sal amônio pela saturação de solução clorofórmio-benzol com gás sêco de amônia. Se a precipitação do ácido livre fôr lenta, separam-se em grandes cristais amarelos, e de forma afilada. O sal de amônio forma pó microcristalino, amarelo escuro. Este processo tem dado resultados uniformes e o rendimento é mais que 50% da potência original".

Extração pelo álcool n-butílico

BERGER²² pesquisou solventes que extraem a penicilina de solução aquosa em pH que não prejudica a atividade. Verificou que grande porcentagem da penicilina pode ser extraída pelo álcool n-butílico de filtrado de cultura ajustado ao pH 6.4, em que a penicilina é mais estável, adicionando quantidade adequada de sulfato de amônio (800grs. para 2 litros de penicilina bruta); verificou, então, que a penicilina é quase totalmente extraída pelo álcool butílico.

A adição de sulfato de amônio tem, também, a vantagem de precipitar a maior parte do pigmento inativo.

Recupera-se novamente a penicilina em solução aquosa adicionando-se ao extrato de álcool butílico, éter de petróleo e solução diluída de bicarbonato de sódio.

Durante êste processo efetua-se uma outra purificação da penicilina, pois, algumas impurezas permanecem no éter de petróleo.

A solução aquosa concentrada de penicilina pode ser posteriormente purificada pelo método usual da extração em éter.

A técnica recomendada por BERGER é a seguinte: "Ajustam-se com ácido fosfórico, ao pH 6.4, 2 litros de líquido de cultura e nêles se dissolvem 800 gramas de sulfato de amônio. O precipitado contendo proteínas e pigmentos inativos é separado por filtração. Misturam-se 400 cm³ do filtrado com igual volume de álcool n-butílico e extrai-se por agitação. O mesmo extrato alcóolico é usado para extrair 4 outras porções de 400 cm³ de líquido de cultura. Adiciona-se aos 400cm³ do forte extrato alcóolico igual volume de éter de petróleo. Extrai-se a penicilina desta mistura agitando-a com 200 cm³ de solução aquosa de bicarbonato de sódio a 2%. Obtém-se, por êsse processo, a maior parte da penicilina do líquido de cultura, sob a forma de sal de sódio em solução aquosa".

EXTRAÇÃO PELO CARVÃO ANIMAL

Em 1935, REID, estudando a relação entre o pigmento e a substância inibidora produzida pelo *P. notatum* em meio de cultura verificou que ambos eram adsorvidos pelo carvão.

O uso do carvão animal foi recomendado por ABRAHAM e col.³ para descorar o extrato aquoso concentrado e fortemente pigmentado, que resulta da recuperação da penicilina dos solventes orgânicos usados na extração.

ABRAHAM e CHAIN⁴ usaram 8% de carvão animal "B.D.H.", com o fim de remover o pigmento inativo que prejudica o desenvolvimento do cromatograma em coluna de alumina de Brockmann. Ao experimentarmos o descoramento pelo carvão animal ativado Merck verificamos que tanto o pigmento como a substância ativa eram removidos, confirmando a observação de REID, em 1935. Apenas 0,5% do referido carvão era suficiente para descorar completamente o líquido fortemente pigmentado que continha a substância ativa.

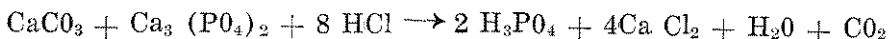
Dada a quantidade mínima de carvão usada, ocorreu-nos a idéia de fazer a adsorção da penicilina diretamente do líquido de cultura, para tentar recuperá-la posteriormente. Procuramos, pri-

meiramente, analisar o fenômeno da adsorção, em função do tempo e do pH.

Para isso distribuimos porções de 100 cm³ de penicilina bruta, com pH 7.0, em 6 frascos de Erlenmeyer e adicionamos a cada um 0,5 grama de carvão animal ativado Merck, agitamos fortemente e colocamos em geladeira. Após decorrer os seguintes tempos: 2½, 5, 15, 30, 60 minutos e 24 horas retiramos de cada vez um frasco e filtramos o conteúdo em papel de filtro. Observamos que todos os filtrados estavam completamente descorados e que em nenhum houve modificação do pH, que permaneceu neutro.

Repetimos a experiência com outro carvão animal, usado para o descoramento de vinhos e verificamos abaixamento acentuado do pH. Adicionando êsse carvão à água destilada, com pH 6.9 (determinação potenciométrica), verificamos que o pH passou a 5.0. Observamos, também, que, de um carvão para outro variava muito a capacidade de descoramento da penicilina bruta.

Essas variações podem ser explicadas pelas diferenças de processos de purificação do carvão animal bruto, que contém grande quantidade de sais de cálcio (fosfato 70% e carbonato 8%). É o tratamento por ácido clorídrico, a quente, que transforma os referidos sais em cloretos, segundo a reação:



O ácido fosfórico fornecido, não sendo completamente removido por purificação ulterior, pode ser causa do abaixamento do pH.

Lembramos êsses detalhes porque achamos que o processo de extração direta da penicilina pelo carvão animal é mais simples, mais rápido e mais econômico do que a extração por solventes orgânicos, uma vez previstas as condições ótimas para o seu uso.

Temos a impressão de que é o método mais adequado na produção industrial da penicilina. Em favor dessa idéia fala a reportagem de CALLAHAM³⁷ sobre a produção de penicilina em larga escala, na "Commercial Solvents Corporation", dos Estados Unidos.

Eis a descrição que achamos interessante: "Mediante una bomba centrifuga se hace pasar cerveza filtrada, muy ligeramente alcalina, a um tanque de absorción, de acero al carbono inoxidable, cerrado, de agitación lateral, donde se agita como por 15 minutos, aproximadamente com 2 a 2,5 de carbón activado. La penicilina y ciertos otros constituyentes son absorbidos en el carbón vegetal. Esta operación no debe prolongarse innecesariamente, pues de ser así la pérdida de penicilina será excessiva".

Como vemos, há até a indicação da porcentagem de carvão usado, porém, não encontramos referência sobre o solvente ou solventes usados para recuperação da penicilina do carvão. Então fizemos experiências nesse sentido. Após numerosas provas com os mais variados solvente orgânicos, verificamos que a acetona era o que melhor libertava a penicilina adsorvida pelo carvão animal ativado.

Encontramos o solvente, porém nos deparamos com outra dificuldade, pois, a acetona é solúvel na água em qualquer proporção, e isto impedia a reobtenção de penicilina em soluto aquoso para purificação ulterior.

Após novas tentativas conseguimos resultados satisfatórios com a associação de acetato de butila e acetona na seguinte proporção:

acetona	10 partes
acetato de butila	90 partes

Dessa forma conseguimos recuperar em água destilada, usando o processo habitual, 50% da penicilina.

Não tendo terminado essas pesquisas achamos, entretanto, útil lembrar que os carvões animais saís ativos que experimentamos foram: “Carbo-Norit-Union” (norte-americano); “Acticarbone W0” (francês); e o Carvão Descorante Tipo C” (da firma Deutchmann Leal & Cia. do Rio de Janeiro). Com êsses carvões conseguimos descoramento completo do líquido de cultura do *P. notatum* usando 0,5 a 1% e deixando meia hora em temperatura ambiente.

Calcinando 50 gramas de uma amostra de carvão ativado em mufla a 500°C. durante 1/2 hora, verificamos que aumentava o poder adsorvente com redução apreciável do peso. Após êsse tratamento o peso do carvão ficou reduzido a 38,536 gramas.

Diante desses resultados achamos que, para se obter resultados satisfatórios e constantes, o carvão deve ser preparado e ativado especialmente para adsorção de penicilina. Provas devem ser feitas para se verificar a retenção seletiva do pigmento inativo e libertação da penicilina durante a eluição.

EXTRAÇÃO PELO ACETATO DE CELULOSE

Em vista das dificuldades encontradas na eluição da penicilina adsorvida pelo carvão animal ativado, procuramos experimentar outros adsorventes para extração direta da substância antibiótica.

O óxido de alumínio, o silicato de alumínio e o kieselguhr mostraram-se péssimos adsorventes para a referida extração. O acetato de celulose, entretanto, nos parereu bom adsorvente da penicilina. Ele difere, porém, do carvão animal, por ser ativo somente em meio ácido, exigindo, por isso, refrigeração da penicilina bruta durante a extração. Apresenta, no entanto, a vantagem de libertar facilmente a penicilina em solução aquosa de fosfato tampão.

Não encontramos qualquer publicação sobre o uso do acetato de celulose na extração da penicilina; apenas tivemos informação pessoal do Dr. Areia Leão que, no Instituto Osvaldo Cruz, iniciou, em colaboração, pesquisas a respeito. Em experiências preliminares usamos o acetato de celulose, sob a forma de pó fino, que foi passado através de tamis de 900 malhas por cm^2 . Para a extração, juntamos 2% deste adsorvente, em pó, à penicilina bruta acidificada a pH 2.0, com ácido fosfórico a 10%. Durante a extração, que durou cerca de 15 minutos, a penicilina bruta foi mantida em contante agitação e em temperatura inferior a 7°C . Por termos feito somente poucos ensaios, não podemos, ainda, tirar conclusões de caráter definitivo; todavia, temos já a impressão de que o acetato de celulose é adsorvente bastante interessante para a extração direta da penicilina do meio de cultura.

PURIFICAÇÃO DA PENICILINA

Pelos processos de extração já analisados obtêm-se soluções de penicilina com apreciável grau de pureza, porém, ainda encerra uma parte de pigmento, além de outras substâncias inativas e pirogenas.

Pode-se eliminar o pigmento restante e o pirogênio por meio de adsorção seletiva em coluna (cromatograma).

CROMATOGRAFIA

O método cromatográfico de análise tornou-se conhecido desde 1906, quando o grande botânico russo TSWETT publicou uma memória sobre as matérias corantes das folhas verdes. Filtrando através de uma coluna de carbonato de cálcio, uma solução destas substâncias corantes verificou o aparecimento, na coluna, de numerosos discos de cores diferentes. Conclui TSWETT que podia, por este simples processo, separar as espécies químicas por meio de suas diferentes afinidades adsortivas. O desenvolvimento rápido da aplicação do método cromatográfico teve como ponto de partida a

separação dos carotenos isômeros (alfa e beta) por KUHON e LE-DERER. Atualmente, a análise cromatográfica entrou na técnica geral dos laboratórios químicos, pois sua aplicação não se limita aos pigmentos, porém, se estende segundo VILLSTAEDT²⁹² a todas as matérias corantes, naturais e artificiais, lipossolúveis ou hidrossolúveis. Além disso, esse método tem sido usado para separação de vitaminas, hormônios, alcalóides e, presentemente na purificação da penicilina.

ABRAHAM e CHAIN⁴ purificaram a penicilina por cromatografia em coluna de 40 centímetros de altura e 3,6 de diâmetro. Usaram como adsorvente a alumina (óxido de alumínio) preparada segundo o método de Brockmann, obtida de Savory & Moore de Londres.

Algumas experiências fizemos com a alumina Merck estandarizada segundo Brockmann, para análise cromatográfica. Essa alumina especialmente preparada para adsorção seletiva, apresenta-se sob a forma de pó branco, muito fino, cujas partículas são de tamanho padronizado. O preparo da coluna requer muito cuidado para que fique perfeitamente homogênea, condição essencial para o desenvolvimento de bom cromatograma.

As técnicas de preparo dos adsorventes, os processos de ativação dos mesmos e o modo de preparar a coluna de adsorção encontram-se detalhadamente descritas nos livros de ZECHMEISTER e CHOLNOKI³¹⁵ e VILLSTAEDT²⁹².

Outras substâncias foram também usadas para purificação da penicilina por cromatografia, como o "Florasil" da Floridin Co. Inc. Warren, Pensylvania; o "Zirconium oxide L-31546 A" da Titanium Alloy Mfg. Co., Niagara Falls, N. Y.; o "Adsorptive Powdered Magnesia N.º 2641" da Westvaco Chlorine Products Corp., Newark, California; a lã de vidro, a sílica-gel ou "Hiflo-supercel".

ABRAHAM e CHAIN⁴ fizeram passar uma solução concentrada de penicilina em éter, através de coluna de alumina, e obtiveram o desenvolvimento de um cromatograma em 4 camadas, na ordem seguinte:

- 1.º) uma camada marrom escura, de 1 cm. de altura, contendo pouca penicilina
- 2.º) uma camada amarelo-clara, de 12-14 cms. de altura, contendo a maior parte da penicilina;
- 3.º) uma camada amarelo-alaranjada, que varia em altura, contendo pequenas quantidades de penicilina;

4.º) uma camada vermelho-violácea, que não contém penicilina.

ABRAHAM e col.³ haviam verificado, pelo mesmo processo, que a primeira camada pode estar ausente e que sua espessura é inversamente proporcional à quantidade de carvão usado para o descolorimento; a segunda, que contém a maior parte da penicilina, não contém pirogênio; fica êste, quase que totalmente, na terceira camada.

Após a simples passagem do extrato etéreo concentrado não se observa um cromatograma com camadas nítidas. Consegue-se o desenvolvimento do cromatograma lavando-se a coluna, pela passagem de pequenas quantidades sucessivas de éter puro. Durante essas operações deve-se ter o cuidado de não deixar secar a coluna, mantendo-a até o fim, com um pouco de líquido, pelo menos, para evitar a formação de fendas na coluna, o que prejudicaria o cromatograma.

Das quatro camadas, somente a segunda é aproveitada para purificação posterior.

Recupera-se a penicilina da alumina fazendo-se a eluição em solução M/15 de fosfato tampão (pH 7.0).

ABRAHAM e CHAIN⁴ fizeram 4 eluições usando sempre o mesmo volume de solução tampão, porém, durante tempos diferentes, a saber: ½ hora para a 1.ª eluição; 1 hora para a 2.ª; 2, para 3.ª e 4, para a última.

Os eluados são reunidos e extraídos 3 vezes em pH 2.0, com 1/3 do seu volume de éter isento de peróxidos, a 4°C.

Recupera-se a penicilina do éter com 1/5 do seu volume de água ajustada ao pH 5.8-6.0 com barita N/30. Extrai-se outra vez em éter para fazer novo cromatograma. Mediante três cromatogramas sucessivos obtém-se a penicilina, em elevado grau de pureza.

ABRAHAM e CHAIN⁴, no terceiro cromatograma, usaram acetato de amila em lugar do éter. Após a eluição em fosfato tampão extração em acetato de amila, recuperação em água com barita N/30 e pH 6.5 obtiveram solução de sal bórico que, após secagem por liofilização deu um pó ligeiramente amarelo, com atividade de 450-500 Unidades Oxford por miligrama.

CATCH, COOK e HEILBRON⁴² introduziram nova técnica cromatográfica, que diminui as perdas de penicilina, dada sua labilidade à maioria dos processos químicos.

O novo método cromatográfico consiste na adsorção da penicilina de um solvente orgânico, como éter ou acetato de amila, em coluna com “suporte” que retenha a água. Este “suporte” resulta da associação de sílica com hidróxido ou carbonato de um metal alcalino ou alcalino-terroso. Nestas condições os ácidos mais fortes que acompanham a penicilina são retidos na parte superior da coluna, enquanto os mais fracos descem lentamente. A penicilina fica concentrada numa camada bem delgada da coluna. A atividade do sal da penicilina obtido por esse processo era de 750 unidades por miligrama, inibindo o *Staphylococcus aureus* na diluição de 1:150.000.000.

REDUÇÃO PELO AMÁLGAMA DE ALUMÍNIO

A redução pelo amálgama de alumínio constitui a última etapa da purificação da penicilina, pelo método de ABRAHAM e CHAIN⁴.

Estes pesquisadores prepararam essa liga da seguinte forma: trataram com soda a 5% fragmentos de alumínio, de 2mm², até a formação intensa de hidrogênio; lavaram demoradamente com água morna e amalgamaram, por forte agitação, durante 2 minutos com solução aquosa a 0,5% de cloreto mercúrico. Lavaram, então, os fragmentos em água, álcool e éter de petróleo; conservaram em éter de petróleo até o uso.

A técnica usada⁴ para a redução foi a seguinte: “Pesa-se 1 grama de sal de bário da penicilina purificada por cromatografia e dissolve-se em 150 cm³ de água. A esta adiciona-se 1 grama de amálgama de alumínio e 15 a 20 cm³ de éter, para evitar espuma.

À medida que se realiza a redução os ions oxidrila vão sendo libertados, a princípio rapidamente, e de modo mais lento no fim da redução.

Acerta-se continuamente o pH a 7.0, adicionando-se ácido clorídrico N/10. Geralmente, gastam-se cerca de 20 cm³ de ácido para cada grama de sal de bário da penicilina.

O pigmento amarelo é precipitado junto com o hidróxido de alumínio e a suspensão torna-se gradualmente verde.

O tempo necessário para redução completa depende da atividade do amálgama de alumínio usado, não devendo exceder de 4 horas. Centrifuga-se e filtra-se o sobrenadante que, dosado, revela uma perda de 10-25%. Resfria-se o filtrado a 4.°C. e extrai-se duas vezes com metade do seu volume de acetato de amila gelado.

Filtra-se a solução de penicilina em acetato de amila e extrai-se em 1/5 do seu volume de água, ajustando-se o pH a 7.0 com barita

N/30. ABRAHAM e CHAIN⁴ verificaram que a atividade da penicilina após a redução em amálgama de alumínio, pelo processo descrito, era aproximadamente de 300 unidades por miligrama.

OBTENÇÃO DOS SAIS DA PENICILINA

Tratando-se a solução de penicilina livre, sob a forma de ácido, por quantidade equivalente de hidróxido de cálcio, obtém-se o sal de cálcio em solução.

Se o tratamento fôr com hidróxido de bário (barita) obtém-se o sal de bário e assim por diante.

O sal de sódio pode ser obtido, tratando-se a solução de penicilina sob a forma de ácido livre pelo bicarbonato de sódio a 2%, ou hidróxido de sódio.

Preferimos obter o sal de sódio tratando as soluções concentradas de sal de bário da penicilina por uma solução de sulfato de sódio N/6, título igual ao da solução de barita usada para obtenção do sal bário. Calculado, pela bureta do aparelho que já descrevemos, o volume gasto de solução de barita N/6, adicionávamos volume igual de solução de Na_2SO_4 do mesmo título. O sal de sódio é assim obtido pelo fenômeno químico da dupla troca, com formação de sulfato de bário insolúvel, que é separado por filtração. Filtrada a solução, verifica-se se contém ainda traços de bário, pela adição de gôtas da solução de sulfato de sódio. Se ainda houver precipitação de sulfato de bário adicionam-se gôtas de solução de Na_2SO_4 até não mais se formar precipitado. Esta solução final refrigera-da é imediatamente esterilizada por filtração que precede a secagem.

SECAGEM DA PENICILINA

A secagem da penicilina é a última operação da produção e deve ser realizada logo após a obtenção das soluções concentradas de penicilina purificada.

A secagem é feita pelo chamado processo líófilo, descrito em 1935 por FLOSDORF e MUDD⁹⁹ para conservação de produtos biológicos dessecados.

O método consiste essencialmente em congelamento rápido à temperatura muito baixa e em rápida desidratação do líquido em estado de congelação sob a ação de alto vácuo. Por ação de alto vácuo dá-se verdadeira sublimação, pois o material do estado sólido (congelado) passa diretamente ao gasoso.

Após a secagem, cujo tempo varia com a técnica usada, o sal de penicilina se apresenta sob a forma de pó.

Nas indústrias, a secagem da penicilina é feita diretamente nos frascos que são distribuídos para o consumo.

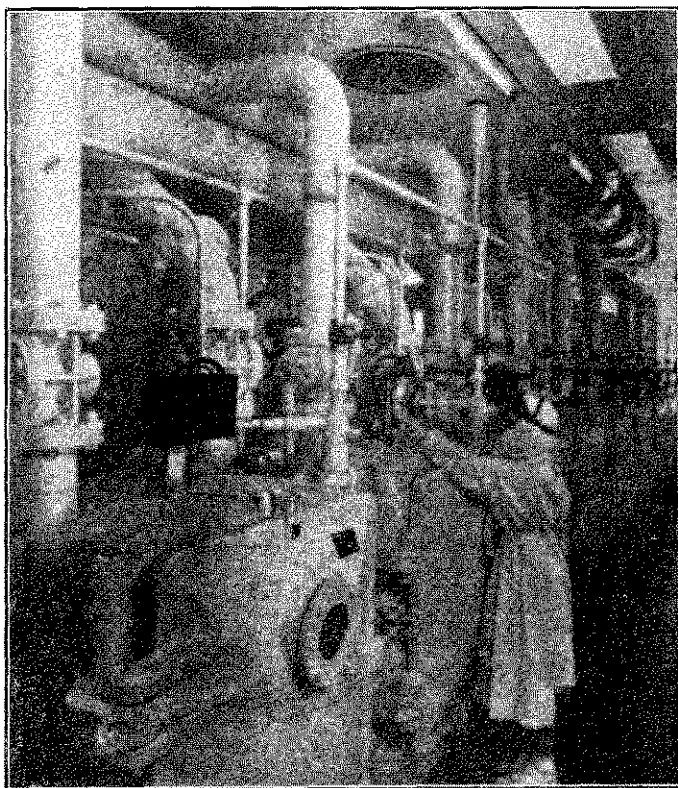
Usamos, para congelar as soluções de sal sódico, mistura de neve carbônica e álcool etílico que deve ter temperatura de 30° — 40°C abaixo de zero.

Fizemos a secagem em jarra de vidro usada em bacteriologia para secagem de culturas. Obtivemos o sal sódico, sob a forma de pó, após cêrca de 48 horas.

POMES e IRVING²¹⁷ descreveram um aparelho para liofilisação de produtos em pequena escala.

FLOSDORF¹⁰⁰, em publicação recente, analisou minuciosamente o processo líófilo de secagem, em larga escala, da penicilina.

A fotografia 9 (reproduzida de "Life", 17-7-1944), mostra os aparelhos de secagem de uma indústria norte-americana.



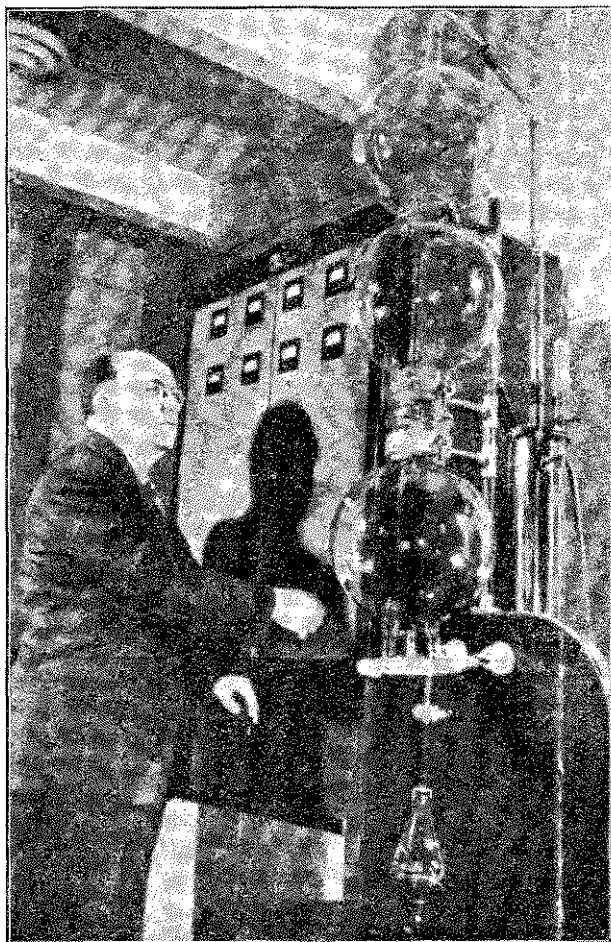
Fotografia 9

Aparelhos para secagem da penicilina a alto vácuo e baixa temperatura.

Recentemente o Dr. George H. Brown, engenheiro da "Radio Corporation of America Laboratories", inventou novo aparelho com instalação electrônica que permite secagem de penicilina em 30 minutos.

O aparelho é provido de um gerador electrônico (2.000 watts) que faz a solução de penicilina entrar em ebulição a 10°C. sob vácuo moderado.

Com êste aparelho cêrca de 2 litros de solução de penicilina podem ser secados em 1 hora. Vemo-lo na fotografia 10 (reproduzida de "Squibb Sales Bulletin", 1944).



Fotografia 10
Aparelho com instalação electrônica para secagem rápida da penicilina.

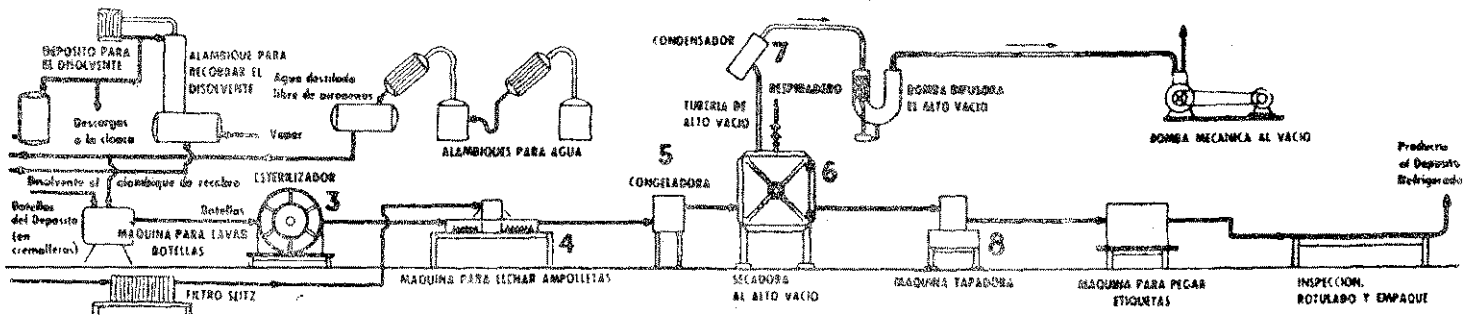
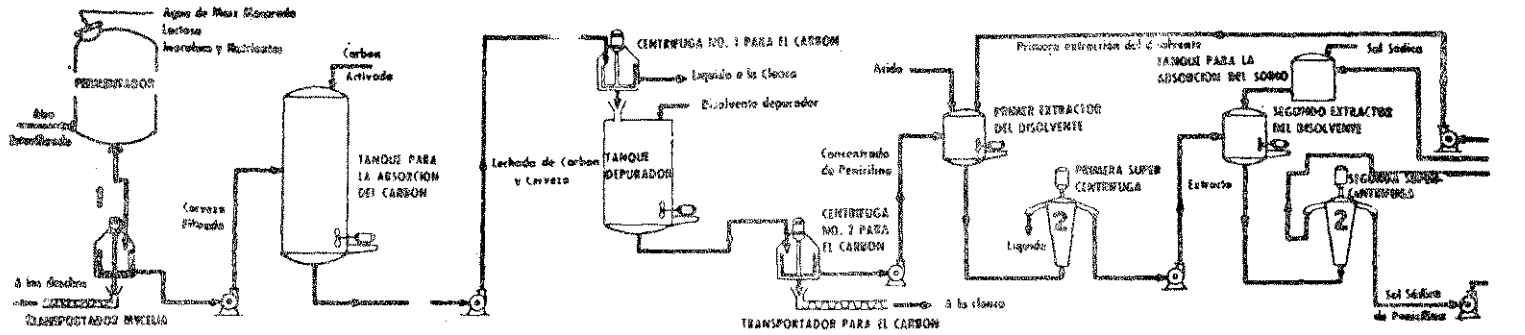


Figura IV
Esquema mostrando as diferentes fases da produção da penicilina em grande escala (segundo Callahan 37).

IV

CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA PENICILINA

A exata constituição química da penicilina parece ser ainda problema que continua a desafiar a argúcia de numerosos químicos. Porfiadamente trabalham pesquisadores dos Estados Unidos e da Inglaterra por conhecê-la, visando a tão almejada síntese. Os obstáculos residem, essencialmente, nas dificuldades de obtenção da penicilina em estado de absoluta pureza.

Foi relatada por WEINTRAUB³⁰⁴ a notícia de que a penicilina foi isolada em forma cristalina pura; entretanto, a informação sobre a sua estrutura e síntese é, presentemente, considerada segredo militar.

Pelos estudos feitos com preparações parcialmente puras estabeleceu-se que a penicilina é ácido orgânico que reage quimicamente para formar sais e ésteres.

Em 1941, CHAIN⁴⁴ afirmou que a penicilina é ácido forte com 2, ou múltiplo de 2, grupos ácidos. Em sua constituição encontram-se 2 grupos OH, não se verificando presença de grupos metoxílicos. As fórmulas brutas propostas para a penicilina e seus sais apresentam algumas variações. Para o ácido livre, MEYER e colaboradores¹⁹⁵ propuseram a fórmula $C_{14}H_{19}NO_6$ ou $C_{14}H_{17}O_5N \cdot H_2O$

SAIS DA PENICILINA

ABRAHAM e CHAIN⁴⁴ fizeram a análise elementar de um sal de bário purificado por cromatografia e redução em amálgama de alumínio e admitiram para esse sal (com peso molecular 645) as fórmulas: $C_{24}H_{32}O_{10}N_2Ba$ ou $C_{23}H_{30}O_9N_2Ba$.

CATCH, COOK e HEILBRON⁴², após a purificação cromatográfica da penicilina em coluna de sílica ou "Hiflo-Supercel", obtiveram um sal de estrôncio com 750 Unidades Oxford, ao qual atribuíram a fórmula: $C_{24}H_{34}O_7N Sr$.

ABRAHAM, CHAIN e HOLIDAY⁶ prepararam um sal de bário purificado, cuja atividade era de 450-500 unidades/mgr. Pela análise evidenciaram a presença, na molécula, de uma carbonila, de uma carboxila latente e dois grupos acetiláveis, e, pelo menos cinco grupos C-Me. (grupo metila ligado ao carbono: C.CH₃).

Verificaram, também, que no sal de bário não havia duplas ligações facilmente redutíveis, assim como núcleos aromáticos evidenciáveis pelo espectro de absorção. Sugeriram para este sal a fórmula já referida C₂₄H₃₂O₁₀N₂Ba.

ABRAHAM e colaboradores⁵ fizeram a análise elementar de numerosas preparações de penicilina e verificaram que o teor em C e em H não varia muito. O teor em N, entretanto, aumenta com a atividade¹⁹⁵.

A análise elementar do sal mais ativo de bário foi feita após a secagem a 100°C. em vácuo, que revelou perda de 6,5% em peso. A porcentagem encontrada dos elementos foi a seguinte:

Carbono	44,30
Hidrogênio	4,85
Nitrogênio	4,13
Bário	22,00
C. CH ₃	11,60

Os referidos pesquisadores em dosagens em separado, encontraram 21,3% de Ba e 4,2% de N (pelo método de Conway, modificado por Kjeldahl). Não verificaram a presença de fósforo (P), enxofre (S) e grupos metoxílicos (O-Me) ou metílicos ligados ao nitrogênio (N-Me). Admitiram, ainda, a fórmula C₂₄H₃₂O₁₀N₂Ba, porém não excluíram a possibilidade da existência de um átomo de carbono a mais ou a menos (C²³ e C²⁵).

Além dos sais de bário e estrôncio, foram obtidos os sais de sódio, cálcio, amônio, zinco, níquel e cádmio²⁵¹.

O sal de cálcio e, especialmente, o de sódio são os mais usados em terapêutica.

PENICILINA X

A penicilina X, também referida como “fator X” ou “alopenicilina”, é sal sódico da penicilina, obtido sob a forma cristalina.

WELCH e outros³⁰⁶ verificaram que a penicilina X difere em algumas propriedades da penicilina sódica comercial e também do

sal sódico cristalino da penicilina, referido também como penicilina G cristalina³⁰⁶.

Êstes autores usaram a penicilina X obtida por intermédio do Dr. Robert D. Coghil do "Nothern Regional Research Laboratory" e dos seguintes fabricantes norte-americanos: "Upjohn Company", "Cutter Laboratories" e "Cheplin Biological Laboratories".

As dosagens, pelo método do cilindro em placa, revelaram que a penicilina X cristalina possui, aproximadamente, 900 unidades por miligrama, enquanto o sal sódico cristalino (penicilina G) dosa 1.650 Unidades Oxford por miligrama. Welch e outros³⁰⁶ verificaram, por estudos preliminares, que a penicilina X é três a cinco vêzes mais ativa do que a penicilina comercial, na proteção de camundongos inoculados com 10.000 doses letais de pneumococos do tipo I. A penicilina X também mostrou-se mais ativa para uma raça de *Klebsiella pneumoniae* tipo A e para uma raça de *Bacillus cereus*. Entretanto, provas feitas com quatro raças de *Staphylococcus aureus* não revelaram diferença de atividade entre a penicilina X e as preparações comerciais de penicilina.

DERIVADOS DA PENICILINA

ESTERES DA PENICILINA

MEYER, HOBBY e DAWSON¹⁹⁷ obtiveram ésteres da penicilina (etil e n-butil) tratando-a, respectivamente, por diazoetana e diazobutana.

Êstes ésteres, além de mais estáveis do que a penicilina, agem também por via oral por serem mais resistentes à ação dos ácidos da secreção gástrica.

As experiências feitas em camundongos revelaram que êstes ésteres são 2 a 3 vêzes mais tóxicos que a penicilina. A dose terapêutica para administração oral é dez vêzes maior que a injetável e se aproxima muito da dose tóxica.

PENICILAMINA

Por hidrólise ácida (ácido sulfúrico 0,1N) do sal de bário da penicilina a 100°C. durante 1 hora, e precipitação da base formada por uma solução concentrada de cloreto mercúrico, ABRAHAM e colaboradores² obtiveram um aminoácido, ao qual denominaram penicilamina. A penicilamina parece não ter a estrutura típica de um aminoácido, pois, aquecida com ninidrina a pH 2.5

produz CO₂ lenta e incompletamente. A determinação do pêso molecular e as análises indicam como fórmulas possíveis as seguintes: C₈H₁₁O₄N. Cl. H₂O ou C₆H₉O₃N. -HCl. 2H₂O.

A penicilina dá coloração azul intensa com o cloreto de ferro, reduz o nitrato de prata amoniacal, dá coloração verde por aquecimento ligeiro com solução de Fehling e reduz o iodo em solução ácida, fria.

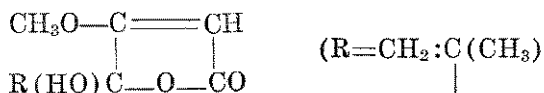
A penicilamina parece ser òticamente inativa, enquanto o sal de bário da penicilina em solução aquosa e dextrorrotatório.

ACIDO PENICILICO

DUFFIN e SMITH ⁷⁴ obtiveram, também, por hidrólise de um sal de bário da penicilina, uma substância òticamente ativa, com caracteres de um aminoácido, à qual denominaram ácido penicílico.

O ácido penicílico é destrorrotatório e o seu rendimento a partir do sal de bário é proporcional à atividade biológica da penicilina. Apresenta algumas propriedades dos aminoácidos; dá coloração azul-púrpura com a ninidrina; é precipitado pelo bicloreto de mercúrio e ácido fosfo-túngstico. Ao contrário da penicilamina não dá coloração azul com o cloreto férrico.

OXFORD, RAISTRICK e SMITH ²¹² isolaram de culturas do *Penicillium puberulum* Bainier e do *Penicillium cyclopium* Westling o ácido penicílico propondo-lhe a fórmula:



O ácido penicílico apresenta ação inibidora sôbre o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, porém, o ácido dihidro-penicílico de radical (CH₃)₂CH é destituído de ação antibacteriana.

V

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA PENICILINA

ASPECTO

A penicilina, sob a forma de ácido livre, obtido por MEYER e colaboradores ¹⁹⁵, apresenta-se com aspecto de grandes cristais amarelos e de forma afilada. Os sais de sódio, de cálcio e de bário apresentam-se sob a forma de pó amarelo, de tonalidade muito variável.

Parece que a cor é menos intensa nas preparações mais puras. Um sal branco de bário com 240 unidades/mgr. foi referido por ABRAHAM ² em 1941. As soluções diluídas dos sais de penicilina são, também, amarelas, lembrando a cor das soluções aquosas de ácido pícrico.

SOLUBILIDADE

A penicilina livre é muito solúvel na água, éter, acetona, álcool etílico, álcool n-butílico, acetato de amila, acetato de etila e acetato de butila. ABRAHAM e CHAIN ⁴ verificaram que é também muito solúvel na ciclohexanona e dioxana. Sua solubilidade é menor no clorofórmio, benzeno e tetra-cloreto de carbono.

A penicilina sódica é insolúvel nos óleos de amendoim e de algodão. Misturando-a com esses óleos pode-se obter suspensão homogênea.

Os sais da penicilina são muito solúveis em água destilada, solução fisiológica ou sêro glicosado isotônico, sendo, provavelmente, insolúveis em tôdas as substâncias oleosas.

HIGROSCOPICIDADE

A penicilina sob a forma de ácido livre é higroscópica perdendo, por isso, rapidamente, sua atividade, pela exposição ao ar ⁴.

Sob a forma de sais de sódio, potássio e amônio a penicilina é também muito higroscópica, sendo-o menos o sal de cálcio e não higroscópico o sal de bário.

DIFUSIBILIDADE

Recentemente FRIEDEN¹¹⁰ fez estudos preliminares sobre a constante de difusão da penicilina.

As determinações foram feitas com sal sódico dosando 250-300 Unidades Oxford/mgr., em pH variando de 4.0 a 8.0 e à temperatura de 5°C.

Esse autor, usando a técnica da "Sintered glass membrane", observou mudanças na constante de difusão com a diminuição do pH e achou que eram devidas, provavelmente, à conversão do sal da penicilina em forma ácida.

CHOW e MAC KEE⁵³ fizeram experiências de diálise com penicilina e puderam demonstrar que ela se combina com a albumina do sêro sanguíneo humano.

A prova foi feita colocando 7 cm³ de solução de albumina em tampão de pH 7.8, contendo 187 Unidades Oxford, num saco de celofane equilibrado com 14 cm³ de solução fosfato tampão com o mesmo pH e concentração de penicilina. Após 18 a 24 horas de diálise a 1°C., o líquido exterior (fosfato tampão) continha apenas 151 unidades e o líquido interno (penicilina e albumina em tampão) 284 Unidades Oxford.

FILTRABILIDADE

FLEMING, em 1929, havia verificado que a passagem da penicilina bruta através de um filtro de Seitz não diminuía a atividade antibacteriana, achando ser êste o melhor método de obter caldo de cultura do cogumelo, estéril e ativo.

Para as soluções de penicilina purificada achamos preferível o uso de velas de porcelana, principalmente quando se deseja filtrar pequenos volumes de solução.

As placas de Seitz, que nem sempre dão filtrado estéril, retêm como o papel de filtro, por adsorção, um pouco de penicilina.

Fizemos passar uma solução de penicilina em álcool n-butílico através de uma coluna de sacarose em pó e verificamos que passa livremente, sem perder a atividade.

PROPRIEDADE ANTILUMINESCENTE

RAKE e colaboradores²³⁰ calcularam as relações entre a atividade antiluminescente (AL) e a atividade antibacteriana (AB) de numerosas substâncias antibióticas com vários graus de pureza.

Verificaram que, para as substâncias puras, as relações $\frac{AL}{AB}$ permanecem constantes para tôdas as partidas.

Qualquer variação nessa relação indicaria presença de impurezas na substância.

Os autores verificaram que a penicilina não tem atividade antiluminescente porque seu alto poder antibacteriano determina desaparecimento gradual de luminescência.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH

A penicilina é substância muito lábil, tendendo a perder progressivamente a atividade antibacteriana. As soluções aquosas de penicilina, especialmente em condições inadequadas de temperatura e de pH, tornam-se inativas com extrema rapidez.

FLEMING⁸⁸ havia verificado, em 1928, que o aquecimento em autoclave a 115°C, durante 20 minutos, destrói a penicilina.

A penicilina bruta aquecida a 100°C, durante 5 minutos, não é destruída; mas, se o aquecimento durar 10 minutos, torna-se inativa. O aquecimento a 90°C., durante 1 hora, a destrói; mantém-se, porém, ativa após aquecimento durante 55 minutos a 90°C, ou 75 minutos a 80°C.²⁴⁰

REID²⁴⁰ tentando separar a substância ativa do líquido de cultura por destilação em baixa temperatura, com vácuo suficiente para produzir a fervura a 42° — 52°C., verificou que tanto o resíduo como o destilado haviam perdido a atividade.

CLUTTERBUCK e colaboradores⁵⁷ verificaram que a penicilina é mui facilmente inativada por oxidação, evaporação em vácuo a 40-45°, quer em soluções ácidas (pH 2.0 e 3.5), quer em alcalinas (pH 8.0), sendo moderadamente estáveis em pH 5.0 — 6.0.

T'UNG²⁸² conseguiu reduzir o volume de penicilina bruta, com grande aumento de título, por processo de concentração em baixa temperatura, com vácuo parcial. Verificou que após queda inicial do título, êste se mantém por 6 meses conservando-se o produto concentrado em geladeira.

FOSTER e WILKER¹⁰³ verificaram que a pasteurização a 60°C., durante 30 minutos, de soluções estéreis de penicilina, determina perda da atividade de 16 a 37%. A penicilina fôra dissolvida em fosfato tampão M/50 com pH 7.2.

Tôdas as preparações de penicilina, em solução neutra, ácida ou alcalina, aquecidas a 100°C durante 1-2 horas, perdem CO₂. A quantidade de gás carbônico desprendido aumenta com o grau de pureza da preparação, e com o sal mais puro de bário a perda de CO₂ é de uma molécula por átomo de Ba⁴.

Segundo ABRAHAM e CHAIN⁴ a penicilina em solução aquosa é mais estável em pH entre 5.5 e 7.5, conservando sua atividade a 0°C. por vários meses, a 25°C. por várias semanas e, a 37°C, por 24 horas.

FOSTER e WILKER¹⁰³ verificaram que a estabilidade da penicilina é maior entre pH 4.8 e 7.9 e a inativação é rápida além desses extremos.

Esses pesquisadores prepararam soluções tamponadas com os seguintes valores de pH: 2.0, 2.6, 2.9, 4.8, 5.8, 6.8, 7.9, e 10.3. Estas soluções adicionadas da mesma quantidade de penicilina e mantidas a 28-30°C. foram dosadas periódicamente pelo método turbidimétrico. As dosagens feitas até 151 horas revelaram que o máximo de estabilidade foi em pH 5.8.

SCHMIDT e MOYER²⁶¹ verificaram que as soluções aquosas de penicilina são mais estáveis em pH 6.0 do que em 7.0.

BERGER²² acha que o pH de maior estabilidade é 6.4. A estabilidade das soluções de penicilina em determinado pH depende da temperatura; quanto mais elevada fôr a temperatura, maior a inativação.

Em pH 2.0 uma solução de sal de bário conserva sua atividade durante 60 minutos, pelo menos, a 0°C.; a mesma solução a 25°C. começa a perder o título após 5 minutos.

SUBSTÂNCIAS QUE INATIVAM A PENICILINA

Interessantes estudos foram feitos por ABRAHAM e CHAIN⁴ sobre as substâncias que inativam a penicilina.

Analisaram a inativação por ions metálicos, álcoois primários, bases, agentes oxidantes, reagentes das cetonas. Além desses agentes químicos, a penicilina é inativada pela penicilinase, substância elaborada por certas bactérias: *Escherichia coli*⁴ e *B. subtilis*²⁸⁸.

Inativação por Ions Metálicos — Enquanto se preparavam sais da penicilina verificou-se que grande número de ions metálicos inativam a penicilina ⁴. Os metais que revelaram maior poder inativante foram: cobre, chumbo, zinco e cádmio, porém, outros metais pesados, tais como o níquel, mercúrio e urânio também produziram inativação.

O mecanismo desta inativação ainda não é bem conhecido. Ela constitui fenômeno irreversível, pois, não se consegue recuperar a atividade da penicilina pela acidificação e extração em éter.

Inativação por Alcoois Primários — No álcool metílico o sal de bário permanece ativo durante 3 horas em temperatura ambiente; a 37°C. perde 80% da atividade e a 50°C. sofre inativação completa. As soluções aquosas de contróle não sofreram perdas apreciáveis da atividade ⁴.

No álcool etílico o sal de bário não é solúvel em temperatura ambiente, mas, o é a 50°C, temperatura em que perde 50% da atividade, em 3 horas ⁴. No etileno-glicol durante 15 horas, a 37°C. a referida penicilina torna-se completamente inativa.

Na maioria das pesquisas é usado o sal de bário que, por não ser higroscópico, é o mais adequado para provas químicas.

Inativação por Bases — A amônia, anilina e quinina sob a forma ionizada não inativam a penicilina ⁴. Passando-se a amônia seca através de uma solução de penicilina livre em éter, sem umidade, forma-se um precipitado inativo. Pela adição de anilina ou quinina à solução de penicilina em éter, sem umidade, produz-se inativação parcial. ⁴

Ação dos Agentes Oxidantes — A penicilina é facilmente oxidada pelos agentes oxidantes como água oxigenada, permanganato e e ferrocianeto alcalino, com perda da atividade. A penicilina purificada não reduz a solução de Fehling, com a formação do óxido cuproso, quer a frio, quer a quente, porém, muda a côr, de azul para verde ⁵

Ação dos Reagentes das Cetonas — A penicilina perde sua atividade permanecendo 3 horas a 37°C. com excesso de hidrazina, mesmo em pH 7.0. Com excesso de hidroxilamina em pH 6.0 a inativação se verifica após 6 horas, em temperatura ambiente.

Inativação pela Penicilinase — ABRAHAM e CHAIN ¹ observaram em 1940 que extratos de *Escherichia coli* destróem a penicilina. Acharam que o princípio inativador era uma enzima, penicilinase, porque sua atividade é destruída pelo aquecimento a 90°C. durante

5 minutos, não é dialisável através membrana de celofane, e, em pH 6.0.

A ação inativadora da penicilinase é reduzida em pH 5.0, mas aumenta, consideravelmente, à medida que o pH se aproxima da zona alcalina, sendo, entretanto, instável em pH 9.0. Ainda não está bem esclarecido o mecanismo da inativação da penicilina pela penicilinase. Temos a impressão de que êsse mecanismo deve ser semelhante ao da inativação da sulfanilamida pelo ácido p-amino-benzóico, libertado pela autólise de germes e de células do organismo. Partindo dêste fato, JANEWAY¹⁵¹ propôs a adição do ácido p-amino-benzóico (1%) aos meios de cultivo para obter culturas positivas de bactérias inibidas pela sulfanilamida no sangue de indivíduos septicêmicos em tratamento por essa substância. Baseando-se nisso HARPER¹²⁸, com culturas de *Escherichia coli*, preparou a penicilinase para ser usada como inibidor da penicilina nos meios comuns de cultura. É necessário pois, inativar a penicilina, no exame bacteriológico do sangue ou de exsudatos de pacientes em tratamento com penicilina, admitida a possibilidade da existência de germes vivos inibidos pela sua ação bacteriostática.

Do mesmo modo, é necessário inativar a penicilina ao se fazer o contrôle de esterilidade de produtos que a contenham.

UNGAR²⁸⁸ entre muitas substâncias químicas e biológicas experimentadas para inativar as propriedades da penicilina, encontrou uma, penicilinase, produzida por uma raça de *B. subtilis*. Primeiramente preparou a penicilinase semeando o *B. subtilis* em ágar; depois usou método mais simples, em caldo, que é o seguinte: Faz-se crescer o germe em garrafa com 100 cm³ de caldo de digestão pela papaína, a 37°C, durante 2 ou 3 dias; o líquido metabólico é então esterilizado por filtração em Seitz. Verificou que 1 cm³ de diluição a 1/250 do líquido de cultura filtrado inativa 50 Unidades Oxford de penicilina, após 4 horas de incubação.

As provas de contrôle mostraram que o líquido metabólico de cultura do bacilo coli não possuía efeito antagônico sobre a raça de *Staphylococcus aureus* usada como germe de prova.

Nas provas rotineiras de esterilidade, UNGAR adicionava o filtrado contendo penicilinase às amostras de penicilina sob a forma seca ou diluída. Adicionando 1 cm³ do filtrado à 3.000-4.000 Unidades Oxford e deixando em contacto na estufa a 37°C., verificou que, após 24-48 horas, a penicilina era inativada. Segundo UNGAR²⁸⁸ a penicilinase do *B. subtilis* é superior à coli-penicilinase

de HARPER¹²⁸, que apresenta as desvantagens de ser turva e variar de atividade.

UNGAR²⁸⁸ verificou que havia diminuição na produção da penicilinase adicionando ao caldo de digestão pela papaína, glicose a 1% ou 5-10% de sôro sanguíneo humano. Verificou que em pH 5.0-6.0 a produção é melhor do que a 7.5. O aquecimento a 80°C, durante 30 minutos, destruiu parte da atividade da penicilinase.

Conservada em geladeira durante 3-4 semanas a penicilinase não revelou diminuição de atividade.

LIEBERMANN e outros¹⁶⁹ descreveram um método de obtenção de penicilinase, purificada, sêca e estéril e verificaram que é superior à clarase usada por LAWRENCE^{162 e 163} para a prova de esterilidade da penicilina.

VI

DOSAGEM DA PENICILINA

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A penicilina, diferindo dos antissépticos químicos comuns, por sua instabilidade, pela ação seletiva sobre os germes e pela ação essencialmente bacteriostática, requer processos especiais para a dosagem de sua atividade. A característica distinta da penicilina é a capacidade de inibir o crescimento normal de determinadas bactérias. Assim sendo, o único critério satisfatório é o grau de inibição do crescimento bacteriano determinado pelas preparações de penicilina.

Em certos meios de cultura o grau de inibição do crescimento bacteriano é proporcional à concentração de penicilina.

Em essência, todos os métodos até agora propostos diferem apenas na maneira, no mecanismo usado para a medida da inibição.

Na dosagem da penicilina resultados inteiramente falhos podem ser obtidos por qualquer método, a menos que seja demonstrado que a atividade antibacteriana total da amostra seja devida exclusivamente à penicilina.

Devemos levar em conta este fato porque vários autores verificaram que as culturas de *Penicillium notatum* podem conter, além da penicilina, outra substância antibacteriana COULTHARD e colaboradores⁶⁷ denominaram-na notatina, que parece idêntica à penatina de KOCHOLATY¹⁵⁶, à penicilina B de ROBERTS e colaboradores²⁴⁵, e ao chamado fator coli de WAKSMAN e WOODRUFF.

Devemos lembrar que a notatina possui ação antibacteriana somente em presença de glicose. Por isso o meio de dosagem da penicilina não deve conter glicose e é preciso levar em conta que os filtrados de cultura do *Penicillium* contém, invariavelmente, resíduos de carboidratos e que a quantidade de glicose incorporada ao meio de dosagem com a amostra em ensaio é suficiente para que se exerça a ação da notatina.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁵ verificaram que pequena quantidade de solventes orgânicos que se encontram nas soluções de penicilina durante as várias fases de extração torna, por seu efeito inibidor, o título da penicilina aparentemente maior do que realmente é.

Depreende-se, disso, que as amostras de penicilina para dosagem devem ser em soluções aquosas e quanto possível não conterem outros solventes, pois, o germe de prova, o *Staphylococcus aureus*, não cresce em água contendo 3% de acetato de amila, acetona ou clorofórmio. Concentrações maiores de éter não afetam o crescimento desse germe, provavelmente por ser este solvente mui volátil e desprender-se rapidamente do meio de cultura.

DESIGNAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Vários termos têm sido usados para exprimir a atividade bacterioinibidora da penicilina, como a diluição, o número de miligramas e o de Unidades Oxford. A avaliação só pelo peso não apresenta interesse por ser a penicilina, como sabemos, substância instável cujo poder antibacteriano tende a diminuir, com muita facilidade.

A fim de tornar possível a comparação de resultados de dosagens nos diferentes laboratórios e reduzir ao mínimo a variação de títulos obtidos pelo mesmo método, um grupo de pesquisadores de Oxford³ introduziu, não só o conceito de unidade de penicilina assim como o uso, tácitamente obrigatório de uma preparação padrão de penicilina.

O título de qualquer amostra de penicilina é obtido diretamente, por comparação com o padrão original ou, indiretamente, por meio de padrões secundários cujos títulos foram estabelecidos de acordo com o padrão primário de Oxford. Unidade Oxford foi o termo criado para exprimir a atividade da penicilina, depois também usou-se a denominação Unidade Florey em homenagem ao Professor Florey, da Universidade de Oxford.

O uso de padrão nas dosagens diárias, ao lado das soluções desconhecidas, reduz as variações determinadas pelas pequenas mudanças no meio, condição e quantidade do inoculum, tempo de incubação, etc.. uma vez que os padrões e as soluções a serem dosadas são presumivelmente afetados de modo igual.

Embora o grupo de Oxford tenha explicado a origem da unidade de penicilina, não é permissível a outros laboratórios esta-

belecer do mesmo modo a padronização de suas próprias preparações¹⁰⁵.

Hoje a idéia de dosagem em Unidades Oxford compreende a comparação *quer direta, quer indireta com o padrão original de Oxford*.

UNIDADE OXFORD

Os pesquisadores de Oxford, ABRAHAM, CHAIN, FLETCHER, GARDNER, HEATLEY, JENNINGS e FLOREY³ quando, a princípio, fizeram estudos sobre a penicilina, prepararam u'a amostra padrão que podia ser usada como referência para avaliar novas preparações. Estabeleceram, em 1941, uma unidade arbitrária hoje chamada Unidade Oxford (U. O.).

Os pesquisadores de Oxford³ usaram como padrão uma preparação de penicilina, purificada, diluída em fosfato tampão, saturada com éter e que, conservada em geladeira, manteve sua atividade durante 3 meses. Usando um método de determinação do grau de inibição do crescimento de uma raça de *Staphylococcus aureus* em placas de ágar, adotaram como unidade arbitrária (enquanto a penicilina não fôsse obtida em estado de pureza química) "a quantidade de penicilina que, dissolvida em 1 cm³ de água, produz inibição igual à do padrão". A referida solução padrão dava uma zona de inibição, com diâmetro igual a 24 milímetros.

FLOREY e JENNINGS⁹⁷, em 1942, definiram a Unidade Oxford como sendo: "a quantidade mínima de penicilina que, dissolvida em 50 cm³ de caldo de carne, inibe completamente o crescimento da raça do *Staphylococcus aureus* de prova".

Para calcular o número de unidades por miligrama é suficiente dividir a diluição máxima de penicilina que inibe o crescimento do *S. aureus* por 50.000. Assim temos:

$$\frac{\text{Diluição máxima inibidora}}{50.000} = \text{número de unidades por mgr.}$$

A maioria dos autores consideram correspondentes as duas definições dadas, à Unidade Oxford, pois com a mesma preparação de penicilina, dosada em condições adequadas, em placas de ágar ou em tubos de caldo, obtém-se praticamente o mesmo título em Unidades Oxford.

SCHMIDT e MOYER²⁶¹, do "Northern Regional Research Laboratory" de Peória, dizem ter recebido notificação de pesquisadores ingleses de que o termo "Unidade Oxford" seria usado em lugar de "Unidade Florey", que tem aparecido em algumas publicações norte-americanas.

MÉTODOS DE DOSAGEM

Os métodos de dosagem da penicilina podem ser divididos em 2 grupos: 1.º) Métodos qualitativos; 2.º) Métodos quantitativos. As dosagens pelos métodos dos dois grupos são todas feitas "in vitro", avaliando-se o grau de inibição do crescimento de determinadas bactérias penicilino-sensíveis, em meios de cultura sólidos ou líquidos. As determinações qualitativas são geralmente feitas em placas de ágar comum ou outro meio adequado, enquanto as dosagens quantitativas podem ser feitas tanto com meios sólidos em placa ou meios líquidos em tubos.

Para facilidade de estudo, podemos subdividir os dois grupos de métodos de dosagem de penicilina da seguinte forma:

1.º) Qualitativos	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Provas com o cogumelo em crescimento</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Método da goteira em placa</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Método da cavidade em placa</td> <td></td> </tr> </table>	Provas com o cogumelo em crescimento		Método da goteira em placa		Método da cavidade em placa								
Provas com o cogumelo em crescimento														
Método da goteira em placa														
Método da cavidade em placa														
2.º) Quantitativos	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Método do cilindro em placa</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Método das diluições seriadas</td> <td style="border-left: 1px solid black; padding-left: 5px;"> <table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">em placas</td> <td style="padding-left: 5px;"> <table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Schmidt e Moyer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Fleming</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Rammelkamp</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">em tubos</td> <td></td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Método turbidimétrico</td> <td></td> </tr> </table>	Método do cilindro em placa		Método das diluições seriadas	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">em placas</td> <td style="padding-left: 5px;"> <table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Schmidt e Moyer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Fleming</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Rammelkamp</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">em tubos</td> <td></td> </tr> </table>	em placas	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Schmidt e Moyer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Fleming</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Rammelkamp</td> </tr> </table>	Processo de Schmidt e Moyer	Processo de Fleming	Processo de Rammelkamp	em tubos		Método turbidimétrico	
Método do cilindro em placa														
Método das diluições seriadas	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">em placas</td> <td style="padding-left: 5px;"> <table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Schmidt e Moyer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Fleming</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Rammelkamp</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">em tubos</td> <td></td> </tr> </table>	em placas	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Schmidt e Moyer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Fleming</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Rammelkamp</td> </tr> </table>	Processo de Schmidt e Moyer	Processo de Fleming	Processo de Rammelkamp	em tubos							
em placas	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Schmidt e Moyer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Fleming</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Processo de Rammelkamp</td> </tr> </table>	Processo de Schmidt e Moyer	Processo de Fleming	Processo de Rammelkamp										
Processo de Schmidt e Moyer														
Processo de Fleming														
Processo de Rammelkamp														
em tubos														
Método turbidimétrico														

MÉTODOS QUALITATIVOS

Os métodos qualitativos pela sua simplicidade de execução, são úteis para a verificação da presença de penicilina, de substâncias antibióticas em geral, e para a avaliação grosseira da capacidade de inibição em relação às bactérias. Essas provas são feitas em meios sólidos, geralmente em placas de ágar comum ou outro meio adequado.

PROVAS COM O COGUMELO EM CRESCIMENTO

Esse processo foi inicialmente usado por FLEMING, para verificar a elaboração de substâncias antibacterianas por culturas de cogumelos.

É processo de extrema simplicidade, que consiste em fazer crescer o cogumelo num dos lados de uma placa de ágar (ou outro meio adequado) e semear, em tempos diferentes, o germe de prova, por estria que parte de um ponto distante e atinge a colônia do cogumelo. Usando-se o *Penicillium notatum* verifica-se que os germes penicilino-sensíveis só crescem a uma distância maior ou menor da cultura do cogumelo, dependendo da quantidade de penicilina produzida e que se difunde no ágar.

MÉTODO DA GOTEIRA EM PLACA

Esse método simples "gutter method", descrito por FLEMING, consiste em fazer uma goteira ou canal em placa de ágar. A goteira é preenchida com mistura, em partes iguais, de ágar e caldo em que cresceu o cogumelo. Semeia-se, então, uma ou várias bactérias, sob a forma de estria, em angulo reto, da goteira até a borda da placa. A penicilina difunde-se no ágar e as bactérias crescem a uma distância maior ou menor, dependendo da sensibilidade. A figura V, original de FLEMING⁸⁸, mostra o grau de

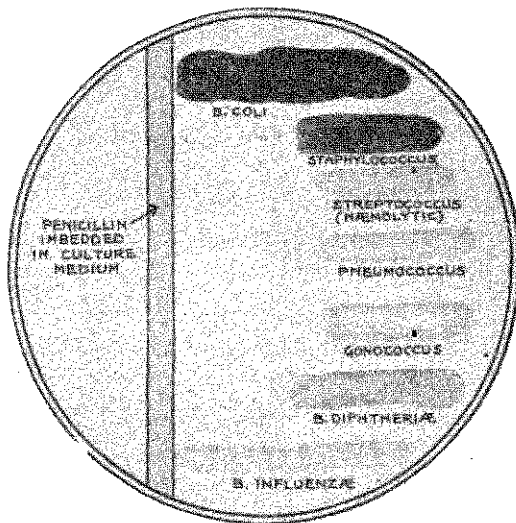


Figura V

Grau de inibição do crescimento de várias bactérias. (Reproduzida do original de Fleming).

sensibilidade à penicilina, indicado pela extensão da inibição do crescimento de várias bactérias.

MÉTODO DA CAVIDADE EM PLACA

É processo semelhante ao anterior mas, ao invés de goteira, fazem-se várias cavidades circulares, orifícios que são facilmente obtidos por meio de um perfurador de rôlhas.

As placas de ágar são previamente semeadas com germe de prova e as cavidades preenchidas com a mistura em partes iguais de ágar e líquido contendo a substância antibacteriana. Em cada cavidade pode-se colocar substâncias antibacterianas produzidas por diferentes culturas, ou concentrações diferentes do antibiótico de uma só cultura.

Esses dois últimos processos, embora não sejam adequados para as dosagens precisas de penicilina, não deixam de apresentar interesse prático, pois, o processo da goteira é útil quando muitas bactérias têm que ser ensaiadas com uma só cultura de cogumelo; por outro lado, o processo das cavidades apresenta o seu valor quando muitas culturas de cogumelo têm que ser ensaiadas com uma só bactéria.

MÉTODOS QUANTITATIVOS

Pela classificação que fizemos em páginas anteriores vimos que os métodos quantitativos propostas para a dosagem de penicilina são:

- 1.º) Método do cilindro em placa;
- 2.º) método das diluições seriadas;
- 3.º) método turbidimétrico.

Todos permitem dosagens quantitativas de precisão satisfatória desde que sempre se faça, ao lado dos desconhecidos, o controle com preparação padrão de penicilina aferida direta ou indiretamente com o padrão original de Oxford. Os mais usados são os métodos do cilindro em placa e das diluições seriadas em em tubos. O primeiro é modificação do método da cavidade "cup method" descrito por FLEMING. A principal diferença é que se usam cilindros geralmente de vidro perfeitamente polidos, que são colocados sobre a superfície do ágar semeado com a bactéria de prova e depois enchidos com a solução a ser dosada. A dosagem baseia-se no diâmetro da zona de inibição, em torno do cilindro, que é função do poder antibacteriano.

O método das diluições seriadas consiste em determinar a menor diluição de uma preparação de penicilina que inibe completa-

mente o crescimento da raça padrão de *Staphylococcus aureus* ou de outro germe adequado.

A penicilina pode ser dosada por diluições seriadas em tubos, segundo 3 processos que variam no modo de verificar a inibição do crescimento da bactéria de prova. Pelo processo adotada por SCHMIDT e MOYER²⁶¹ a inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* é indicada pela ausência de turvação do caldo de cultura.

A dosagem pelo processo de FLEMING é feita em caldo contendo glicose e indicador Andrade. O estafilococo, crescendo, fermenta a glicose, produzindo ácido que determina a viragem do indicador ao vermelho.

Finalmente, no processo de RAMMELKAMP a bactéria de prova é uma raça de *Streptococcus beta-hemolyticus* do grupo A, fortemente hemolítica, sendo usadas como indicador, hematias lavadas de carneiro. Nas diluições em que há produção de hemolisina pelo crescimento do estreptococo, o meio fica transparente pela lise dos eritrócitos.

O método turbidimétrico baseia-se na verificação das doses crescentes de penicilina que produzem quantitativamente uma proporcional inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* em caldo de cultura.

O crescimento do germe é medido turbidimetricamente como função inversa da concentração da penicilina no meio.

MÉTODO DO CILINDRO EM PLACA

Denominação: A êste método, que é modificação do "cup method" descrito por FLEMING, preferimos denominar "método do cilindro em placa", conforme SCHMIDT e MOYER²⁶¹ "Cylinder plate method" embora FOSTER e WOODRUFF continuem a adotar o nome de "cup method".

Achamos que a denominação usada pelos pesquisadores do "Northern Regional Research Laboratory" de Peória é mais precisa, pois, nesse método, que é sempre feito em placas, usando-se pequenos tubos, verdadeiros cilindros que, por suas dimensões, lembram minúsculos copos.

Princípio: Cilindros pequenos de vidro (ou de outro material adequado) colocados sôbre a superfície de ágar semeado com a bactéria de prova e solidificada em placas, são enchidos com soluções de penicilina e incubados. A penicilina, diluindo-se no ágar, inibe o crescimento do germe, resultando uma zona de inibição circular e clara. Dentro de certos limites, o diâmetro da

zona de inibição é função da concentração da penicilina; medindo-se em milímetros os diâmetros médios das soluções desconhecidas, obtém-se diretamente o número de Unidades Oxford, fazendo-se a leitura em curva padrão quando não são considerados os fatores que influem sobre o tamanho do círculo ou zona de inibição. Para que as dosagens dos diferentes laboratórios possam ser comparáveis devem ser feitas, quanto possível, nas mesmas condições.

Quando ABRAHAM e colaboradores ³, a princípio, estudaram os fatores que influem nas dosagens por este método, chegaram às seguintes conclusões:

“1.º) o diâmetro em mm. da zona de inibição (que denominamos o “valor de determinação”) é apenas pouco menor (1 a 2 mm) quando o cilindro é enchido pela metade do que quando êle é enchido completamente;

2.º) o valor de determinação não é influenciado pelo pH do líquido a ser examinado, desde que o tampão não seja demasiadamente concentrado e o pH se mantenha entre 5.0 e 8.5;

3.º) uma solução aquosa saturada de éter, ou água contendo gotículas livres de clorofórmio não produz inibição;

4.º) a difusão da P parece completar-se praticamente ao cabo de 2 a 3 horas e os valores de determinação, após a incubação durante 14 hs., são apenas muito pouco menores) 0,5 a 1 mm) do que após nova incubação de 8 hs. a 37°C;

5.º) não se agitando a placa, o líquido não pode sair do cilindro e, mesmo que o líquido não seja estéril, as bactérias contaminantes se restringem à face interna do cilindro;

6.º) o valor de determinação não é influenciado pela espessura do ágar, desde que esta se mantenha entre 3 e 5 mm;

7.º) o valor de determinação difere ligeiramente com diversas partidas de placas e com a densidade da população bacteriana no início da incubação; por esta razão deve ser evitada a semeadura irregular das placas;

8.º) às vezes a zona de inibição total está circundada por uma de inibição apenas parcial, onde se pode notar desde ação fraca até inibição quase completa;

Até agora ainda não se descobriram os meios para se evitar e explicar este fenômeno;

9.º) desejando-se pesquisar a atividade antibacteriana do sangue deve-se usar o plasma ou sôro, pois, os glóbulos vermelhos

tendem a formar camada sôbre o ágar, que impede fortemente a difusão da P. levando a valores menores” .

Estudos mais minuciosos foram publicados posteriormente por SCHMIDT e MOYER²⁶¹ e também por FOSTER e WOODRUFF^{105 e 107}.

Êsses pesquisadores estudaram detalhadamente a influência da composição dos meios de cultura e preparo das placas, das condições inoculum (germe de prova), dos caracteres dos cilindro, das condições em que são diluídas as amostras de penicilina e da preparação padrão, do tempo de incubação, etc.

Estabeleceram as condições ótimas que passaremos a analisar e que conferem ao método precisão satisfatória.

PREPARO DO MEIO DE CULTURA

Para o método do cilindro em placa o ágar deve ser claro, permitir bom crescimento do germe de prova, ter pH adequado e não apresentar variações de partida para partida.

Resultados bastante satisfatórios obtivemos com o meio I de SCHMIDT e MOYER²⁶¹.

FÓRMULA DO MEIO I

Peptona Bacto	5,0 grs.
Extrato de levedura Bacto	3,0 grs.
Glicose hidratada comercial	1,0 grs.
(Cerelese) *	
Ágar Bacto	15,0 grs.
Água destilada q. s.	1000 cm ³ .

O meio é ajustado ao pH 6.0, distribuído em quantidades de 500 cm³ em frascos Erlenmeyer de 1 litro e esterilizado a 121°C

O meio esterilizado não precisa permanecer refrigerado se fôr preparado cada 5 dias. O ágar é distribuído em placas 24 horas antes de ser usado. Usam-se pipetas grandes para distribuir 22 cm³ de ágar em cada placa. As placas de Petri usadas são um pouco mais profundas do que as comumente empregadas, sendo de 100x20 mm, as dimensões do fundo e de 100x15 mm. as da tampa. (15 libras) durante 20 minutos.

(*) Segundo informações das Refinarias de Milho Brasil S/A, a “Cerelese” é o nome dado nos Estados Unidos à glicose comercial obtida do milho e que na Europa tem o nome de “Dextropur” e na America do Sul “Dextrosol”, que usamos com resultados satisfatórios.

BACTÉRIA DE PROVA (*inoculum*)

Praticamente, qualquer bactéria sensível à penicilina pode ser usada no método do cilindro em placa, uma vez que a determinação se baseia no poder inibidor de amostras desconhecidas comparado com o de uma preparação padrão de potência conhecida para o mesmo germe, nas mesmas condições¹⁰⁷.

As duas bactérias de prova mais usadas nesse método são o *Staphylococcus aureus* e o *Bacillus subtilis*.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷, embora tenham demonstrado algumas vantagens com o uso do *B. subtilis*, acham que por motivo de uniformidade e padronização é preferível empregar a raça de *Staphylococcus aureus* H, originalmente usada pelo grupo de pesquisadores de Oxford para dosagem da penicilina.

Esta cultura de *Staphylococcus aureus* foi levada aos Estados Unidos pelo Dr. N. G. Heatley e por isso chamada raça "H"¹⁰⁷.

O uso de uma preparação padrão de penicilina reduz a importância da autêntica cultura *St. aureus*, entretanto, quando não se dispõe de padrão de penicilina, o uso da raça H é imperativo.¹⁰⁷

Uma das principais características que deve apresentar a bactéria de prova é o limite nítido, bem definido, do círculo de inibição para que se possam medir os diâmetros com facilidade e precisão.

Deve-se evitar culturas que dão zonas de inibição parcial ou zonas secundárias de crescimento. CHOLDEN⁵² acha que o *Staphylococcus aureus* (Norsenski) é o mais satisfatório, dando zona de inibição nitidamente definida, em 18 horas de incubação.

A "Food and Drug Administration", de Washington, usa, entretanto, nas dosagens por êste método o *Staphylococcus aureus* raça "209 F. D. A."

Essas variações, quanto à nitidez dos círculos de inibição, não só variam de raça para raça como também em dada raça a variação depende das condições de conservação e sementeira.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS H COMO INOCULUM

Usamos nas dosagens pelo método do cilindro em placa o *Staphylococcus aureus* H, cultura procedente dos Estados Unidos. Verificamos que com essa raça se obtêm círculos de inibição com limites bem nítidos e distintos, como mostra a fotografia 12 (pg. 134).

Partindo das pesquisas de SCHMIDT e MOYER²⁶¹ e de FOSTER e WOODRUFF^{105 e 107} obtivemos resultados ótimos observando as

condições de conservação e sementeira da raça H, que vamos descrever.

As culturas de *Staphylococcus aureus* H são mantidas em ótimas condições desde que conservadas em tubos de ágar, inclinados, na geladeira. O ágar que usamos é o referido meio I de SCHMIDT e MOYER, usado para dosagem em placa, porém sem glicose.

As culturas da bactéria de prova são repicadas mensalmente, permanecendo os repiques 24 horas em estufa a 37°C., após o que são conservadas novamente em geladeira. FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ verificaram que os repiques seguidos em caldo produzem alterações na cultura, com o desenvolvimento de células resistentes e de células sujeitas à lise durante a inibição pela penicilina.

Obtivemos culturas para sementeiras das placas de dosagem fazendo repiques, em caldo, do estafilococo de um tubo de ágar mantido em geladeira e que servia para os repiques diários, durante uma semana.

SCHMIDT e MOYER²⁶¹ usaram caldo contendo 0,85% de sais e e obtiveram sementeiras uniformes das placas de dosagem. Verificaram que no meio II a raça 209, da "Food and Drug Administration", não apresentava crescimento filamentoso ou granular.

Substituímos no meio II (caldo) de SCHMIDT e MOYER a "Celulose" por "Dextrosol" e obtivemos bons resultados com o *Staphylococcus aureus* H.

FORMULA E PREPARO DO MEIO II

Peptona Bacto	5,0 grs.
Extrato de levedura Bacto	1,5 grs.
Extrato de carne Bacto	1,5 grs.
Glicose hidratada comercial (Dextrosol)	1,0 grs.
Cloreto de sódio	3,5 grs.
Fosfato tampão a 1% (pH 7.0)	500 cm ³ .
Água destilada q. s.	1.000 cm ³ .

Distribuímos porções de 10 cm³ em tubos e esterilizamos a 121°C. (15 libras) durante 15 minutos.

SOLUÇÃO DE FOSFATO TAMPÃO a 1%

H ₂ KPO ₄	2,64 grs.
HK ₂ PO ₄	7,36 grs.
Água destilada q. s.	1.000 cm ³ .

O pH desta solução deve oscilar entre 6.9 e 7.1.

B. SUBTILIS COMO INOCULUM

FOSTER E WOODRUFF¹⁰⁷, após estudarem os detalhes do método do cilindro em placa acharam que o *Staphylococcus aureus* H é menos adequado para a dosagem do que uma raça, já em uso, de *Bacillus subtilis*, por êles citada.

Êsses autores acham que qualquer bactéria esporulígena sensível pode ser usada do mesmo modo que o *B. subtilis*; mas, para uniformidade geral, é sem dúvida melhor empregar um germe cujos caracteres e comportamento são já bem conhecidos e que tenha apresentado resultados satisfatórios. A referida cultura do *B. subtilis* pode ser obtida da "National Collection of Type Cultures".

Tivemos oportunidade de experimentar uma outra raça de *B. subtilis*, porém verificamos sensibilidade bem menor à penicilina do que a do *Staphylococcus aureus* H.

CHOLDEN⁵² acha que o *Staphylococcus aureus* tem sido e deve ser, a bactéria de escolha para dosagem, com maior razão do que um germe formador de esporos, tal como o *Bacillus subtilis* (FOSTER e WOODRUFF, desde que o interêsse está primariamente na ação da penicilina sobre germes não formadores de esporos.

O modo de ação pode não ser o mesmo nos germes com tão grandes diferenças no metabolismo⁵². Os primeiros requisitos para o germe escolhido para as provas, são: deve dar zona de inibição bem definida e deverá ter características de crescimento constantes. Tais condições observamos com o *Staphylococcus aureus* H, usando os meios de SCHMIDT e MOYER²⁶¹ e atendendo às condições ótimas de dosagem já estudadas.

Dada a importância desses estudos relataremos as observações de FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ que achamos mais interessantes.

Os esporos do *B. subtilis*, uma vez preparados, podem ser conservados indefinidamente em geladeira e usados em qualquer época, ao passo que, com o *S. aureus*, é preciso usar culturas jovens em caldo, necessitando repiques diários ou na véspera do dia de dosagem. Isto, sem dúvida, requer que a cultura de *S. aureus* seja repicada em domingos e feriados se as dosagens de penicilina tiverem que ser feitas nos dias seguintes.

Em temperatura ótima de incubação do *S. aureus* que é 37°C., e especialmente em estufa umedecida, o excesso de água condensa-se no lado interno da placa. Frequentemente, durante o manu-

seio, gotas de líquido caem na superfície do ágar podendo tornar menos nítidos os limites das zonas de inibição.

O *St. aureus* pode, realmente, ser incubado a 30°C; porém, o crescimento completo leva 20 a 30 horas, comparado com as 10-16 horas a 37°C. Isso não acontece com o *B. subtilis*, que cresce rapidamente a 30°C. e que apresenta, também, a seguinte vantagem: nesta temperatura a penicilina é possivelmente mais estável.

A temperatura do ágar no momento da sementeira pode ser 55-60°C., que não afeta os esporos e elimina as precauções necessárias no resfriamento a 42°C. para o *St. aureus*.

O fato de se poder trabalhar com ágar em temperatura mais elevada diminui a possibilidade da solidificação do meio, fator importante quando se tiver que fazer dosagens muito numerosas, exigindo quantidades de litros de ágar a serem semeados ao mesmo tempo.

Finalmente o *B. subtilis* não é germe patogênico e as placas e cilindros não precisam ser esterilizados antes da lavagem¹⁰⁷. FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ concluem que o *B. subtilis* é quase um germe ideal de prova para o método do cilindro em placa. Recomendam o seguinte meio de cultura para preparação dos esporos do *Bacillus subtilis*:

Peptona (Difco)	1,0 gr.
Extrato de carne (Difco)	0,3 gr.
Cloreto de sódio	0,5 gr.
Água destilada q. s.	100 cm ³

O pH, após a esterilização, deverá ser de 6.0 a 7.0.

Queremos lembrar que êsses pesquisadores verificaram que as suspensões de germes, preparadas de culturas do *B. subtilis* em superfície de ágar, são igualmente satisfatórias. Vejamos a técnica que usaram para o preparo dos esporos dêste germe em meio líquido e as considerações sôbre o seu uso:

“Após esterilização de 150 cm³ em frasco de 250 cm³, o meio é semeado com cultura do *B. subtilis* em ágar inclinado e incubado a 30° ou 37°C., de maneira que impeça a formação da película superficial típica do germe em aerobiose. Consegue-se isso mantendo o líquido, continuamente, em agitação que assegure o desenvolvimento das células como suspensão uniforme.

O melhor meio de se obter a agitação é firmar o frasco em qualquer tipo de máquina agitadora rotatória ou de movimento recíproco lateral.

Os agitadores comuns de Kahn podem ser facilmente adaptados, por qualquer artifício que deixe firme o frasco. Uma alternativa, embora processo menos satisfatório, é arejar a cultura continuamente pela passagem de corrente de ar umidecido e estéril, um tanto vigorosamente, através do líquido. A incubação é mantida até que se dê o máximo de crescimento da cultura e, conseqüentemente, se produzam esporos em abundância. Todo o frasco de cultura em suspensão é, então, pasteurizado a 60°C. durante 30 minutos para destruir as células vegetativas que permanecem vivas.

A densidade ótima do inoculum é de 15.000.000 de esporos por litro de ágar fundido. A contagem de esporos é estabelecida para cada partida nova de inoculum que é usada até que se esgote.

Este teor dá densa turvação bacteriana por todo o ágar entretanto, impede que pequenas colônias individuais se confluem umas com as outras.

Tal concentração normalmente demonstra uma zona definida com 0,2 de unidade de penicilina por cm³.

Os tamanhos das zonas são um tanto maiores para qualquer concentração dada de penicilina se o inoculum foi menos denso e vice-versa. Entretanto, a quantidade do inoculum especificada acima, condiciona boa densidade ótica e sensibilidade da medida”.

CILINDROS

Os cilindros geralmente usados no método em placas são de vidro, podendo ser de porcelana ou de alumínio. Cilindros de aço podem, também, ser usados²¹¹ e são mais duráveis do que os de alumínio.

Obtêm-se cilindros de vidro cortando, uniformemente, varas de vidro neutro por meio de um motor com disco cortador de vidro. Há divergência entre os autores quanto às dimensões dos cilindros.

<i>Autores</i>	<i>diâmetro externo</i>	<i>diâmetro interno</i>	<i>comprimento</i>
ABRAHAM e col. (3)	7,2	5,1	9,6
SCHMIDT e MOYER (261)	7,9 ± 0,1	—	10,0
FOSTER e WOODRUFF (107)	8,0	6,0	12,0 aprox.
Food and Drug Administration	8,0 ± 0,1	—	10,0

Obtivemos, como modelo, um cilindro de aço inoxidável recebido da “Food and Drug Administration”, cujas dimensões determina-

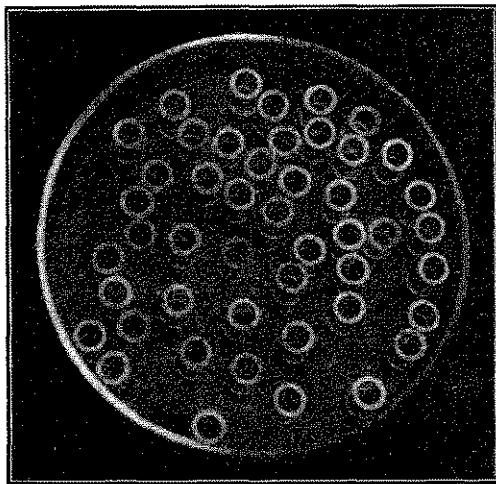
mos com parafuso micrométrico. Apresentava comprimento de 11,1 milímetros e 7,9 mms, de diâmetro externo.

Os cilindros de vidro feitos especialmente para os nossos estudos apresentavam, aproximadamente, 10 milímetros de comprimento e 7,4 de diâmetro externo.

Pequenas variações nas dimensões dos cilindros não influem nos resultados; entretanto, é indispensável que se usem, nas dosagens, cilindros de dimensões uniformes.

As extremidades dos cilindros que se apoiam no ágar possuem bisel interno com um ângulo de 50 a 60°. A extremidade oposta pode ser colorida com tinta de porcelana para facilitar a distinção da biselada.

Os cilindros que usamos foram feitos da seguinte maneira: varas de vidro escolhidas foram cortadas em pequenos cilindros de pouco mais de um centímetro de comprimento, por meio de um disco de aço próprio para cortar vidro, em rotação produzida por



Fotografia 11
Cilindros de vidro usados para dosagens da penicilina.

um motor. O bisel foi conseguido adaptando-se o cilindro ao eixo de um pequeno motor por intermédio de um tubo de borracha bem curto e de parede espessa; de cada vez um cilindro girava acompanhando o eixo do motor, enquanto, com um fuso de carburundum, fixado pela mão, fazia-se o bisel, esmerilhando a parede interna da

extremidade livre do cilindro. Ambas extremidades eram em seguida polidas com pó fino à base de carburundum.

O bisel nos cilindros parece não ser indispensável; julga-se, entretanto, que sua função é remover a aspereza da borda do cilindro e diminuir a possibilidade de lascar, além de permitir melhor adaptação do cilindro à superfície do ágar.

Para os cilindros sem bisel, mas de extremidades polidas, FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ recomendam aquecer ligeiramente uma das extremidades no momento de colocá-los, a fim de se obter bôa adaptação. A extremidade ligeiramente aquecida à chama de um bico de Bunsen funde o ágar localmente, o qual endurece imediatamente, efetuando uma solda entre o ágar e o cilindro de vidro, formando um "copo" que alguns autores chamam de "cup". Segundo FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ deve-se preferivelmente colocar os cilindros em placa de Petri e aquecê-los sôbre a chapa de um aquecedor elétrico. Assim, com aquecimento uniforme elimina-se uma importante variável que pode afetar as dosagens, devido às diferenças de profundidades nas quais os cilindros aquecidos fundem o ágar.

A colocação dos cilindros na placa deve ser realizada de modo que a pressão sôbre o ágar seja feita sômente pelo pêso dos cilindros.

Os cilindros perfeitamente colados não permitem qualquer extravasamento de líquido durante todo o período de incubação. Para se ter certeza de que estão bem adaptados, basta inverter a posição das placas para se verificar se êles permanecem firmes.

Numa placa pode-se colocar até 6 cilindros, dependendo do diâmetro da mesma e das necessidades.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ usam 6 cilindros espaçados pela mesma distância em tôrno de cada placa de 10 x 15 mms. Usamos, como SCHMIDT e MOYER²⁶¹ no máximo 5 cilindros por placa. Para 6 cilindros achamos preferível usar placas com 12 centímetros de diâmetro a fim de evitar a confluência dos círculos de inibição.

OSTWALD e RANDALL²¹¹ descreveram um disco perfurado com 6 orifícios que dão passagem aos cilindros e que servem de guia para facilitar a colocação dos mesmos em posição certa em tôdas as placas de ágar. Usaram um disco de "Plexiglass"; todavia, o disco pode ser feito de qualquer material plástico transparente.

Após o uso pode-se preparar os cilindros para novas dosagens, tratando-os, sucessivamente, por ácido sulfúrico, água, álcool e éter. Adotamos, por ser mui prática, a seguinte técnica: em 3 vidros pequenos, de boca larga, com rôlha esmerilhada, coloca-se,

respectivamente, até 2/3, ácido sulfúrico concentrado, álcool e éter. Com ua pinça transportam-se os cilindros das placas de dosagem para o ácido sulfúrico. No dia seguinte verte-se o ácido noutra frasco igual e lavam-se os cilindros demoradamente com água corrente. Passam-se para o álcool e depois para o éter onde podem ficar conservados, até o momento de secá-los, em placa de Petri, para uso.

Deve-se evitar o uso de solução sulfo-crômica, pois traços de cromo inativam a penicilina.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ recomendam aquecer os cilindros em ácido sulfúrico adicionado, diàriamente, de alguns cristais de nitrato de potássio.

Usando-se a técnica descrita, evita-se o trabalho de lavar cada cilindro no intervalo de duas esterilizações.

FATORES QUE INFLUEM NO MÉTODO

Altura do ágar — SCHMIDT e MOYER²⁶¹ verificaram que a cultura do ágar exerce parte importante na determinação do tamanho do círculo de inibição e na delimitação da borda do mesmo.

A medida que a altura do meio é aumentada, o tamanho da zona de inibição é diminuído e aumentada a quantidade de pigmento bacteriano.

O pigmento dourado do *Staphylococcus aureus* facilita a delimitação da borda da área de inibição.

Usando-se a quantidade standard de meio (25 cm³ por placa) o limite do círculo de inibição é distinto; entretanto, usando-se somente 15cm³ de meio, as bordas das áreas de inibição não se apresentam nítidas.

pH do ágar — A influência do pH é mais acentuada no método das diluições seriadas que no do cilindro em placa.

SCHMIDT e MOYER²⁶¹ referem que estudos de SCHMIDT e BENEDICT sôbre a estabilidade da penicilina indicam que ela é mais estável em pH 6. 0.

Obtêm-se, assim, não só aumento na área de inibição como, também, mais nítidos e claros limites dos círculos.

Aumentando-se o pH, a zona de inibição torna-se menos distinta.

Grau de difusão da penicilina — SCHMIDT e MOYER²⁶¹ verificaram que o tamanho do círculo de inibição é, em parte, dependente do tempo dispendido para difusão da penicilina no meio antes que o germe de prova produza crescimento apreciável. Se uma placa

completa e pronta para incubação fôr refrigerada 1 ou 2 horas antes da incubação, obtêm-se círculos anormalmente grandes porque a refrigeração retarda o crescimento bacteriano e permite tempo maior para difusão da penicilina.

Inversamente, incubação prolongada ou longo período de secagem reduz o tamanho do círculo de inibição.

Os resultados mais seguros são obtidos nas placas que estão prontas para incubação 1 1/4 a 1 1/2 horas após serem semeadas.

As diferenças encontradas nas zonas de inibição de placas colocadas na estufa, em tempos diferentes, durante seu preparo, requerem o uso de um padrão em cada placa, devendo os valores em unidades para os desconhecidos serem calculados por seus padrões correspondentes.

Concentração do inoculum — O número de germes distribuídos sôbre a superfície da placa de ágar determina, até certo ponto, o tamanho do círculo de inibição. Quando a inoculação fôr demasiadamente densa, os círculos não se apresentam uniformes e convenientes.

Por outro lado, se a quantidade de bactérias semeadas fôr demasiadamente pequena, os círculos se apresentam muito grandes e com limites mal definidos.

SCHMIDT e MOYER²⁶¹ verificaram que uma cultura de *Staphylococcus aureus* em caldo, diluída a 1:5, produz círculo de inibição com diâmetro de 22 a 23 mm.; diluída a 1:10, o diâmetro de inibição é de 23 a 24 mm.; e, diluída a 1:20, o diâmetro é de 24 a 25 milímetros.

PREPARO DAS PLACAS PARA DOSAGEM

Distribuição do meio e do inoculum — O inoculum (bactéria de prova) que usamos é uma cultura do *Staphylococcus aureus* H repicada (de um dos referidos tubos de ágar conservados em geladeira) em caldo (meio II) e incubada a 37°C., durante 24 horas. Para a distribuição do meio e do inoculum, usamos a seguinte técnica de SCHMIDT e MOYER²²¹:

“Fundese o ágar (meio I), resfria-se a 48-50°C. e semeia-se, então, com 1% de inoculum (1 cm³ de cultura do *St. aureus* em caldo (meio II) para 100 cm³ de ágar.). Homogeniza-se bem e juntam-se 3 cm³ dêste inoculum em cada placa de ágar contendo 22 cm³ de meio. Logo em seguida inclinam-se as placas semeadas e movimentam-se por rotação para se obter semeadura por igual em tôda superfície do meio.

As placas são mantidas em superfície plana, durante 5 a 10 minutos, enquanto o ágar se solidifica”.

Assim preparadas, as placas podem ser conservadas em geladeira, pelo menos 24 horas antes do uso.

As placas semeadas nunca deverão permanecer mais do que alguns minutos em temperatura ambiente, desde o tempo em que são preparadas até serem tratadas com as amostras de penicilina e incubadas.

Colocação dos cilindros — Os cilindros aquecidos em placa de Petri ou à chama de bico de Bunsen são colocados com pinça de modo que a extremidade biselada forme um sêlo sobre a superfície do ágar semeado com a bactéria de prova. Colocam-se, em posição equidistante, 5 a 6 cilindros em volta da placa evitando o centro, no qual a espessura do ágar, sendo geralmente menor, pode ocasionar erros.

Não se dispendo de disco como o descrito por OSTWALD e RANDALL ²¹¹ deixa-se os cilindros caírem de altura aproximada de 3 milímetros, sôbre a superfície do ágar.

PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DOSAGEM

As preparações de penicilina devem ser diluídas, preferivelmente, em solução de fosfato tampão pH 6.0.

FOSTER e WOODRUFF ¹⁹⁷ indicaram uma solução estéril M/50 de fosfato tampão de pH 7.0, para fazer as diluições.

A princípio, SCHMIDT e MOYER usaram uma mistura de fosfatos com pH 7.0; porém, após as verificações de SCHMIDT e BENEDICT, passaram a usar solução de fosfato tampão com pH 6.0.

Em nossas provas usamos a seguinte solução tampão de fosfato a 1%, cujo pH oscila entre 5.9 e 6.2:

H ₂ K PO ₄	8,17 grs.
H K ₂ PO ₄	1,83 grs.
Água destilada q. s.	1.000 cm ³

Esta solução é distribuída em pequenos balões esterilizados a 115°C. durante 20 minutos.

As soluções de penicilina são diluídas em solução de fosfato tampão pH 6.0, de modo a conterem, na base do pressuposto título, na diluição final, aproximadamente 0,5 a 1,0 Unidades Oxford por cm³.

A diluição das preparações sólidas de penicilina é feita de modo a conter a solução, 1 miligrama por cm³.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ recomendam pesar 2 a 5 miligramas de penicilina com a precisão de 0,1 mgr. em pequeno tubo tarado e adicionar tantos centímetros cúbicos de solução tampão quantos miligramas forem pesados da amostra.

Julgando-se, por exemplo, que uma amostra contenha cerca de 300 unidades por miligrama, a primeira solução (1 mgr. por cm³) é, então, diluída na proporção de 1 parte para 29 de solução tampão e, desta, por sua vez, 1 parte para 9 de solução tampão, o que dá diluição final de 1:300, pronta para colocação nos cilindros e contendo, por suposição, aproximadamente, 1 unidade por cm³.

Usando placas de ágar com 5 cilindros, enchem-se, com pipeta de Pasteur, 3 cilindros com a solução desconhecida e os dois restantes com solução padrão de penicilina, contendo 1 Unidade Oxford por cm³.

Os cilindros devem ser enchidos até em cima, a fim de garantir distribuição uniforme. A distribuição pode ser feita com um só conta-gôtas, munido de pera de borracha, lavando-o após a distribuição de cada amostra, primeiramente com solução de fenol a 5%, depois com água destilada e, finalmente, com a própria solução a ser dosada. Evita-se, deste modo, o uso de grande número de pipetas quando há muitas dosagens.

Logo após o enchimento dos cilindros, as placas são cuidadosamente colocadas em estufa a 37°C. e, após 15 a 16 horas de incubação faz-se a leitura dos resultados.

PREPARO DO PADRÃO

Em virtude da tendência de certas amostras de penicilina, em conservação, perderem rapidamente a atividade, o primeiro requisito da preparação a ser escolhida como padrão é que seja de *estabilidade comprovada*.

As amostras selecionadas devem mostrar não ter perdido sua atividade, durante conservação em tempo considerável.

Os padrões secos, cujos valores em unidades são cuidadosamente aferidos, direta ou indiretamente, com o padrão original de Oxford, deverão ser conservados em geladeira durante todo o tempo. O sal de sódio da penicilina é muito higroscópico e rapidamente perde a atividade pela umidade do ar. Como padrão usamos um sal de cálcio da penicilina obtido do Dr. Robert D. Coghill, Chefe da "Fermentation Division of the Bureau of Agricultural and Industrial Chemistry", Peória, Illinois.

Esta preparação padrão que recebemos por intermédio do Dr. J. P. de Carvalho Lima, Diretor do Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo, continha, aproximadamente, 110 mgrs. de sal de cálcio da penicilina, obtido de cultura em superfície, dosando 158 Unidades Oxford por miligrama. É preferível usar como padrão sal de cálcio, muito menos higroscópico que o de sódio.

O frasco que contém a preparação seca, antes de ser aberto para pesagem deve permanecer em dessecador até atingir a temperatura ambiente ¹⁰⁷.

Para preparar uma solução padrão estoque, pesamos em balança analítica, exata e rapidamente 10 miligramas da preparação padrão seca e diluímos em solução de fosfato tampão, de modo a conter 30 Unidades Oxford por cm³.

Esta solução estoque, mesmo conservada em temperatura de geladeira, tende a perder vagarosamente a atividade.

FOSTER e WOODRUFF recomendam conservá-la congelada, sendo que a congelação pode ser feita em gelo seco ou no compartimento de congelação de geladeira.

O padrão de penicilina que tem sido adotado pela "Food and Drug Administration" de Washington é um sal de sódio da penicilina, cristalino e dosando 1.650 unidades por miligrama. Mensalmente a "Food and Drug Administration", aferindo com o padrão cristalino, prepara um "padrão de referência" do qual é enviada uma amostra a cada fabricante de penicilina para determinação da atividade dos produtos ⁷⁹.

PREPARO DA CURVA PADRÃO

As dosagens da penicilina têm significado quantitativo preciso somente quando feitas ao lado de um padrão, e quando os valores dos desconhecidos são calculados pela curva padrão, que deve ser tirada em cada dia de dosagem.

SCHMIDT e MOYER ²⁶¹ prepararam a curva padrão determinando os diâmetros dos círculos de inibição produzidos por 5 soluções de teor conhecido em unidades, dentro dos limites de 0,25 a 3,0 Unidades Oxford por cm³. FOSTER e WOODRUFF ¹⁰⁷, para tirar a curva padrão, usam 6 soluções conhecidas com os seguintes títulos: 0.2, 0.5, 0.8, 1.2, 1.6 e 2.0 Unidades Oxford por cm³.

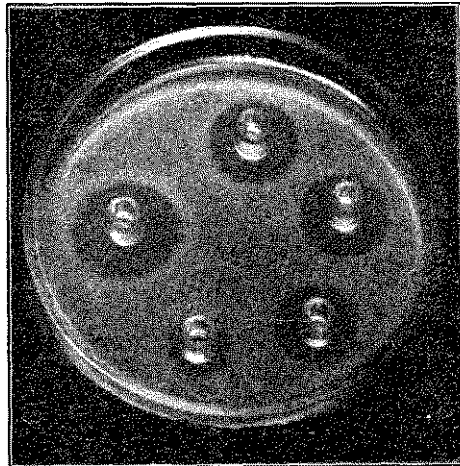
Empregando placas com cinco cilindros preparamos a curva padrão; usamos as soluções com os seguintes títulos: 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 e 2.0 Unidades Oxford por cm³. Esta última solução (mais concentrada), obtivemo-la diluindo 1 cm³ da solução padrão esto-

que (30 Unidades Oxford) em 14 cm³ de solução de fosfato tampão. As outras diluições necessárias para tirar a curva padrão foram feitas a partir desta contendo 2.0 Unidades Oxford por cm³, segundo o quadro seguinte:

Centímetros cúbicos da solução contendo 2,0 Unidades Oxford por cm ³ .	Centímetros cúbicos da solução de fosfato tampão (pH 6.0)	Concentração final em unidades por cm ³ .	Número dos cilindros correspondentes.
0,4	1,6	0,4	1
0,8	1,2	0,8	2
1,2	0,8	1,2	3
1,6	0,4	1,6	4
2,0	—	2,0	5

Tira-se a curva padrão projetando, em ordenadas, o diâmetro médio de inibição obtido para cada concentração em 4 a 5 placas diferentes e em abcissas os valores correspondentes em Unidades Oxford.

Na fotografia 12 vemos uma das placas com os círculos de inibição que obtivemos, para tirar a curva padrão. A figura VI mostra uma curva padrão típica, segundo SCHMIDT e MOYER ²⁶¹.



Fotografia 12

Placas de dosagem mostrando as zonas de inibição para determinar a curva padrão.

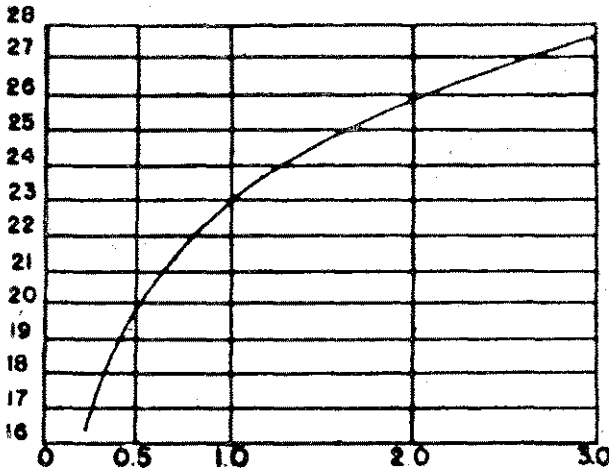


Figura VI
Curva padrão segundo Schmidt e Moyer.

MEDIDA DAS ZONAS DE INIBIÇÃO

Após incubação, observam-se zonas de inibição claras e circulares, cujas dimensões dependem da concentração da penicilina das soluções nos cilindros. Dentro de certos limites, os diâmetros das zonas de inibição, cujas bordas devem ser bem nítidas, são medidos por qualquer maneira conveniente.

As medidas são feitas com aproximação de meio milímetro. Pode-se usar compasso transferidor para tirar os diâmetros das zonas e medi-los em régua ou em papel milimetrado.

Podem-se obter medidas diretas, colocando-se as placas de dosagem sobre a escala de Meyer de Soza, do Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, que obtivemos por gentileza do Dr. Ariosto B. Souto. Esta escala em milímetros, reproduzida na figura VII, possui traçado claro em fundo preto que dá bom contraste.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ descreveram um aparelho simples é útil para ser usado quando se quer fazer número muito grande de medidas de placas. Consiste em pequena caixa de madeira tendo no interior uma lampada de microscópio. A tampa de vidro preto, opaco, apresenta uma escala milimétrica cujo traçado transparente, iluminado pela luz da lâmpada facilita a leitura, pelo ótimo contraste que produz com o fundo escuro.

Os valores médios dos diâmetros das zonas dos desconhecidos e do padrão são calculados separadamente. Na prática, tôdas as zonas numa placa são lidas em seqüência. Sistema simplificado de identificar as amostras e suas respectivas repetições, é numerar as

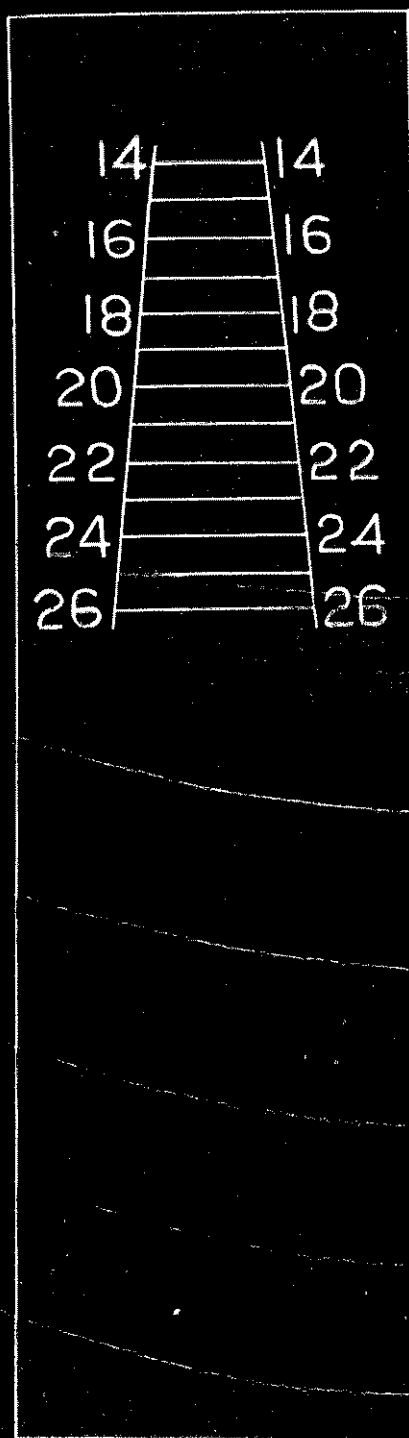


Figura VII
Escala de Meyer de Soza para
medir os diâmetros de inibição.

placas com lapis dermatográfico. Os cilindros não precisam ser marcados se se fizer um sinal, com lapis dermatográfico, no lado da placa de Petri, oposto ao fundo de um dos cilindros. Começando com este cilindro, os outros são identificados por seqüência, no sentido do movimento dos ponteiros de relógio. Assim, é necessário ter somente os valores ao lado dos respectivos números das amostras em lista. Maior segurança de resultado é obtida se o valor para o desconhecido cair entre os pontos da curva correspondente a 0.3 e 1.4 unidade.¹⁰⁷

Os pontos na região alta da curva são de valores aproximados porque pequenas diferenças na medida da zona podem significar grandes diferenças na leitura do valor da penicilina. De dia para dia observam-se algumas mudanças na forma da curva, porém, em regra geral, isto ocorre na região superior onde ela se aplanando formando um patamar.

Fazendo-se as dosagens sempre nas mesmas condições, usando-se os mesmos meio, inoculum, cilindros, tempo de incubação, etc., pode-se dispensar o uso de um padrão em cada placa tirando-se, em cada dia de dosagem, duas curvas com padrões diferentes. Preparando-se apenas uma curva padrão corre-se, às vezes, o risco de perder todo o trabalho de dosagem devido a diminuição dos diâmetros de inibição determinada por perda de atividade da solução padrão em estoque.

Nessas condições distribui-se cada amostra em cada cilindro de 4 placas de dosagem. Se as placas tiverem 5 cilindros, gastam-se 16 placas para dosar 20 amostras.

LEITURA DOS RESULTADOS

Geralmente os diâmetros individuais das zonas de inibição oscilam dentro de 1,5 milímetros da média.

Ocasionalmente, por razão desconhecida, todos os valores de uma dada placa, isto é, uma das 4 repetições, apresentam acentuado desvio das outras placas (geralmente para baixo).

As leituras muito discrepantes devem ser excluídas das médias¹⁰⁷.

Os diâmetros médios das zonas dos desconhecidos são projetados, horizontalmente, das ordenadas para a curva e daí, perpendicularmente, para as abcissas, onde se lê os valores em unidades de penicilina que produzem o mesmo diâmetro de inibição que a diluição particular do desconhecido.

O valor do desconhecido lido na curva padrão, multiplicado pelo fator diluição, dá o título em Unidades Oxford por cm³ da so-

lução original. Este título representará o número de unidades por miligrama da preparação seca de penicilina se a solução original contiver 1 mgr. por cm³.

MÉTODOS DAS DILUIÇÕES SERIADAS

Dois são os métodos em que se usam diluições em série, das preparações de penicilina, para dosagem quantitativa. O primeiro método em placas com meio sólido (ágar) e o segundo, em tubos, com meio líquido de cultura. Este último é mais usado na prática.

MÉTODO DAS DILUIÇÕES SERIADAS EM PLACA

É pouco usado nas dosagens de penicilina por ser muito fastidioso, exigindo grande número de placas e grandes volumes de ágar. Além disso, é método impreciso pois apresenta variações de dia para dia, usando-se a mesma amostra de penicilina, tornando-se imperioso o uso de padrão¹⁰⁵. Apresenta, entretanto, certo interêsse porque cêrca de 6 germes diferentes podem ser ensaiados em cada placa, de cada diluição. Sob o ponto de vista prático não apresenta nenhuma vantagem, pois nas dosagens de rotina usa-se um só germe de prova.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁵ descrevem a seguinte técnica do método: "Misturam-se quantidades diferentes de uma solução adequada de penicilina com 10 cm³ de ágar fundido e distribuí-se em placas. Após a solidificação, semeia-se a superfície do meio com o germe de prova, em estria. Deixa-se em incubação durante a noite e lê-se, então, o ponto de inibição completa.

Pode-se simplificar um pouco êste método, semeando o ágar fundido com o germe de prova, antes de distribuí-lo em placas. Usa-se 1 cm³ de caldo de 20 horas para 100 cm³ de ágar. As placas que permanecerem claras, após a incubação durante a noite, inibiram o germe de prova".

ATKINSON¹³, em estudos quantitativos, verificou que a dosagem pela diluição da substância antibacteriana em ágar nutritivo é um pouco mais sensível do que a diluição em caldo, e apresenta a vantagem de se poder comparar, numa mesma placa, a ação antibacteriana sobre diferentes germes; além disso, as contaminações são mais fâcilmente observadas no ágar.

MÉTODO DAS DILUIÇÕES SERIADAS EM TUBOS

FLEMING, em 1929, usou o método das diluições em série para dosar preparações de penicilina. Fazia as diluições de penicilina em caldo comum e semeava todos os tubos com o mesmo volume de

uma suspensão de estafilococos, e, em seguida, mantinha em estufa a 37°C., durante 24 horas.

A atividade inibidora da penicilina era facilmente verificada pela observação da opacidade do caldo. Esse método de diluição em caldo, além de medir o poder bacteriostático da substância antibiótica, permite que se determine também o poder bactericida. Para isso, retiram-se em tempos diferentes, durante a incubação, pequenas quantidades do meio semeado, para calcular o número de germes sobreviventes.

FLEMING⁸⁸ verificou que o *Staphylococcus aureus* é germe adequado para a dosagem da penicilina, pois, é muito sensível a essa substância, mantém-se bem em cultura e cresce rapidamente.

Em 1942, MC KEE e RAKE¹⁸⁸, em seus estudos, dosaram também a penicilina por diluições em tubos, usando em tôdas as provas um padrão para contrôle, que era um sal estável de cálcio, contendo 30 Unidades Florey por miligrama.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁵ acham que, sem o uso de um padrão de penicilina, os resultados obtidos com este método não podem ser comparados com os de outros laboratórios, a não ser que se use como germe de prova a raça de *Staphylococcus aureus* H.

A precisão deste método depende da graduação nas diluições quando se conhece aproximadamente o título da preparação da penicilina. O uso de pequenos intervalos na diluição requer número excessivo de diluições para se poder fixar o ponto de leitura. Com preparações desconhecidas é preciso, primeiramente, fazer uma dosagem com grandes intervalos nas diluições, para se estabelecer o valor aproximado, e, depois, em segunda dosagem, fazer diluições mais próximas dentro da zona limitada. Isto constitui inconveniente para o serviço de rotina, em que o número de dosagens das preparações desconhecidas é muito grande.

Ao contrário do método do cilindro em placa, esse requer técnica asséptica e também que as amostras sejam estéreis.

Geralmente, as amostras podem ser filtradas em placas de Seitz, antes da dosagem; entretanto, devemos nos lembrar de que usando pequenas quantidades de material as perdas podem ser consideráveis, ou mecânicamente por embebição da placa, ou possivelmente por adsorção.

Para esterilizar, por filtração, soluções da penicilina durante as várias fases de extração e purificação usamos velas de porcelana, com bons resultados.

Com preparação de alta atividade, a elevada diluição necessária para chegar ao ponto de leitura geralmente elimina a contaminação. Neste caso observa-se fenômeno aparentemente paradoxal: concentrações maiores de penicilina revelam crescimento, enquanto diluições mais elevadas não o apresentam.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁵ acham que certas preparações, que são demasiadamente contaminadas para uso direto, podem ser pasteurizadas a 60°C., durante 30 minutos. Pela pasteurização, entretanto, há, geralmente, perda da atividade que varia de 5 a 30%.

Para dosar a atividade do caldo de cultura do *P. notatum* não é necessário filtrá-lo, pois, êsse cogumelo só cresce mui lentamente a 37°C. e, ao serem lidos os resultados, após 24 horas, não se percebe qualquer crescimento do fungo.

LOCKHEAD e TIMONIN¹⁷⁴ verificaram que pode haver variações na dosagem da penicilina que dependem da composição do meio e do germe de prova.

Observaram que, com amostra de penicilina que inibia totalmente 2 raças de *St. aureus* nas diluições de 1.600-3.200, experimentada com uma raça de *St. albus* em meio contendo 1% de manose ou lactose, o máximo de inibição se verificava apenas acima da diluição 10. A mesma penicilina inibiu o *St. albus*, na diluição 320, no caldo contendo 1% de sacarose.

A dosagem da penicilina por diluições seriadas, em meio líquido, pode ser feita por vários processos que diferem, essencialmente, na maneira de verificar a inibição do crescimento do germe de prova. Os principais são os seguintes:

1.) *Processo de Schmidt e Moyer*, em que se usa caldo de cultura e a leitura é dada pelo tubo de diluição máxima, que não apresenta turvação reveladora do crescimento do *Staphylococcus aureus*;

2.º) *Processo de Fleming*, baseado na atividade fermentativa do *Staphylococcus aureus* sobre a glicose;

3.º) *Processo de Rammelkamp*, baseado no impedimento da ação hemolítica de determinada raça de *Streptococcus hemolyticus* do grupo A.

Nas dosagens de contrôle usamos os dois primeiros métodos e verificamos que, em numerosas determinações feitas, êles se comparam, apresentando sensibilidade apreciável. Preferimos usá-los com algumas modificações que relataremos na descrição de cada um.

PROCESSO DE SCHMIDT E MOYER

O meio dos autores é caldo especial de cultura (meio II) usado para a preparação do *Staphylococcus aureus* como inoculum do método do cilindro em placa, e cuja fórmula encontra-se na página 124.

Preferimos subtrair do meio II de SCHMIDT e MOYER²⁶¹ a glicose, cuja presença é indispensável para que a notatina exerça sua ação bacteriostática. Já vimos que a notatina de COULTHARD⁶⁷ pode ser também elaborada pelo *P. notatum* e sua presença nos líquidos de cultura pode dar origem, nesse método, à dosagens de penicilina com títulos superiores aos reais.

Tratando-se de caldo peptonado com extrato de levedura julgamos dispensável a presença de glicose, uma vez que o germe de prova, *Staphylococcus aureus*, cresce rapidamente mesmo em caldo comum.

Tendo SCHMIDT e BENEDICT verificado que a penicilina é mais estável em pH 6.0, preferimos usar o meio de dosagem também com este pH.

Por essas razões usamos o meio II assim modificado:

Peptona Bacto	5,0 grs.
Extrato de levedura Bacto	1,5 gr.
Extrato de carne Bacto	1,5 gr.
Cloreto de sódio	3,5 grs.
Fosfato tampão a 1% (pH 6.0)	500 cm ³ .
Água destilada q. s.	1000 cm ³ .

Distribuímos, em balões, porções de 200 cm³ de meio e esterilizamos a 121°C. (15 libras de pressão) durante 15 minutos.

Pela modificação do pH que fizemos, usamos a solução de fosfato tampão assim modificada:

H ₂ KP.O ₄	8,17 grs.
H K ₂ PO ₄	1,83 grs.
Água destilada q. s.	1000 cm ³ .

A técnica usada por SCHMIDT e MOYER é a seguinte: “Conservam-se em geladeira até o uso, frascos de Erlenmeyer de 500 cm³, contendo quantidades de 200 cm³ de meio II esterilizado. À medida que cada frasco vai sendo usado, inocula-se 1 cm³ de cultura em caldo, de 20 horas, de *Staphylococcus aureus*. Mistura-se perfeitamente o caldo e o inoculum, e distribui-se, imediatamente, com pipeta, a mistura em quantidades diferentes, em tubos de ensaio estéreis.

A amostra de penicilina que vai ser diluída deve estar isenta de bactérias que são insensíveis à penicilina. As soluções contaminadas com bactérias podem ser filtradas através de um filtro Seitz ou "Sintered glass (grade 5 or 3) filter".

Este método permite que a concentração do inoculum permaneça praticamente constante em todos os centímetros cúbicos de caldo. A quantidade de caldo varia consideravelmente de tubo para tubo, porém, isso não interfere, aparentemente, na obtenção de resultados seguros.

Antes da incubação cada tubo deve ser perfeitamente agitado, para misturar o caldo e a penicilina".

A figura VIII mostra a maneira de se fazer as diluições em série.

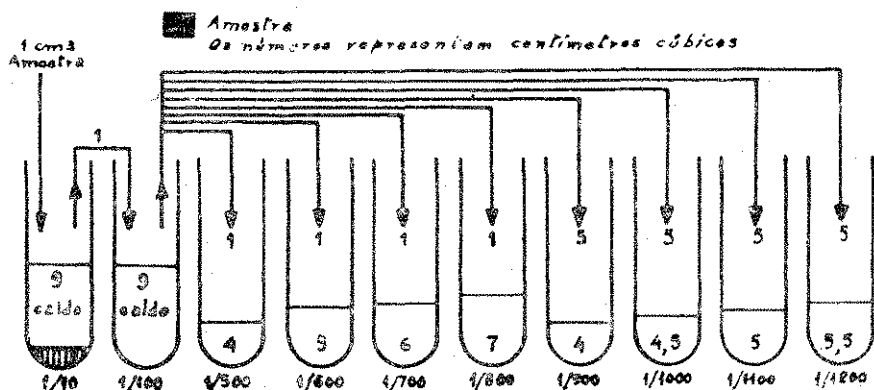


Figura VIII

Esquema das diluições seriadas (Schmidt e Moyer).

Tempo de incubação — Qualquer período de incubação pode ser usado, uma vez preparado um padrão para controle. Os autores²⁶¹ costumam incubar a 37°C. durante 18 ou 40 horas, preferindo o último prazo.

Leitura em 18 horas — Os cálculos para converter diluições em Unidades Oxford, são baseados na maior diluição que não demonstre crescimento.

Supondo que o método do cilindro em placa fornecesse resultado preciso, os autores²⁶¹ verificaram que, em culturas em caldo, gastava-se, aproximadamente, 0,45 Unidades Oxford por cm³ para inibir o crescimento do germe de prova.

Para converter diluição em unidades, basta multiplicar o título da diluição pelo fator 0,045.

Exemplo: leitura em 18 horas

$$\begin{array}{r} 1/900 \text{ —} \\ 1/1000 \text{ +} \end{array} \quad 900 \times 0,045 = 40 \text{ unidades por cm}^3 \text{ da amostra.}$$

Cremos que os autores, com êste cálculo, pretenderam apenas figurar um exemplo; pois, na realidade, o fator de multiplicação deve ser aproximadamente 0,020.

Se houvesse inibição completa do germe até na diluição 1/900 teríamos: $900 \times 0,020 = 18$ unidades por cm^3 da amostra.

Baseando-nos na definição de FLOREY e JENNINGS⁹⁷, da Unidade Oxford como sendo “a menor quantidade de penicilina que dissolvida em 50 cm^3 de caldo de carne inibe completamente o crescimento da raça do *Staphylococcus aureus* de prova” podemos obter o resultado em unidades dividindo o título da diluição máxima inibidora por 50.

Assim, teríamos $\frac{900}{50} = 18$ Unidades Oxford por cm^3 da amostra.

Leitura em 40 horas — Os resultados de 40 horas são de mais fácil leitura e mais definidos. Em regra geral, numa série um tubo pode ser muito claro e o seguinte muito turvo. Os cálculos são baseados na diluição mais elevada que permanece clara.

Crescimento fraco, com grânulos e filamentos, é desprezado.

Quando o período de incubação é prolongado, a quantidade de penicilina necessária para impedir o crescimento também aumenta; numerosas determinações indicam que em culturas de 40 horas é preciso, aproximadamente, 0,1 unidade por cm^3 para inibir o crescimento.

Exemplo: leitura em 40 horas

$$\begin{array}{r} 1/400 \text{ —} \\ 1/500 \text{ +} \end{array} \quad 400 \times 0,1 = 40 \text{ unidades por cm}^3 \text{ da amostra.}$$

PROCESSO DE FLEMING

FLEMING⁹¹ propôs interessante método de dosagem da penicilina por diluições seriadas, usando inoculum constante da mesma bactéria de prova em meio líquido de cultura, de composição definida. Sugeriu o seguinte meio como padrão:

Peptona (Evans)	1,0 gr.
Cloreto de sódio	0,5 gr.
Glicose	1,0 gr.
Indicador Andrade	1,0 cm^3 .
Água q. s.	100 cm^3 .

Não tendo feito referências, ajustamos o meio ao pH 6.8 e esterilizamos a 115°C, durante 20 minutos.

Neste meio o *Staphylococcus aureus* cresce e fermenta a glicose, produzindo ácido que muda a côr do indicador. O indicador Andrade, que é solução de fucsina descorada pela soda, retorna à sua côr primitiva, vermelha, em meio ácido.

Usamos a fucsina ácida de "Grübler" diluída a 0,5% em água e descorada por solução normal de hidróxido de sódio. Para cada 100 cm³ de solução corante gastamos cêrca de 16 cm³ da solução de soda. Êste indicador foi filtrado em papel e conservado em frasco escuro.

FLEMING preferiu êsse meio ao caldo comum ou ao caldo glicosado, que são de mais difícil padronisação, desde que nos diferentes laboratórios são preparados de diversos modos. Com o uso dêsse meio com indicador os resultados são mais constantes e comparáveis entre os diferentes laboratórios, pois, com o caldo comum o ponto final é dado pelo último tubo em que não há crescimento ou há 50% de turvação, critério êsse que pode dar título aumentado de penicilina.

FLEMING⁹¹ usou êsse método da seguinte forma: "Fazem-se diluições seriadas em tubos contendo 5 cm³ de meio, nos quais se semeia uma alça de platina (3 mm de diâmetro externo) de cultura, de 24 horas em caldo, de *Staphylococcus*. O resultado é lido após 24 horas e o ponto final é dado pelo aparecimento de côr vermelha no meio".

O autor acha o *Staphylococcus aureus* adequado como bactéria de prova, porém, dadas as variações de sensibilidade das raças dêsse germe à penicilina, lembra a necessidade de se usar em todos os laboratórios a mesma raça. Diante disso, não hesitamos em usar o *Staphylococcus aureus* H que, aliás, é recomendado por FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷. Para as diluições das preparações de penicilina, ao invés de tubos com 5 cm³ de caldo preferimos fazê-las em tubos de hemólise com 2 cm³, segundo a modificação do DR. AREIA LEÃO¹⁶⁴, do Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro.

Para maior precisão nas diluições, esterilizamos o meio em balões e depois o distribuimos em tubos, assèpticamente, com pipeta graduada. Essa distribuição, sem dúvida, é mui exaustiva, porém é recomendavel principalmente nos trabalhos de pesquisa que exigem dosagens de maior precisão.

Segundo FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷, empregando-se a cultura de *Staphylococcus aureus* H não se torna necessário o uso de padrão;

entretanto, para maior uniformidade e segurança nas dosagens, é preferível sempre usá-lo.

Para as dosagens de penicilina usamos a seguinte técnica, modificação de AREIA LEÃO¹⁶⁴. Toma-se uma série de tubos contendo 2,0 cm³ de meio, exceto o 1.º (contém 3,6 cm³). Junta-se a êste 0,4 cm³ da solução de penicilina a ser dosada, homogeniza-se aspirando com pipeta e transferem-se 2 cm³ para o 2.º tubo; homogeniza-se e transferem-se para o 3.º tubo e assim sucessivamente. Obtêm-se, dêste modo, diluições dobradas: no 1.º tubo, diluição 1/10; no 2.º, 1/20; no 3.º, 1/40 e assim por diante. O número de diluições a serem feitas depende da provável concentração da preparação de penicilina desconhecida. Os 2 cm³ restantes do último tubo de diluição são transferidos para outro que funciona como prova de esterilidade da preparação de penicilina. Outro tubo só com meio serve de contrôle dêste e, finalmente, um 3.º, contendo meio sem penicilina, é semeado para contrôle da bactéria de prova.

Todos os tubos de diluição são semeados com 1 gôta (0,05 cm³) de cultura de 24 horas de *Staphylococcus aureus* H em caldo, diluída a 1/20. Após a semeadura os tubos são agitados e levados à estufa, onde permanecem 18 horas, fazendo-se então, a leitura. O ponto de leitura é dado pelo tubo de diluição máxima em que não houve mudança de côr do meio, não apresentando côr vermelha reveladora da fermentação da glicose produzida pelo *Staphylococcus aureus* em crescimento. Para obtenção de resultados mais precisos, convém fazer segunda dosagem com diluições mais próximas, dentro da zona delimitada pela primeira prova.

Dividindo-se o título da diluição do tubo que representa o ponto de leitura por 50, obtêm-se a concentração em Unidades Oxford da amostra dosada. Assim, uma solução de penicilina que impede a viragem do indicador até a diluição a 1/1000 terá $\frac{1000}{50} = 20$ Unidades Oxford por cm³ e, as soluções que contenham 250 U.O. por cm³ impedem totalmente o crescimento do *Staphylococcus aureus*, até a diluição de 1/12.500.

Como vimos, FLOREY e JENNINGS⁹⁷ definiram a Unidade Oxford como sendo “a quantidade mínima de penicilina que, dissolvida em 50cm³ de caldo, inibe o crescimento do *Staphylococcus aureus* de prova”.

Ao procurarmos usar o meio de FLEMING com pH 6.0 pelas razões já expostas, verificamos que o meio apresentava côr rósea

intensa, que constituía grande inconveniente na leitura. Conseguimos eliminá-lo por uma das seguintes formas: 1.^a) descorar o meio preparado, antes de esterilizá-lo, com 2% de carvão animal ativo e filtrar em papel; 2.^a) descorar o indicador com 1% do mesmo carvão. No primeiro caso o meio fica incolôr, o germe cresce bem e fermenta a glicose; verificamos, porém, que o ponto de leitura é dado pelo aparecimento de côr rósea que contrasta bem com o meio incolor dos outros tubos. O meio com essa modificação, comparado com o de SCHMIDT e MOYER, com o mesmo pH, nos revelou resultados praticamente idênticos. Possivelmente, diminuindo-se a quantidade de indicador chega-se ao mesmo resultado, pois, parece-nos que, no caso, a principal função do carvão é eliminar o excesso de corante não descorado.

PROCESSO DE RAMMELKAMP

Em 1942, RAMMELKAMP²³¹ descreveu um processo que permite a dosagem de pequenas quantidades de penicilina presentes nos líquidos orgânicos: sangue, liquor, urina e nos exsudatos das cavidades infectadas (pleurais, articulares, etc.). Baseia-se na inibição, pela penicilina, do crescimento de uma raça de estreptococo hemolítico do grupo A, sendo usados eritrócitos como indicador.

As amostras de penicilina são diluídas em série, em tubos com caldo de carne de vitela e o ponto limite de leitura é dado pelo tubo em que houve hemólise reveladora do crescimento do estreptococo.

A descrição do processo é a seguinte: "as amostras de penicilina são conservadas a 5°C. até o momento da dosagem. Se estiverem contaminadas são previamente filtradas em Seitz. Fazem-se diluições, numa série de tubos de hemólise, contendo, com exceção do 1.^o, 0.2cm³ de caldo de vitela. Aos dois primeiros adicionam-se 0,2cm³ da amostra desconhecida de penicilina. Do 2.^o tubo transferem-se 0.2cm³ do caldo e penicilina ao 3.^o tubo e assim sucessivamente. Sabendo-se que a amostra contém mui pequena quantidade de penicilina, usa-se mais um tubo teste contendo 0,5cm³ da amostra.

O contrôle é feito diluindo-se, do mesmo modo, um padrão de penicilina conservado a 5°C. e diluído em solução de cloreto de sódio a 0,85%, de modo a conter 20 Unidades Florey por cm³.

A bactéria de prova é um estreptococo hemolítico do grupo A, isolado do sangue de paciente com erisipela. A cultura de 12 horas em caldo é diluída em caldo de infusão de carne de vitela adicionado de 1% de eritrócitos, de modo a conter número de germes que oscila entre 1.000 e 10.000 por cm^3 . 0,5 cm^3 desta diluição é adicionado a todos os tubos inclusive os da série de controle contendo diluições do padrão. O volume final em cada tubo é de 0,7 cm^3 . Os tubos semeados são, então, incubados por 18 horas, após o que se examina a hemólise. Semeia-se uma alça (3mm) das culturas, junto ao ponto limite, em placas de ágar-sangue para controle de esterilidade”.

Este processo, segundo Rammelkamp, permite dosar concentrações pequenas de penicilina como 0,0039 unidades, em apenas 0,2 cm^3 de solução, prestando-se aos estudos clínicos em que se dispõe de mui pouco material. Apresenta, entretanto, o inconveniente de exigir filtração prévia do material contaminado como exsudatos, urina, etc.

Em 1943, WILSON³¹⁴ descreveu um processo de dosagem rápida da penicilina. Em realidade, é uma modificação do processo de Rammelkamp, permitindo leitura de resultados após 3 ou 3 1/2 horas.

Além de ser mais rápido, não exige condições assépticas, e sendo sempre controlado por um padrão, apresenta precisão e rapidez satisfatórias que o tornam indicado particularmente nas dosagens da penicilina, durante as fases de sua produção industrial.

A técnica é a seguinte: A solução de penicilina a ser dosada deve ser inicialmente diluída de modo a conter cerca de 1 unidade por cm^3 e, então, diluída em série de tubos de caldo. A esses tubos juntam-se 0,2 cm^3 de suspensão de 500 a 700 milhões de *Streptococcus beta-hemolyticus* do grupo A e 0,8 cm^3 de suspensão a 5% de eritrócitos lavados de carneiro. Após agitação, os tubos são incubados em banho-maria a 37°C., por 3 a 3 1/2 horas. Em seguida são centrifugados e examinados para verificação de hemólise; a ausência de hemólise indica a concentração bacteriostática da penicilina.

Deve-se ter o cuidado de lavar os estreptococos crescidos em ágar simples com caldo, antes do uso, para evitar a inclusão de hemolisina preformada.

RAKE e JONES²²⁹ descreveram, também, um processo de dosagem rápida (2-3 horas) em que empregam, como indicador de hemólise, sangue desfibrinado de coelho, a 1%. Acham que esta

concentração é melhor do que outra do sangue do mesmo ou de outro animal. Melhores resultados, também, obtiveram usando caldo de infusão de coração e procedendo à incubação em banho-maria a 37°C. Este processo foi publicado em novembro de 1943, enquanto o de Wilson³¹⁴ o foi em outubro do mesmo ano.

MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Em 1942, FOSTER⁹⁰ propôs um método turbidimétrico para dosagem da penicilina, baseando-se na verificação das doses crescentes desta substância que produzem, quantitativamente, proporcional inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* em caldo de cultura.

O crescimento do germe é medido turbidimetricamente como função inversa da concentração de penicilina no meio. Neste método, o crescimento do germe em diferentes diluições de amostras desconhecidas de penicilina é comparado com uma curva padrão de inibição que é sempre feita por ocasião das dosagens. O uso do padrão é necessário a fim de eliminar as variações devidas aos meios de culturas, fator pessoal, etc..

Segundo FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁵, é o método mais exato de dosagem, dando precisão de ± 10 a 15%. Essa precisão é conseguida mediante técnica especial e fastidiosa que o torna menos prático que o método das diluições seriadas. Estes autores verificaram, entretanto, que é método muito valioso, recomendando-o para fins especiais, tais como experiências de estabilidade da penicilina, estudos do pêso molecular por difusão, etc.

Fazendo-se as medidas turbidimétricas do crescimento com colorímetro fotoelétrico de Evelyn, e acelerando-se o crescimento do germe de prova por meio de inoculum maciço, conseguem-se leituras após 4 horas, comparadas com o mínimo de 16 ou 20 necessárias para os outros métodos satisfatórios.

FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁵ verificaram que 0,4 cm³ de cultura de *Staphylococcus aureus* em caldo de 20 horas, usados como inoculum, produzem o máximo de turbidez, numa proporção constante, e são a quantidade mais adequada para as dosagens rápidas de 4 horas de duração. Uma curva padrão é feita diariamente ao lado das preparações desconhecidas, das quais se fazem 3 a 5 diluições, dependendo do teor presumido, para cair na região dos três quartos centrais da curva padrão.

Os títulos das amostras são avaliados por comparação com a curva padrão.

INFLUÊNCIA DA GLICOSE

FOSTER e WILKER¹⁰³ verificaram que a presença de glicose, acima de 0,1%, no caldo de dosagem determina aparecimento de irregularidades específicas na curva de inibição.

As séries de caldo contrôle de pH 7.0 (tamponado com 1% de fosfato), sem glicose, ou as séries com 0,1% dêsse açúcar demonstram a comum curva côncava de inibição.

As séries com 0.5, 1.0 e 2.0 por cento de glicose dão curvas convexas, irregulares, próprias da glicose e demonstram, claramente, que êste açúcar modifica o caráter de inibição pela penicilina¹⁰³.

Usando-se caldo glicosado a 1% e abaixando-se o pH inicial de 7.0 para 5.5 os referidos autores obtiveram curva côncava normal, semelhante à obtida com 0,1% de glicose em caldo de pH 7.0.

Depreende-se dêste fato que o pH não parece exercer influência quando o meio é tamponado e não contém mais que 0,1% de glicose, porém, tanto em culturas em tubos de caldo como em placas de ágar contendo teor maior em glicose, a maior inibição da penicilina se obtém em pH inicial 5.5; com pH 6.0, 6.5 e 7.0 os títulos são menores, produzindo no método turbidimétrico curvas convexas irregulares¹⁰³.

A glicose, favorecendo estas curvas anormais de inibição, nos lembra que sua presença no meio pode, de alguma maneira, interferir no mecanismo normal da ação inibidora da penicilina ou modificar ou, ainda, inativar a penicilina.

FOSTER e WILKER¹⁰³ verificaram que o poder antibacteriano da penicilina é apreciavelmente diminuído em presença de glicose, em ausência de células bacterianas. Isto significa destruição de parte da penicilina, de modo que resta verificar se o produto resultante é substância antibacteriana menos ativa.

A transformação, segundo FOSTER e WILKER, é devida a uma reação química que se realiza, entretanto, mais rapidamente a 37°C. do que a 2°C; é, também, influenciada pelo pH e é determinada por outros açúcares.

Devemos lembrar que esta diminuição da atividade em presença de glicose, segundo os referidos autores¹⁰³, só aparece em certas condições de concentração da penicilina. Parece que o fato

não está bem esclarecido, faltando provas em condições bem definidas, principalmente em *meio de cultura de composição definida*.

Podemos, entretanto, já deduzir que o uso da glicose deve ser evitado, embora acelere o crescimento do germe de prova.

MÉTODO TURBIDIMÉTRICO RÁPIDO

FOSTER e WILKER¹⁰³ fizeram experiências com numerosas culturas e selecionaram o *Bacillus adherans* como germe de prova para o método turbidimétrico de tempo curto. Escolheram-no por crescer rapidamente, produzindo turvação em menor tempo, em condições de agitação e aeração forçada; além disso, é tão sensível à penicilina como o *Staphylococcus aureus* H.

MCMAHAN¹⁸¹ verificou que com o *Bacillus adherans* não se obtêm resultados concordantes com os do método do cilindro em placa. Recomenda o uso do *Staphylococcus aureus* H, como bactéria de prova, no método turbidimétrico rápido que estudou detalhadamente. Conseguiu boa estabilidade nas leituras turbidimétricas, usando colorímetro de célula fotoelétrica, o "Lumetron" modelo "402 E", equipado com transformador, de voltagem constante. Aperfeiçoando este método pôde concluir que, além de rápido, permitindo leituras de resultados após 3-4 horas, é, também, mais preciso do que o método do cilindro em placa.

VII

ANALISES DE CONTRÔLE DA PENICILINA

O emprêgo da penicilina, em terapêutica, que já se generalizou em alguns países, principalmente nos Estados Unidos, está, dia a dia, tomando mais vulto em nosso meio.

Infelizmente êsse precioso medicamento apresenta grande instabilidade, tendendo a perder sua atividade em mui pouco tempo, principalmente quando não conservado em condições adequadas.

O sal sódico da penicilina, que é o de maior uso corrente em terapêutica, possui o inconveniente de ser muito higroscópico, re-tendo umidade que lhe destrói rapidamente a atividade. Ademais, requer conservação em temperatura abaixo de 10°C. para prolongar sua estabilidade. Mesmo em estado sêco, e em baixa temperatura, o prazo de uso do sal sódico da penicilina não excede de um ano. Nessas condições, torna-se absolutamente necessário o contrôle sistemático dêste precioso medicamento, pelas autoridades sanitárias.

Os produtos de penicilina, usados entre nós, são importados dos Estados Unidos, onde são fabricados por numerosos laboratórios. Embora tais laboratórios produzam penicilina com grande rigor técnico, os motivos já apontados são mais que suficientes para que todos esses produtos devam ser previamente analisados. As análises de contrôle em amostras de cada partida, produzida ou importada, depõem nas mãos do médico maior segurança no uso de tão valioso recurso terapêutico.

Dada a importância do assunto, analisaremos as bases do contrôle da penicilina. O contrôle analítico da penicilina deve abranger as provas seguintes:

- Dosagem da atividade;
- Prova de pirogênio;
- Prova de inocuidade;
- Determinação de umidade;
- Prova de esterilidade.

Contrôle sistematisado dos produtos de penicilina é feito pela "Food and Drug Administration", de Washington. Por servirem de base para o controle desses produtos em nosso meio, relataremos os métodos usados pela F. D. A., revistos e mimeografados em janeiro de 1945.

DOSAGEM DA ATIVIDADE

O método de dosagem usado pela "Food and Drug Administration" é o método do cilindro em placa.

Cilindros (copos): São feitos de tubos de vidro pyrex ou de porcelana, aço inoxidável, ou alumínio, de parede standard da mesma espessura ($\pm 0,1$ mm) com 1,0 cm de comprimento e 8 mm $\pm 0,1$ mm de diâmetro externo. Os cilindros de 1,0 cm de comprimento, com exceção dos de aço inoxidável, são internamente biselados numa extremidade, num ângulo de 30° a 40°. Feito o bisel, a extremidade é polida com pó fino de polimento para deixar a borda lisa.

Penicilina padrão: O padrão primário é a penicilina sódica cristalina "G" (II). A unidade de penicilina foi definida, por acordo internacional como sendo a atividade específica da penicilina contida em 0,6 micrograma desse padrão primário.

Padrão de referência: Para o uso foi adotado um padrão de penicilina cálcica, do qual 2,7 microgramas equivalem a uma unidade, isto é, 1.0 miligrama equivale a 370 unidades.

Os padrões são conservados em vidrinhos hermêticamente fechados que, por sua vez, são colocados em tubos maiores contendo "Drierite" (CaSO_4 anidro). Os padrões são mantidos constantemente no compartimento de congelação de geladeira elétrica. Cada três dias são cuidadosamente pesados 4 a 5 miligramas do padrão de uso e diluídos em solução estéril de fosfato tampão, a 1% (pH 6.0), para fornecer solução-estoque contendo qualquer concentração conveniente. A diluição para uso diário é feita a partir dessa solução-estoque.

Preparo das amostras: Tôdas as amostras são primeiramente diluídas, assépticamente, em água destilada isenta de pirogênio, de modo a conterem as soluções 4.000 unidades por cm^3 . Para o

uso na dosagem da atividade coloca-se, em frasco volumétrico de 100 cm³, 1.0 cm³ da solução que contém 4.000 unidades/cm³ e completa-se o volume com água destilada estéril. Transfere-se 1,0 cm³ da solução contendo 40 unidades/cm³ para um frasco que contém 39 cm³ de fosfato tampão, a 1% e de pH 6.0. Esta solução, contendo 1.0 unidade/cm³, é, então, diluída, adicionando-se 1.0 cm³ dela a 3 cm³ de tampão, de modo a se obter solução contendo 0.25 unidade por cm³. Estas duas últimas diluições são as usadas na dosagem da atividade.

Meio de cultura: O ágar usado no método do cilindro em placa, como meio de cultura e como veículo do germe de prova tem a composição seguinte:

Peptona Dico	6.0 grs.
“N-Z Case peptone”	4.0 grs.
Extrato de levedura Difco	3.0 grs.
Extrato de carne Difco	1.5 gr.
Glicose	1.0 gr.
Ágar	15.0 grs.
Água destilada q. s.	1.000.0 cm ³

pH = 6.5 — 6.6 após a esterilização.

A fórmula do caldo para crescimento do *Staphylococcus aureus* para o método do cilindro em placa é a seguinte:

Peptona Difco	5.00 grs.
Extrato de levedura Difco	1.50 gr.
Extrato de carne Difco	1.50 gr.
Cloreto de sódio	3.50 grs.
Fosfato de potássio bibásico	3.68 grs. (pH 7.0)
Fosfato de potássio monobásico	1.32 gr.

Pode ser necessário modificar a fórmula do ágar, dependendo do tamanho e da nitidez da borda das zonas. A “N-Z Case peptone”, na presente fórmula, determina aumento na produção de pigmento e dá maior contraste entre as zonas claras e as do crescimento bacteriano. Pode-se variar o inoculum, de acordo com as condições existentes em qualquer laboratório. Por motivos ainda desconhecidos, se o diâmetro da zona de inibição excede de 24 mm. as bordas podem se tornar irregulares, dificultando leituras precisas. Antes que seja esclarecido êsse aumento ocasional do tamanho da zona, é difícil, senão impossível, usar meio padrão.

Preparo das placas: Adicionam-se a cada placa de Petri (20 × 100 mm) 21 cm³ de ágar. Após a solidificação do ágar, uni-

formemente distribuído, as placas são conservadas em geladeira até o dia seguinte ou podem permanecer vários dias antes do uso. O germe de prova é o *Staphylococcus aureus* (F. D. A. 209-P)* que é conservado em tubos de ágar inclinado, com repiques quase semanais. Na véspera da dosagem replica-se a cultura, do ágar inclinado, em caldo. No dia seguinte, adicionam-se 2 cm³ dessa cultura em caldo, incubada 16-24 horas, a 100 cm³ de ágar fundido e resfriado a 48°C. Misturam-se perfeitamente a cultura e o ágar, e adicionam-se 4 cm³ a cada placa contendo 21 cm³ de ágar não semeado. Inclina-se as placas para trás e para frente a fim de disseminar, uniformemente, o inoculum sobre a superfície do ágar. Substituem-se, então, as tampas de vidro das placas semeadas por outras de porcelana. Colocam-se os cilindros sobre a superfície do ágar, deixando-os cair pelos orifícios de um guia de cilindros, feito de matéria plástica¹.

Prova de atividade: Para cada amostra usam-se 4 placas. Enche-se um cilindro de cada placa com padrão contendo 1.0 unidade/cm³ e outro com padrão de 0.25 unidade. Os dois cilindros restantes de cada placa são enchidos com o desconhecido, em diluições avaliadas em 1.0 unidade e 0.25 unidade. Colocam-se as placas, cuidadosamente, em suportes e incubam-se a 37°C., durante 16-18 horas. Após a incubação, mede-se o diâmetro de cada círculo de inibição, com aproximação de 0.2 milímetros, usando aparelho de Quebec para contagem de colônias, com escala milimetrada gravada no suporte de vidro que fica sobre a fonte luminosa.

*Avaliação da atividade e do erro*²: Para se avaliar a atividade e o erro de dosagem usam-se o gráfico e o nomograma anexos. Para usar o gráfico a fim de calcular a atividade são necessários dois valores denominados V e W. As equações para encontrar V e W são:

$$V = \Sigma [(u_L + u_H) - (s_L + s_H)] \quad \text{e} \quad W = \Sigma [(u_H + s_H) - (u_L + s_L)]$$

Nestas equações, u_H e u_L representam, respectivamente, os diâmetros em milímetros, das zonas de inibição das diluições 1.0 unidade e 0.25 unidade do desconhecido, e s_H e s_L representam, de modo semelhante, as diluições correspondentes do padrão. Os va-

(*) Esse germe pode ser obtido da "The American Culture Collection, Georgetown University, 3900 Reservoir Road, Washington, D.C." Seu número na coleção é 6538.

¹Science, 101: 99-100 (1945)

²Science, 101: 46-48 (1945)

lores de V e de W, determinados pela soma de todos os valores de v e de w, são localizados no gráfico, seguindo-se as linhas em direção para cima e em transversal até sua interseção. O ponto de interseção cairá sobre ou entre as linhas traçadas no gráfico. Prolonga-se o ponto de interseção para a extremidade do gráfico, na direção das linhas e lê-se a atividade em termos da porcentagem do padrão. O erro de dosagem pode ser avaliado, usando-se o nomograma que requer cinco valores, isto é, a atividade, V, W, R_v e R_w, onde R_v representa a amplitude dos v e R_w a amplitude dos w. No cálculo do erro de dosagem usam-se apenas valores absolutos de V, W, R_v e R_w. Unem-se os valores de W e de V com esquadro e coloca-se um alfinete onde o esquadro cruza a linha diagonal. Então, corre-se o esquadro de modo que se dê a interseção de R_w e a linha diagonal, no ponto do alfinete. Determina-se o valor de Q pelo ponto em que o esquadro cruza a linha "Q". Obtém-se T por soma dos quadrados de Q e R_v. Unem-se no lado esquerdo do nomograma os valores de T e W, com o esquadro e lê-se o valor da relação (erro de dosagem ÷ atividade) onde o esquadro corta a coluna de valores da relação. Este valor multiplicado pela atividade equivale à porcentagem do erro de dosagem.

Damos, a seguir, um exemplo de dosagem típica com os cinco valores considerados:

DOSAGEM DA PENICILINA PELO MÉTODO DO CILINDRO EM PLACA

PADRÃO DESCONHECIDO						
Placa	s _L	s _H	u _L	u _H	v	w
N.º	.25 u/m mm	1.0 u/mg mm	.25 u/mg mm	1.0 u/mg mm	ou (u _L + u _H) - (s _L + s _H)	ou (s _H + u _H) - (s _L + u _L)
1	16.0	22.5	15.0	20.0	-3.5	11.5
2	16.2	22.5	14.5	19.5	-4.7	11.3
3	16.0	22.5	15.0	22.0	-1.5	13.5
4	15.0	22.0	14.0	21.0	-2.0	14.0
Soma	63.2	89.5	58.5	82.5	-11.7 = V	50.3 = W
Amplitude	—	—	—	—	3.2 = R _v	2.7 = R _w

Atividade = 72% do padrão
 Erro de dosagem = ± 6.3% do padrão

PROVA DE PIROGÊNIO

Teste animal: Usam-se coelhos sadios, pesando 1.000 gramas ou mais, mantidos, pelo menos, durante uma semana em dieta sem carência e uniforme, e que não tenham perdido pêsos durante este período. Os animais utilizados em provas de pirogênio podem ser usados em testes subseqüentes, após período de não menos que 2 dias. Em cada animal usado para prova, fazem-se 4 leituras de temperatura retal, com intervalos de 2 horas, 1 a 3 dias antes do uso. De modo semelhante, tiram-se as temperaturas retais dos animais que tenham sido usados por período de 2 semanas. Emprega-se termômetro clínico após determinar o tempo necessário para dar a temperatura máxima. Insere-se o termômetro além do esfíncter interno, deixando-o durante tempo suficiente para dar a temperatura máxima; nunca menos de 90 segundos. Alojamos os animais de prova em gaiolas individuais que os abriguem de perturbações tais que determinem excitação. Deve-se tomar cuidados especiais para evitar que os animais fiquem excitados no dia de se tomar as temperaturas de controle e no dia de prova. Mantêm-se os animais, durante todo tempo, em ambiente de umidade e de temperatura uniformes ($\pm 5^{\circ}\text{C}.$).

Marcha do teste: Realiza-se a prova na mesma sala em que os animais estão alojados. Durante o teste, mantêm-se os animais em alojamentos individuais. Suspende-se a alimentação, uma hora antes de se tomar a primeira temperatura, e não se dá mais alimento até que se complete o dia de registro. Faz-se controle de temperatura na véspera da injeção do material de prova. Não se usam, na prova, animais cujas temperaturas de controle sejam de $38.8^{\circ}\text{C}.$ ou inferior e de $39.9^{\circ}\text{C}.$ ou superior. A temperatura tomada no dia da prova constitui a normal do teste animal, da qual calcula-se a subseqüente elevação após injeção do material de prova. Aquece-se a, aproximadamente, $37^{\circ}\text{C}.$ o produto a ser examinado e injetam-se 2.000 unidades, por quilo do coelho, numa veia da orelha, dentro dos 15 minutos que se seguem após a leitura da temperatura de controle, no dia da prova. Obtêm-se as 2.000 unidades, diluindo-se o material contendo 4.000 unidades (ver "Preparo da amostra") com parte igual de água destilada e isenta de pirogênio. Fazem-se registros de temperatura 1 hora após a injeção e em cada hora subseqüente, até que se façam 3 registros.

As seringas e agulhas usadas para estas injeções devem ser tratadas de modo a se tornarem livres de pirogênio e, então, esterilizadas. (Pode-se obter seringas e agulhas isentas de pirogênio, aquecendo-as em mufla a 250°C, pelo menos, durante 30 minutos). Usam-se 3 coelhos para cada teste, que é considerado positivo quando 2 ou 3 animais revelarem aumento individual na temperatura, de 0.6°C. ou mais, acima da normal estabelecida para cada um destes animais. Se apenas um animal demonstrar resposta positiva, de 0.6°C. ou mais, repete-se a prova em 5 outros coelhos. O teste é considerado positivo se 2 ou mais destes 5 animais revelarem aumento individual na temperatura de 0.6°C. ou mais, acima da normal estabelecida para estes animais.

PROVA DE INOCUIDADE

Nas provas para determinação da presença de impurezas tóxicas na penicilina sódica, injeta-se, na veia de 5 camundongos pesando 18-25 grs., em cada um, 0.5 cm³ de solução contendo 4.000 unidades (ver "Preparo da amostra"). Não deve ocorrer morte dentro de 48 horas. Se um animal morrer, a prova deverá ser repetida com camundongos não usados, pesando 20 grs. cada um, e se todos animais sobreviverem após a nova prova, o produto poderá ser considerado satisfatório. Os camundongos podem novamente ser usados em testes subseqüentes.

DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Coloca-se a amostra pesada sobre P₂O₅, em dessecador a vácuo, com menos de 1.0 mm de pressão, durante 72 horas. No fim deste tempo, deixa-se entrar ar sêco no dessecador; fecha-se imediatamente o frasco pesado e torna-se a pesá-lo. Retorna-se a amostra ao dessecador a vácuo, seca-se durante mais 24 horas e pesa-se outra vez. Esta última operação é repetida até que a perda de pêso, em período de 24 horas, seja menos do que 0,5% do pêso original da amostra.

PROVA DE ESTERILIDADE

A "Food and Drug Administration", nos métodos revistos e mimeografados em janeiro de 1945, não descreve a prova de este-

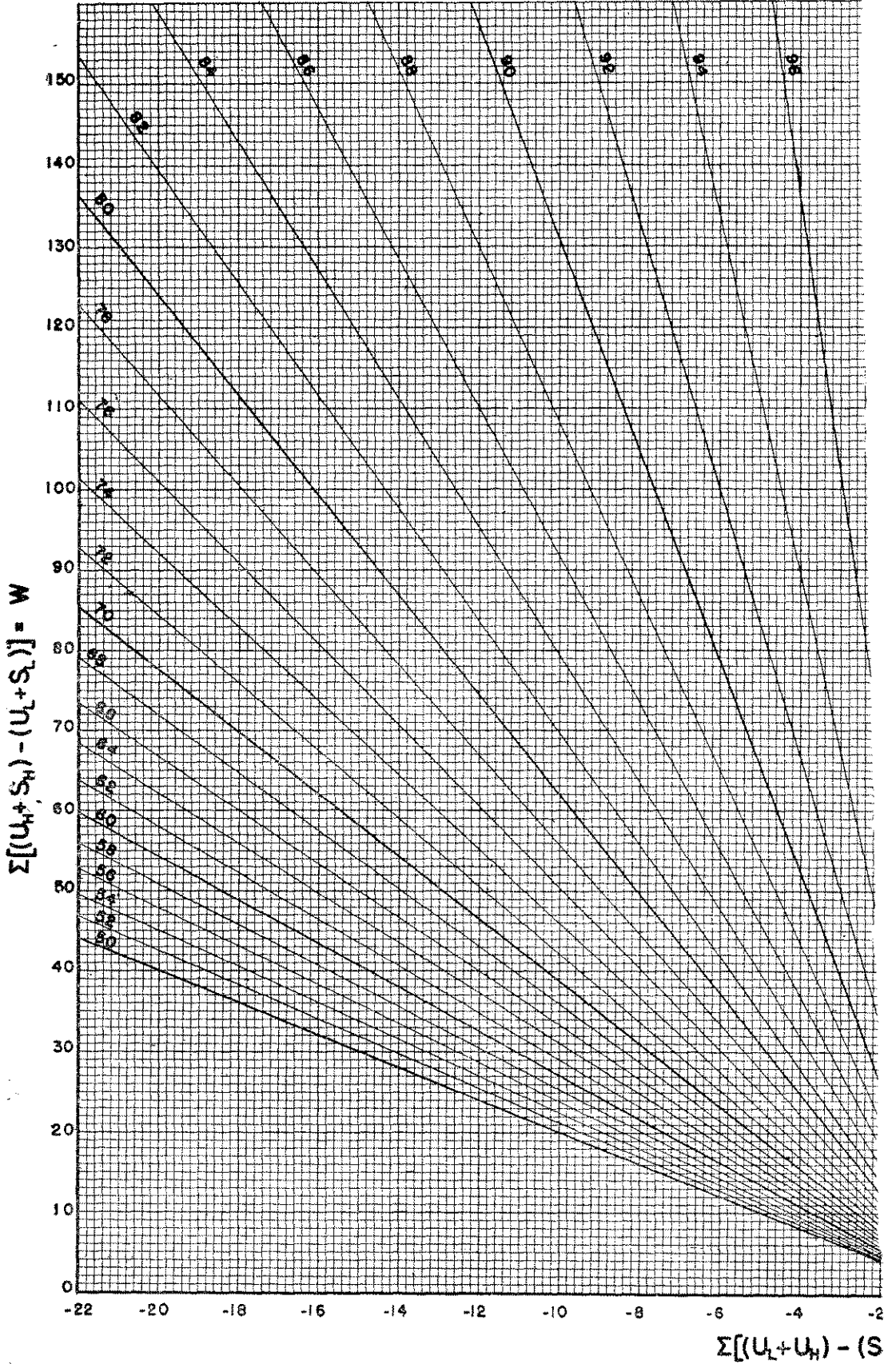
rilidade, mencionando-a como "RESTRICTED"; entretanto, em descrição anterior (1944) a F. D. A. refere-se ao uso da clarase a 4%, para inativar a penicilina.

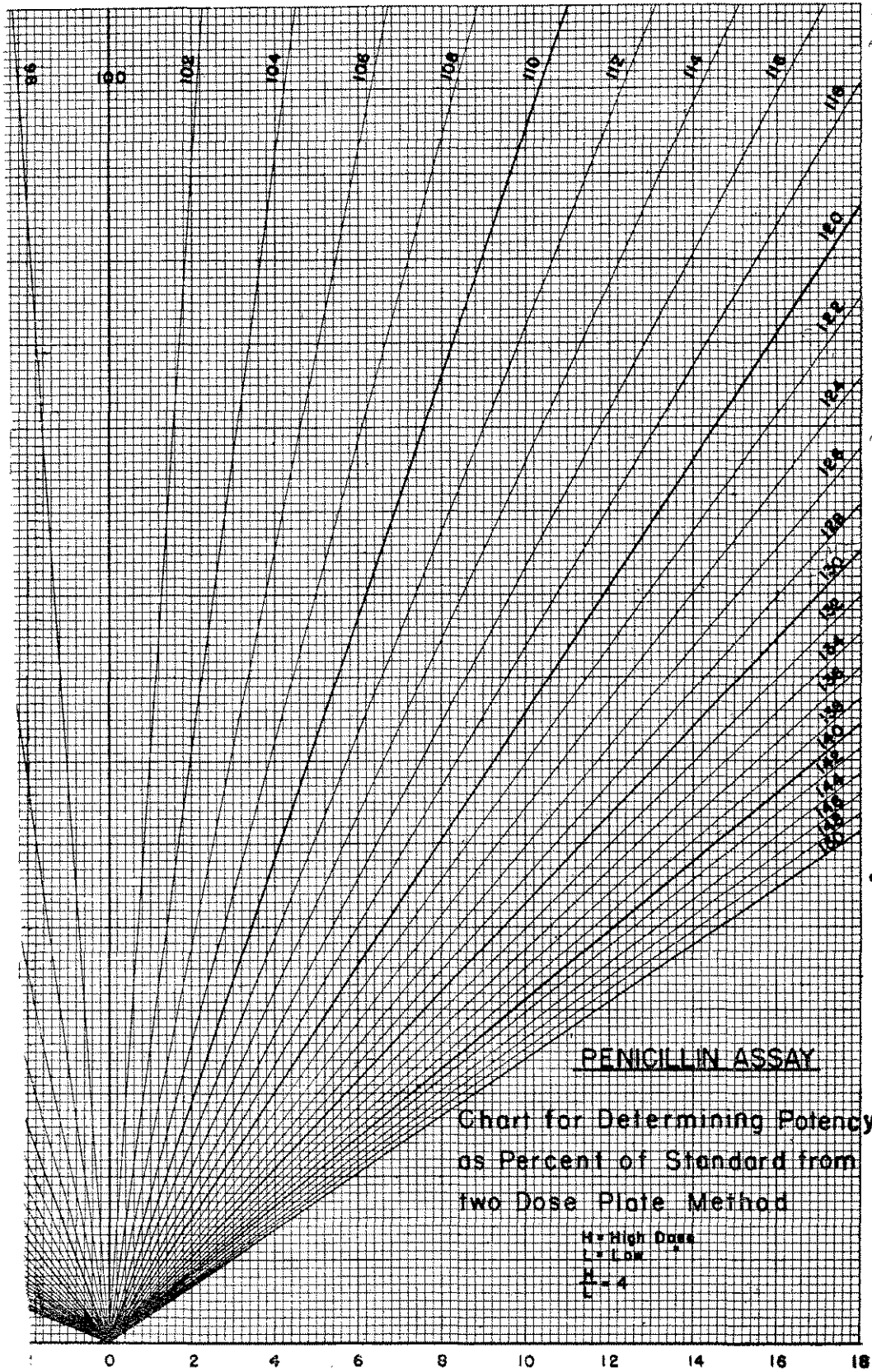
Como vimos em páginas anteriores, UNGAR²⁸⁸, nas provas rotineiras de esterilidade, adicionava filtrado de cultura de *B. subtilis*, contendo penicilinase, substância que inativa a penicilina.

Já referimos, também, que LIEBERMANN e outros¹⁶⁹ descreveram um método de obtenção de penicilinase purificada que era superior à clarase usada por LAWRENCE¹⁶² em provas de esterilidade da penicilina.

Recentemente, Hickey, R. J. (Science, 1945, 101: 232-234) verificou que o cloridrato de cisteína, em solução filtrada em Seitz, inativa a penicilina e sugeriu seu uso em provas rotineiras de esterilidade deste antibiótico.

THE FREDERICK POST CO CHICAGO





PENICILLIN ASSAY

Chart for Determining Potency
 as Percent of Standard from
 two Dose Plate Method

H = High Dose
 L = Low
 $\frac{H}{L} = 4$

$[L + S_H] = V$

PENICILLIN ASSAY

Nomographs for estimating Error of Assay

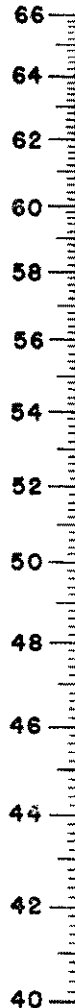
(2 dose, 4 plate method. Ratio of doses 4:1)

Ratio: Error of Assay/Potency

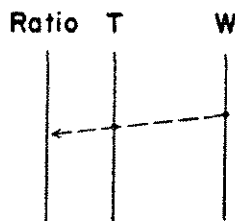


$$T = R_v^2 + Q^2$$

$$W = \Sigma[(U_H + S_H) - (U_L + S_L)]$$



Legend



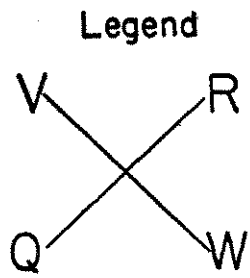
Note: R_v = Range of v

R_v or Q R_v^2 or Q^2

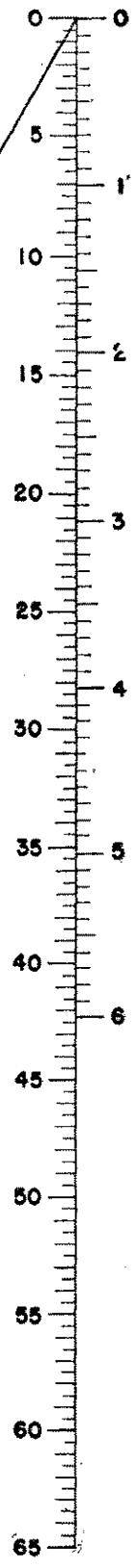
.05	.002
.10	.010
.15	.022
.20	.040
.25	.062
.30	.090
.35	.122
.40	.160
.45	.202
.50	.250
.55	.302
.60	.360
.65	.422
.70	.490
.75	.562
.80	.640
.85	.722
.90	.810
.95	.902
1.00	1.000
1.05	1.102
1.10	1.210
1.15	1.322
1.20	1.440
1.25	1.562
1.30	1.690
1.35	1.822
1.40	1.960
1.45	2.102
1.50	2.250
1.55	2.402
1.60	2.560
1.65	2.722
1.70	2.890
1.75	3.062
1.80	3.240
1.85	3.422
1.90	3.610
1.95	3.802
2.00	4.000
2.05	4.202
2.10	4.410
2.15	4.622
2.20	4.840
2.25	5.062
2.30	5.290
2.35	5.522
2.40	5.760
2.45	6.002
2.50	6.250
2.55	6.502
2.60	6.760
2.65	7.022
2.70	7.290
2.75	7.562
2.80	7.840
2.85	8.122
2.90	8.410
2.95	8.702
3.00	9.000
3.05	9.302
3.10	9.610
3.15	9.922
3.20	10.240
3.25	10.562
3.30	10.890
3.35	11.222
3.40	11.560
3.45	11.902
3.50	12.250
3.55	12.602
3.60	12.960
3.65	13.322
3.70	13.690
3.75	14.062
3.80	14.440
3.85	14.822
3.90	15.210
3.95	15.602
4.00	16.000



$$V = \Sigma[(U_H + U_L) - (S_H + S_L)]$$



$$W = \Sigma[(U_H + S_H) - (U_L + S_L)]$$



R_w = Range of w

VIII

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DA PENICILINA

A penicilina é poderosa substância antimicrobiana que difere dos antissépticos ou desinfetantes químicos, pelo modo de sua ação.

Os antissépticos químicos em geral agem como venenos citoplasmáticos, destruindo, em concentrações adequadas, não só as bactérias invasoras do organismo como, também, os próprios leucócitos e outras células dos tecidos do hospedeiro.

A penicilina, pelo contrário, não é veneno protoplásmico mas exerce ação antibacteriana afetando a atividade funcional de certos microrganismos. Determina certas mudanças morfológicas nos germes sensíveis e interfere em seus processos metabólicos normais, especialmente sobre a reprodução.

A ação antimicrobiana da penicilina é seletiva, manifestando-se, principalmente, sobre determinadas bactérias e alguns protozoários, como o *Treponema pallidum* e a *Borrelia novyi*. Ainda não houve demonstração cabal de que a penicilina é também fungistática ou fungicida.

A atividade antibacteriana da penicilina, embora seletiva, abrange ampla série de germes, cujos limites ainda não estão perfeitamente determinados. Sua maior eficiência é verificada com as bactérias Gram-positivas, quer aeróbias, quer anaeróbias.

Embora a maior parte das Gram-negativas seja insensível à penicilina, no gênero *Neisseria* encontram-se 3 espécies que se agrupam entre os germes mais sensíveis. Isto apresenta interesse especial por se tratar de três cocos patogênicos: *N. gonorrhoeae* (gonococo), *N. intracellularis* (meningococo) e *N. catarrhalis* (micrococcus).

Entre as bactérias Gram-positivas aeróbias, no grupo dos cocos se incluem as mais sensíveis: estafilococos, estreptococos e pneumococos.

Algumas divergências encontramos entre os autores quanto à sensibilidade ou insensibilidade à penicilina, de certas espécies mi-

crobianas, em provas ora realizadas "in vitro" ora "in vitro" e "in vivo".

Para maior facilidade de análise e de estudo, apresentamos, no quadro I, a relação dos microrganismos sensíveis e insensíveis à penicilina. Essa relação encontramos em publicação de "Abbott Research Laboratories"⁷⁹, em que estão indicados os autores que fizeram as referidas pesquisas e cujos trabalhos foram publicados de 1940 em diante.

MODO DE AÇÃO DA PENICILINA

Com relação aos agentes infecciosos que atacam o organismo humano, FINDLAY⁸⁴ classifica os agentes quimioterápicos em indiretos e diretos.

Os agentes quimioterápicos indiretos, conforme o nome indica, exercem ação de forma indireta, determinando mudanças físicas que podem impedir o crescimento dos germes que lhes são sensíveis. Pertence a êsse caso, por exemplo, o mandelato de amônio que, acidificando a urina, é usado no tratamento das bacteriúrias. Além das modificações físicas, os agentes indiretos podem estimular a formação de anticorpos ou determinar alterações citológicas nos tecidos locais, como acontece com as preparações estrogênicas no tratamento da vulvo-vaginite gonocócica infantil.

Os agentes quimioterápicos diretos são os que exercem ação por contacto direto, face a face com os agentes infecciosos. Pertencem a êsse grupo as sulfonamidas e a penicilina. Quanto ao seu mecanismo de ação podemos considerar 3 fases:

- 1.^a adsorção ou fixação da droga pelo germe;
- 2.^a interferência sôbre o metabolismo microbiano;
- 3.^a morte do germe ou comprometimento tal do agente patogênico que o mesmo é destruído pelos fagócitos do hospedeiro.

É facilmente explicável a primeira fase, simplesmente física, porque a penicilina não age à distância, manifestando sômente sua atividade antibiótica por contacto direto com os germes sensíveis.

A segunda fase é muito mais interessante; é fase biológica, sôbre a qual faremos algumas considerações.

QUADRO I

MICROORGANISMOS SENSÍVEIS E INSENSÍVEIS À PENICILINA

Germe	Sensível	Insensível
<i>Actinomyces</i>	<i>in vitro</i> clanicamente	<i>in vitro</i> clanicamente
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	clanicamente
<i>B. mycoides</i>	<i>in vitro</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>in vitro</i>
<i>Borrelia novyi</i>	<i>in vitro</i>
<i>Bor. recurrentis</i>	<i>in vivo</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>in vivo</i>
<i>Br. melitensis</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cl. botulinum</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cl. chauvoei</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cl. histolyticum</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cl. novyi</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cl. perfringens (Cl. welchii)</i> .	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>
<i>Cl. septicum</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>
<i>Cl. tetani</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cl. tetanomorphum</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cl. tyrosinogenes</i>	<i>in vitro</i>
(<i>Cl. sporogenes</i>)	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
Grupo coli-tífico
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>in vitro</i>
<i>C. diphtheriae</i>	<i>in vitro</i>
<i>Cryptococcus hominis</i>	<i>in vitro</i>
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	<i>in vitro</i> <i>in vitro</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , Tipo I <i>in vivo</i> , Tipo II <i>in vivo</i> , Tipo I, II, III cultura de tecido
<i>Eberthella typhosa</i>	<i>in vitro</i> <i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>in vitro</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>
<i>Hemophilus influenzae</i>	clanicamente <i>in vitro</i>
(<i>B. Pfeiffer</i>)	

QUADRO I (cont.)

Germe	Sensível	Insensível
<i>H. pertussis</i>	<i>in vitro</i>
Virus da influenza PR. 8....	<i>in vitro</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
(<i>B. friedlaenderi</i>)	<i>in vivo</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>in vitro</i>
<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	<i>in vitro</i>
.....	<i>in vivo</i>
<i>Listerella</i>	<i>in vitro</i>
<i>Micrococcus flavus</i>	<i>in vitro</i>
<i>M. lysodeikticus</i>	<i>in vitro</i>
<i>Monilia albicans</i>
<i>Monilia candida</i>	<i>in vitro</i>
<i>Monilia krusei</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
<i>Neisseria catarrhalis</i>	<i>in vitro</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>in vitro</i>
.....	<i>clnicamente</i>
<i>N. intracellularis</i>	<i>in vitro</i>
.....	<i>clnicamente</i>
Virus da ornithosis	<i>in vivo</i>
<i>Pasteurella cuniculicida</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
(<i>P. lepi-septica</i>)
<i>P. pestis</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Plasmodium relictum</i>	<i>in vivo</i>
<i>P. vivax</i>	<i>clnicamente</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
.....	<i>clnicamente</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
.....	<i>clnicamente</i>
<i>Ps. fluorescens</i>	<i>in vitro</i>
<i>Salmonella</i>	<i>in vivo</i>
<i>S. enteritidis</i> (<i>S. gaertneri</i>) .	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
.....	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>S. paratyphi</i>
<i>S. schottmuelleri</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
(<i>S. aertrycke</i>)
<i>Serratia marcescens</i>	<i>in vitro</i>
(<i>B. prodigiosus</i>)
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
.....	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
<i>S. paradysenteriae</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
(<i>B. flexneri</i>)
<i>S. sonnei</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>

QUADRO I (cont.)

Germe	Sensível	Insensível
<i>Spirillum minus</i>	<i>in vitro</i>
<i>Staphylococcus albus</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> , 1 raça
	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
	<i>in vivo</i>
	cultura de tecido
	clnicamente
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>in vitro</i>
<i>Str. durans</i>	<i>in vitro</i>
<i>Str. equinus</i>	<i>in vitro</i>
<i>Str. faecalis</i>	<i>in vitro</i>
	<i>in vivo</i>
	cultura de tecido
<i>Str. lactis</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
<i>Str. liquefaciens</i>	<i>in vitro</i>
<i>Streptococcus</i> (não hemolítico)	clnicamente	clnicamente
<i>Str. pyogenes</i>	<i>in vitro</i>
(<i>Str. hemolyticus</i>)	<i>in vivo</i>
	cultura de tecido
	clnicamente
<i>Str. salivarius</i> (<i>Str. viridans</i>)	<i>in vitro</i>	clnicamente
	<i>in vivo</i>
	cultura de tecido
<i>Toxoplasma</i>	<i>in vivo</i>
<i>Treponema pallidum</i>	clnicamente
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>in vivo</i>
<i>T. equiperdum</i>	<i>in vivo</i>
<i>T. lewisi</i>	<i>in vivo</i>
<i>T. rhodesiense</i>	<i>in vivo</i>
<i>Typhus rickettsiae</i>	<i>in vivo</i>
<i>Vibrio comma</i>	<i>in vitro</i>

INTERFERÊNCIA SOBRE O METABOLISMO MICROBIANO

A penicilina não é antisséptico e não exerce ação bactericida direta, embora seu poder bacteriostático para os estreptococos e estafilococos seja tão grande ou maior do que o dos mais poderosos antissépticos conhecidos.

A penicilina, ao contrário das sulfonamidas, é mui pouco influenciada pelo número de bactérias presentes, pois, diluída a

1:1.000.000 ainda impede completamente a multiplicação de vários milhões de estafilococos ou estreptococos, por centímetro cúbico de meio.

A atividade da sulfanilamida sobre esses germes é incomparavelmente menor.

Em provas bacteriostáticas que fizemos com o *Streptococcus pyogenes* verificamos ser ele só inibido em meio contendo, no mínimo, sulfanilamida em concentração de 1:2.000. Em concentração a 1:20.000 o estreptococo cresceu bem, tanto em caldo glicosado como em caldo comum.

Essa grande diferença de atividade pode ser explicada pela interferência de metabólitos essenciais ao crescimento bacteriano presentes nos meios de cultura, conforme as observações de RUBBO e GILLESPIE²⁵⁶. Verificaram que o ácido p-aminobenzóico é mais do que um metabólito essencial; é fator de crescimento bacteriano que deve estar presente no meio de cultura para que se dê o crescimento de certos germes.

Verificaram, também, que uma parte do ácido para-aminobenzóico é suficiente para impedir a ação bacteriostática de 26.000 partes, em peso, de sulfanilamida.

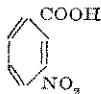
O ácido para-nitrobenzóico, a p-aminobenzamida e a procaina são igualmente ativos como fatores de crescimento e como agentes anti-sulfamídicos.

Estes fatos podem ser facilmente observados com o *Clostridium acetobutyricum*, bactéria usada na produção industrial do álcool butílico e acetona, por fermentação, e que exige traços de ácido p-aminobenzóico para que se dê o seu crescimento em meio de cultura de composição química definida, isto é, meio sintético.

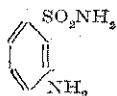
Muito interessante é a semelhança de fórmula estrutural entre a sulfanilamida e os vários compostos que impedem sua ação bacteriostática.



ácido p-aminobenzóico



ácido p-nitrobenzóico



p-aminobenzosulfamida

Segundo FILDES⁸³, o ácido p-aminobenzóico, metabólito essencial da bactéria, está normalmente associado a uma enzima, e, a sulfanilamida, sendo estruturalmente semelhante a êle, é capaz, em concentração suficiente, de deslocar o ácido p-aminobenzóico da enzima e paralisar esta linha essencial de metabolismo.

Sob êste ponto de vista, a sensibilidade de um germe à sulfanilamida dependeria, pelo menos em parte, da sua capacidade de sintetizar, mais ou menos rapidamente, o ácido p-aminobenzóico. Um germe cuja capacidade de síntese do referido ácido é pequena seria mais sensível do que um de grande poder. De modo semelhante, elevado número de bactérias será menos afetado por determinada concentração de sulfanilamida do que pequeno número.

A presença ou não de ação inibidora tornar-se-ia questão de proporção entre a sulfanilamida e o ácido p-aminobenzóico, afetando as enzimas de cada célula microbiana. Falam a favor desta hipótese de FILDES numerosas experiências “in vitro” e “in vivo”. Para não nos estendermos demais, citaremos apenas as experiências de SELBIE²⁶⁶ que verificou o antagonismo “in vivo” destas substâncias, pela morte de camundongos por infecção estreptocócica, em presença de dose curativa de sulfanilamida, quando era também adicionado o ácido p-aminobenzóico.

Com a penicilina, provávelmente, verifica-se fenômeno semelhante. Não é o ácido p-aminobenzóico que a inativa, porém, outras substâncias de constituição ainda não definida, produzidas também por bactérias. Tais substâncias que descrevemos ao tratarmos dos inativadores da penicilina são: a clarase, descrita por LAWRENCE¹⁶² e a penicilinase produzida pela *Escherichia coli*¹ e pelo *B. subtilis*²⁸⁸. Podemos comparar a penicilinase, em relação à penicilina, com o ácido p-aminobenzóico, em relação à sulfanilamida.

Com efeito, a ação inibidora da penicilina pelo menos, em relação ao *B. subtilis*, dependeria da maior ou menor capacidade de produção da penicilinase por êste germe. Falam a favor desta nossa hipótese: 1.º) a grande sensibilidade, igual à do *Staphylococcus aureus* H, à penicilina, de uma raça de *B. subtilis* usada por FOSTER e WOODRUFF¹⁰⁷ para dosagem dêste antibiótico;

2.º) a pequena sensibilidade, menor do que a do *St. aureus* H, de outra raça de *B. subtilis* que experimentamos e à qual já nos referimos ao tratarmos dos métodos de dosagem;

3.º) a absoluta resistência de uma terceira raça de *B. subtilis*, usada por UNGAR²⁸⁸, para preparar a penicilinase com o fim de inativar a penicilina, nas provas de esterilidade desta substância.

Depreende-se destes fatos que a maior ou menor sensibilidade deste germe estaria dependendo da sua capacidade de produzir penicilinase.

Não há, entretanto, estudos suficientes que nos permitam concluir dessa forma em relação aos outros germes.

Quando se tornar conhecida a estrutura química da penicilinase ou da clarase, como se conhece a do ácido p-aminobenzoico, fazendo provas "in vitro", usando meio de composição química definida e provas "in vivo", poderemos sondar melhor esse interessante e ainda misterioso mecanismo de ação antibiótica.

Visto, dêsse modo, o mecanismo de ação bacterio-inibidora da sulfanilamida e da penicilina, passemos a analisar os efeitos da ação antibiótica, ou melhor, as propriedades antibacterianas da penicilina.

ALTERAÇÕES DA MORFOLOGIA E DIVISÃO DAS BACTÉRIAS

Interessantes estudos sobre as alterações morfológicas das células bacterianas podem ser feitos em meios contendo concentrações de penicilina menores do que as necessárias para inibir totalmente o crescimento das mesmas.

GARDNER¹¹² verificou que a penicilina, em concentração 8 a 30 vezes menor do que a necessária para inibir o crescimento de germes em forma de bacilos, produz alteração notável na sua morfologia, alteração que parece ser, principalmente, devida à impossibilidade de divisão. Observou, ao microscópio, que a maior parte desses bacilos cresce, assumindo a forma de filamentos, mais longos muitas vezes que a bactéria normal. Esses filamentos não são segmentados, pois, o crescimento se realiza sem conseqüente divisão e separação.

SMITH e HAY²⁶⁸ fizeram observações com o *Staphylococcus aureus* e notaram aumento no tamanho das células que cresciam em caldo-coração contendo 0,88 miligrama de penicilina por cm³. O exame em lâminas, destas culturas, revelou presença de pequenas massas de material granuloso, substâncias protoplasmáticas libertadas pela ruptura da parede celular.

Os estafilococos revelaram entumecimentos esféricos e divisão incompleta. Os estreptococos apresentavam divisão incompleta e também pleomorfismo caracterizado pela presença de cadeias mais longas, assim como formas em fuso e outras.

É possível que a penicilina exerça ação sobre a parede celular ou interfira na assimilação de um ou mais fatores necessários ao crescimento para a ativa divisão da célula em desenvolvimento.²⁶⁸

Adicionando-se à suspensões densas de *Staphylococcus aureus* concentrações muitas vezes maiores do que êsses autores usaram, não se observa entumescimento nem lise das células.

ABRAHAM e colaboradores³, pelo exame microscópico, observaram alterações que indicavam perturbações na divisão das bactérias submetidas à ação de diluições de penicilina muito maiores que as inibidoras do crescimento.

PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS

FLEMING⁸⁸, no seu trabalho original, com relação à inibição das bactérias, atribuiu à penicilina as seguintes propriedades: bacteriolíticas, bacteriostáticas e bactericidas.

Muita dúvida tem surgido sobre as propriedades antibacterianas da penicilina, considerando-a alguns simplesmente bacteriostática, outros apenas bactericida e, terceiros, bacteriolítica. Analisemos o problema.

PROPRIEDADE BACTERIOLÍTICA

FLEMING⁸⁸ referindo-se à propriedade bacteriolítica disse o seguinte: “Se o cogumelo tiver crescido em meio sólido e a massa com aspecto de feltro fôr extraída em solução salina normal, durante 24 horas, verificar-se-á que êste extrato terá propriedades bacteriolíticas. Se êste extrato fôr misturado com suspensão densa de estafilococos e incubado durante 2 horas a 45°C, ver-se-á que a opacidade da suspensão ficará nitidamente diminuída e, depois de 24 horas, a suspensão, antes opaca, estará quase límpida”.

Como vemos, não foi com o líquido de cultura ativo que FLEMING fêz a experiência, mas com um extrato do micélio do *P. notatum*; além disso, trabalhou em temperatura de 45°C., ao invêz de 35°-37°C., em que age melhor o bacteriófago de d'Hérelle e que é a temperatura ótima de crescimento do estafilococo.

Mesmo excluindo a hipótese da presença, no extrato usado por FLEMING, de outras substâncias, como a notatina, e admitindo-se somente a existência da penicilina, o fenômeno sofrido pelos estafilococos não deve ter passado de fenômeno de autólise dos corpos

bacterianos em condições de meio desfavorável e, principalmente, em temperatura elevada, disgenética para o germe experimentado.

Com efeito, nas várias vezes em que fizemos a dosagem da penicilina pelo método das diluições seriadas, em caldo, usando o *Staphylococcus aureus* como germe de prova, pudemos verificar o seguinte: 1.º) após 24 horas de incubação a 37°C., o caldo claro dos primeiros tubos, em que havia penicilina em maior concentração, transplantado para meio novo, não revelou crescimento, indicando que o germe fôra destruído;

2.º) o caldo de tubos seguintes, em que o teor de penicilina era menor, também não apresentava turvação; entretanto, sendo transferido para novo caldo, produzia turvação, reveladora de que tivera seu crescimento inibido mas ainda mantinha sua vitalidade.

Podemos concluir, então, que a penicilina em concentrações fortes é bactericida, e, em concentrações fracas, é bacteriostática, apenas impedindo o crescimento da bactéria.

PROPRIEDADES BACTERIOSTÁTICA E BACTERICIDA

HOBBY e colaboradores¹⁴⁴ fizeram provas com estreptococos hemolíticos e verificaram que a penicilina pode agir tanto como bactericida quanto como bacteriostática, dependendo unicamente das condições experimentais, porém não observaram lise desses germes.

Notaram que sua atividade antibacteriana era bem acentuada quando o germe sensível estava em multiplicação, a 37°C.. A 18°C., temperatura em que a multiplicação do germe é lenta, a penicilina manifestava ação moderada. A 4°C. não havia reprodução bacteriana e a penicilina não revelava ação bactericida nem bacteriostática.

HOBBY e colaboradores¹⁴⁴ obtiveram um sal de antimônio da penicilina, do qual 0,03 micrograma inibiam o crescimento de 2.000.000 a 4.000.000 de estreptococos.

Os numerosos sais obtidos da penicilina como os de sódio, cálcio, bário, estrôncio e amônio, parecem possuir a mesma ação bacteriostática "in vitro". Isso indica que a parte ativa reside unicamente na penicilina livre, ou no anion dos sais, funcionando a substância ativa como ácido orgânico. Com os sais de mercúrio, o poder antimicrobiano depende do gênero. Assim, são mais ativos, em ordem decrescente, o bicloreto, bromato e o ciâneto de mercúrio. Entre os sais de mercúrio, são mais ativos os de maior grau de dis-

sociação. Estes possuem ação antisséptica nas diluições a 1:10.000 e 1:30.000, estando muito aquém da atividade da penicilina, que impede o crescimento do *Staphylococcus aureus* mesmo em diluição a 1:25.000.000, considerando-se uma preparação que contenha 500 unidades/mgr.

Adicionando-se penicilina a uma cultura, nem sempre se obtém esterilização do meio. HOBBY e colaboradores¹⁴⁴ verificaram que diminui acentuadamente o número de germes vivos; observaram que, à medida que o tempo aumenta em proporção aritmética, o número de bactérias sobreviventes à ação da penicilina diminui em proporção geométrica. O logaritmo do número de bactérias sobreviventes forma uma linha reta em relação ao tempo, até 99% de germes serem destruídos, após o que poderá haver esterilização do meio ou dar-se novamente o crescimento do germe. Verificaram, ainda, por provas "in vitro", que a penicilina destrói mais rapidamente os pneumococos do que os estreptococos e que estes são destruídos em menor tempo do que os estafilococos.

RAMMELKAMP e KEEFFER²³² também verificaram, por provas "in vitro" que há diferenças de sensibilidade entre os estreptococos hemolíticos e os estafilococos; 0,0039 Unidade Oxford foi suficiente para matar 1.000 a 100.000 estreptococos hemolíticos, enquanto para esterilizar quantidades semelhantes de estafilococos era preciso cerca de 0,03 Unidades Oxford.

Embora quase todos os estafilococos, sem distinção de espécie, tipo ou raça, apresentem aproximadamente o mesmo grau de sensibilidade à penicilina, encontram-se, ocasionalmente, raças quase insensíveis⁹¹.

RAMMELKAMP e MAXON²³³ fizeram provas "in vitro" com 28 raças de estafilococos e verificaram que eram necessárias 0,02 a 0,35 unidades de penicilina para matar 1.000 a 30.000 células destes germes.

A sensibilidade de outras bactérias à penicilina poderá ser analisada no quadro II, que reproduzimos de ABRAHAM e colaboradores³. Estes pesquisadores, após terem feito estudos comparativos entre as características da ação antibacteriana da penicilina e das sulfonamidas sobre os estreptococos e estafilococos, chegaram às seguintes conclusões:

"1.º) O poder bacteriostático da P contra estreptococos e estafilococos é muito maior que o das sulfonamidas, mesmo quando estas substâncias são pesquisadas sob condições ótimas (inoculação

DILUIÇÕES DE PENICILINA NAS QUAIS FORAM OBSERVADOS DIVERSOS EFEITOS INIBIDORES

Espécies bacterianas	N.º de raças	Diluições nas quais foi observada inibição			Observações
		Completa	Parcial	Nula	
<i>N. gonorrhoeae</i> (*)	6	2.000.000	2.000.000	2.000.000
<i>N. meningitidis</i>	1	1.000.000	2.000.000	4.000.000
<i>Staph. aureus</i>	4	1.000.000	2.000.000	4.000.000
<i>Strep. pyogenes</i>	3	1.000.000	2.000.000	4.000.000
<i>B. anthracis</i>	1	1.000.000	2.000.000	4.000.000
<i>A. bovis (hominis)</i>	1	1.000.000	2.000.000	4.000.000	Culturas profundas em ágar glicosado, agitadas
<i>Cl. tetani</i> (1)	1	1.000.000	—	—	Limite não observado
<i>Cl. welchii</i>	1	1.500.000	—	—	Limite não observado
<i>Cl. septicum</i>	1	300.000	1.500.000	7.500.000	Foram usadas diluições quintuplas
<i>Cl. oedematiens</i>	1	300.000	—	1.500.000	Inoculação de esporos
<i>Strep. viridans</i> (2)	2	625.000	—	3.125.000	Ver, porém, outras raças abaixo
<i>Pneumococcus</i> (2)	6	250.000	500.000	1.000.000	3 do tipo I; 1 de cada um dos tipos: III, VII e IX. Quase completa a 500.000
<i>C. diphtheriae (mitis)</i>	1	125.000	—	625.000	Diluições intermediárias não pesquisadas
<i>C. diphtheriae (gravis)</i>	1	32.000	54.000	128.000
<i>S. gärtneri</i>	1	20.000	40.000	80.000
<i>S. typhi</i>	2	10.000	30.000	90.000	Registrado o mais alto dos dois resultados
<i>Pneumococcus</i> (2)	3	9.000	—	27.000	Tipos I, VII e XIX
<i>Streptococcus anaeróbio</i> (2)	1	4.000	8.000	16.000
<i>Proteus</i>	3	4.000	32.000	60.000	Registrada a melhor raça. As outras, 4 vezes menos sensíveis
<i>Strept. viridans</i> (2)	1	4.000	8.000	16.000
<i>Past. pestis</i>	2	1.000	100.000	500.000	Inibição parcial entre 1.000 e 100.000
<i>S. typhimurium</i>	1	1.000	8.000	16.000	Parcial 1.000 a 8.000
<i>S. paratyphi B.</i>	2	1.000	5.000	10.000	Parcial 1.000 a 5.000
<i>Bact. dysenteriae Shiga</i>	1	2.000	4.000	8.000
<i>Br. abortus</i>	1	2.000	4.000	8.000
<i>Br. melitensis</i>	1	1.900	2.500	10.000
<i>Strept. anaeróbio</i>	1	4.900	4.900	4.900
<i>V. cholerae</i>	1	1.900	1.900	2.900
<i>Bact. coli</i>	5	1.900	1.900	1.900	Uma raça mostrou completa a 200, nula a 400
<i>Bact. friedländeri</i>	1	1.900	1.900	1.900
<i>Ps. pyocyanea</i>	2	1.900	1.900	1.900
<i>Mycob. tuberculosis</i>	1	1.900	1.900	1.900	Ver texto
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1	3.600	3.600	3.600	Não foram pesquisadas diluições menores:

(*) Outra variedade só foi inibida até 32.000.

pequena, meios isentos de peptona etc.); as soluções aquosas saturadas de sulfapiridina e sulfatiazol não produzem inibição completa em placa, enquanto a penicilina a 1:500.000 produz apreciável zona clara;

2.º) a ação da penicilina sôbre os estreptococos e estafilococos, contrariamente à das sulfonamidas, sofre apenas influência mínima do número de bactérias a serem inibidas; mesmo quando os meios de cultura são inoculados com vários milhões de estafilococos e estreptococos por cm^3 , a multiplicação d'êstes germes pode ser completamente inibida pela penicilina, em concentração tão baixa como 1:1.000.000; com quantidades menores de inoculum dá-se inibição com diluições, ainda, maiores; esta propriedade da penicilina é de grande importância para o tratamento das feridas com infecção maciça, nas quais os medicamentos sulfonamídicos possuem apenas pequena ação favorável;

3.º) o poder bacteriostático da penicilina contra estreptococos e estafilococos não sofre ação antagônica apreciável por parte de produtos da degradação hidrolítica das proteínas, ou de produtos da autólise tissular ou pus, substâncias estas que anulam completamente a ação bacteriostática dos medicamentos sulfonamídicos "in vitro"; isso é, também, de grande importância para o tratamento de feridas supuradas, possibilitando o tratamento eficaz das infecções nas quais há abundante produção de pus".

Após o estudo das propriedades bacteriostáticas e bactericidas da penicilina, e de suas características de ação antibacteriana, podemos concluir que a aplicação prática dessa substância antibiótica apresenta sua maior importância em microbiologia e em terapêutica.

O emprêgo da penicilina em terapêutica constitui capítulo especial d'êste trabalho, pelo que analisaremos agora tão somente sua importância e suas aplicações em microbiologia.

DEMONSTRAÇÃO DE INIBIÇÕES BACTERIANAS

Interessantes demonstrações de inibição bacteriana, pela penicilina, foram relatadas por FLEMING⁹². Êste pesquisador, tratando com penicilina metade de uma placa de cultura e semeando em tôda sua superfície material de nasofaringe em estado catarral, verificou que não é raro encontrar numa das metades da placa, culturas puras

de pneumococos e de estreptococos e, na outra que contem penicilina, cultura pura do bacilo de Pfeiffer.

Depreende-se dêsse fato a possibilidade de isolamento fácil do *Hemophilus influenzae* de materiais contendo outras bactérias penicilino-sensíveis.

É sabido que de materiais ricos em bacilos de Pfeiffer se consegue separar êste germe dos cocos Gram-positivos, fazendo-se diluições elevadas que permitam o crescimento de colônias bem isoladas. Quando, porém, o *H. influenzae* se encontra em número reduzido, o isolamento é bastante difícil, pois, não se podendo diluir muito o material e crescendo as colônias dêsse germe muito próximas dos estreptococos e pneumococos sofrem, pelo menos, inibição parcial no seu crescimento.

Outro exemplo interessantíssimo referido por FLEMING⁹² é o da inibição do *Staphylococcus aureus* em presença do *B. violaceus*, insensível à penicilina. Estas duas bactérias, que são bastante coloridas foram semeadas numa placa em que crescêra uma colônia do cogumelo (*P. notatum*) e produzira penicilina. Semeando-se as bactérias coloridas por estria, até a colônia do fungo, verifica-se que próximo a esta última só cresce a bactéria de côr violeta (*B. violaceus*) visto que o estafilococo é inibido pela penicilina. Num ponto mais distante do cogumelo, o *Staphylococcus aureus* crescerá apresentando seu pigmento amarelo e inibindo completamente o *B. violaceus*. Nestas condições, semeando-se mistura dessas bactérias, consegue-se obter as culturas puras, em pontos diferentes da placa⁹².

A curiosidade científica de FLEMING⁹² não se deteve aí; tendo colocado um papel branco sôbre a placa semeada nas condições descritas, verificou que o meio nutritivo infiltrava-se no papel e permitia o crescimento das bactérias na superfície. Dessa forma via-se sôbre o fundo branco do papel, as côres lindas das bactérias pigmentadas. Conseguiu ainda, após esterilisar o papel com vapores de formol, montá-lo sôbre um cartão como amostra permanente.

FLEMING⁸⁹ empregou também a penicilina para demonstrar o antagonismo bacteriano entre o estreptococo e o *V. cholerae*. Semeou em placa uma mistura dos dois germes e espalhou penicilina só numa metade da placa. Em contato com a penicilina o estreptococo não cresceu, achando-se o *V. cholerae* em cultura pura. Na outra metade o vibrião colérico foi inibido pelo estreptococo que se achava, por sua vez, em cultura pura.

Dêsses exemplos é fácil deduzir a importância da penicilina no estudo do antagonismo entre as bactérias, desde que uma das espécies antagônicas seja penicilino-sensível.

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

Desde a descoberta de FLEMING a penicilina vem sendo usada para o isolamento de numerosas bactérias. O advento da penicilina, antes de depôr nas mãos do clínico uma poderosa arma terapêutica, trouxe ao bacteriologista preciosíssimo meio de isolamento de muitas bactérias.

O processo descrito por FLEMING⁸⁸ para o isolamento do *Hemophilus influenzae* constitui a primeira aplicação prática da penicilina. Para o isolamento de bactérias não é necessário usá-la purificada, pois, a penicilina bruta, que pode ser facilmente obtida em caldo comum, dá ótimos resultados.

FLEMING⁸⁹ usou a penicilina bruta para inibir o crescimento de bactérias que lhe são sensíveis e pôde isolar as menos sensíveis ou insensíveis.

O processo simples que empregou consiste em espalhar V a VII gotas de penicilina sobre metade do meio de cultura em placa, previamente semeado pela maneira habitual.

Este processo apresenta vantagens sobre a incorporação da penicilina ao meio (de forma a ter concentração homogênea), porque permite obter, na placa, uma área em que há ação intensa da penicilina e onde só crescem germes a ela insensíveis; uma zona de transição, onde a penicilina se difunde menos e na qual crescem os germes pouco sensíveis; e, finalmente, uma área livre de penicilina, onde se desenvolvem as bactérias muito sensíveis.

Grande grupo de bactérias resistentes à penicilina apresenta inibição no crescimento em placas de ágar, nas quais se adicionou telurito de potássio na diluição a 1:20.000.

Fato interessantíssimo, demonstrado por FLEMING⁸⁹, é que numerosas bactérias sensíveis à penicilina são insensíveis ao telurito de potássio e vice-versa, como mostra o quadro III.

O uso combinado da penicilina e do telurito torna-se, diante disso, indicado para o isolamento de bactérias insensíveis às duas substâncias, como o *Streptococcus faecalis* (enterococo), fungos, leveduras e algumas raças de *B. coli* e *Proteus*. Por esse meio não

se consegue isolar a *N. gonorrhoeae*, sensível tanto à penicilina como ao telurito.

QUADRO III

Microrganismo	Sensível +	
	penicilina	telurito
Staphylococcus	+	0
Streptococcus haemolytic	+	0
" <i>viridans</i>	+	0
Pneumococcus	+	0
Enterococcus	0	0
Gonococcus	+	+
Meningococcus	+
<i>M. catarrhalis</i>	+
<i>M. flavus</i>	0	+
<i>B. diphtheriae</i>	+	0
" <i>acidophilus</i>	+	0
" <i>anthracis</i>	0	+
" <i>influenzae</i>	0	+
" <i>paratyphosus</i>	0	+
" <i>pertussis</i>	0	+
" <i>typhosus</i>	0	+
" <i>paratyphosus</i>	0	+
" <i>pullorum</i>	0	+
" <i>coli</i>	0	+ ±
" Friedländer (<i>K. pneumoniae</i>) ..	0	+
" <i>pyocyaneus</i>	0	+
" <i>proteus</i>	0	+ ±
<i>V. cholerae</i>	0	+
<i>B. dysenteriae</i> { Shiga	0	+
Flexner	0	+
" <i>subtilis</i>	0	+
" <i>prodigiosus</i>	0	+

ISOLAMENTO DE HEMOPHILUS

Hemophilus influenzae — FLEMING e MC LEAN⁸⁸ semearam material de garganta de 25 enfermeiras, em resguardo por influenza, em placas de ágar-sangue fervido e, espalhando sôbre metade de cada placa II ou IV gôtas de penicilina bruta, conseguiram isolar o bacilo de Pfeiffer, em 23 casos.

Usando placas com o mesmo meio, porém, sem penicilina, e semeando-as com os mesmos materiais só conseguiram isolar o referido germe em 8 casos. Esta diferença de resultados se explica pelo fato de o *Hemophilus influenzae* não ser inibido pela penicilina e encontrar-se, nas vias respiratórias, freqüentemente associado à estreptococos, pneumococos, estafilococos e *N. catarrhalis*.

Lembremos, de passagem, que muitos cocos Gram-negativos encontrados na boca e na garganta são inteiramente insensíveis à penicilina.

BUXBAUM e FIEGOLI³⁶ adicionaram 10% de penicilina bruta ao ágar-sangue, para isolamento do *H. influenzae*, em 68 casos de laringite obstrutiva. A penicilina em caldo foi filtrada em vela Berkefeld N e usada na diluição que impedia o crescimento de 1 milhão de *St. aureus* em 10 cm³. de caldo, em 24 horas. Compararam êsse meio com o ágar-sangue sem penicilina e o ágar-sangue com oleato de sódio 0,1%, como recomendou Avery em 1921, para o isolamento do *H. influenzae*. Os resultados foram os seguintes:

	Placas com penicilina		Placas com oleato de sódio		Placas de ágar-sangue	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
<i>H. influenzae</i> — cultura pura	22	37,2	5	9,1	0	0
<i>H. influenzae</i> e 1 outro germe	34	57,2	32	58,2	8	24,2
<i>H. influenzae</i> e 2 outros germes	3	5,1	18	32,7	25	75,8
TOTAIS	59	100,0	55	100,0	33	100,0

Hemophilus pertussis — MACLEAN¹⁸⁰ obteve bons resultados usando placas com penicilina para isolamento do bacilo de Bordet e Gengou de material de indivíduos com coqueluche.

Tomando 50 placas semeadas com o referido material no ato da tosse, espalhou em metade de cada placa algumas gôtas de penicilina bruta. 47 placas foram positivas no lado da penicilina e somente 33 no outro.

Colhendo, porém, o material do faringe logo após o tossir, e semeando em placas, verificou 75% a 80% de resultados positivos

nas que continham penicilina e apenas 10% nas que não a continham. Nos dois processos de colheita de material, o emprêgo da penicilina permitiu sementeira mais densa porque as colônias dos estreptococos e estafilococos ficaram muito reduzidas.

Hemophilus ducreyi — NEGRONI, BALIÑA e JACHESKY²⁰⁹ conseguiram isolá-lo de um caso de cancro-mole, semeando o material, em placas, no seguinte meio adicionado de penicilina: caldo com 3% de ágar, 30% de sangue desfibrinado de coelho, 3% de hidrolisado de caseína e 3% de levedura de cerveja, hidrolisada (fatores de crescimento). Sôbre cada placa verteram VI gôtas de penicilina bruta com título aproximado de 30 Unidades Oxford por cm³. Nas placas de contrôle, sem penicilina, houve desenvolvimento abundante da flora saprófita, que não permitiu isolar o bacilo de Ducrey.

Este bacilo é penicilino-resistente, propriedade que permite seu fácil cultivo e assegura o diagnóstico nos casos duvidosos.

ISOLAMENTO DO *CORYNEBACTERIUM ACNES*

CRADDOCK⁶⁸ conseguiu obter, invariavelmente, culturas puras do bacilo do acne (do grupo differóide) isentas de estafilococos, semeando material de pústulas (22 casos) e lesões do acne (25 casos) em caldo glicosado, com penicilina bruta. As culturas foram feitas em condições de anaerobiose, pela seguinte técnica: deixou-se ferver os tubos de caldo glicosado (pH 8.0) para eliminar os gases; uma vez resfriados, foram semeados e adicionados de concentração duas vezes mais que a necessária para inibir o crescimento dos estafilococos (esta concentração foi determinada por prévia titulação); em seguida, juntou-se aos tubos vaselina estéril, aquecida, para formar sôbre o caldo camada de 0,5 a 1,0 centímetro de altura e incubou-se os mesmos a 37°C; após 60 horas de incubação, nestas condições de anaerobiose, havia visível crescimento do bacilo, e, depois de 4 dias, abundante. Por este método, o bacilo do acne foi isolado em cultura pura em tôdas as 47 amostras de material colhido de pústulas de acne e de cravos, ao passo que, usando caldo sem penicilina, 34 amostras deram crescimento do bacilo conjuntamente com estafilococos.

ISOLAMENTO DE *LISTERELLA*

FOLEY, EPSTEIN e LEE¹⁰¹, estudando 7 amostras de *Listerella*, verificaram que cresciam bem em meios contendo concentração de penicilina 40 vezes maior do que a necessária para inibir completa-

mente o crescimento de outras bactérias Gram-positivas, como estreptococos, estafilococos e pneumococo tipo I.

Diante destes resultados, cremos oportuno sugerir o uso de placas de ágar-extrato de fígado, adicionado de penicilina, para o isolamento destes germes exigentes.

ISOLAMENTO DE ESTREPTOCOCOS

BORNSTEIN³³, usando caldo glicosado a 1% com penicilina, conseguiu separar nitidamente tôdas as espécies dos grupos enterocócico e láctico (classificação de Sherman) de todos os outros estreptococos.

Os germes foram semeados em tubos contendo 5 cm³ de caldo glicosado adicionados de II gôtas de penicilina bruta, filtrada em Seitz, dosando 8 unidades por cm³ e incubados durante 24 horas.

As provas foram feitas com 27 culturas de enterococos, sendo 10 *Streptococcus faecalis*, 8 *Streptococcus liquefaciens*, 4 *Streptococcus zymogenes* e 5 *Streptococcus durans*. Tôdas estas culturas do grupo enterocócico mostraram-se uniformemente resistentes à penicilina.

Mostraram-se também resistentes, crescendo bem no meio com penicilina, 6 culturas de *Streptococcus lactis*. Por outro lado, as 13 culturas do grupo "viridans" examinadas, incluindo as espécies *Streptococcus bovis*, *Str. equinus* e *Str. salivarius*, tôdas foram igualmente inibidas pela penicilina.

Depreende-se dessas pesquisas que a verificação de sensibilidade ou insensibilidade à penicilina é de grande importância na classificação dos estreptococos.

PURIFICAÇÃO DA POLPA VACÍNICA

Como é sabido, uma das maiores dificuldades na preparação da polpa variólica é eliminar a grande quantidade de bactérias de contaminação, constituída, principalmente, por cocos Gram-positivos. Tôdas as tentativas de eliminar, por completo, tais bacterias, sem alterar a atividade do vírus variólico, foram infrutíferas. O processo que tem sido mais usado é a conservação da polpa vacínica durante longo tempo (6 meses ou mais) a — 10°C.

Recentemente, MIRANDA²⁰⁰ sugeriu a associação penicilina — glicerina como processo corrente de purificação da vacina variólica. Observou que a penicilina adicionada a polpa vacínica faz desapa-

recer os cocos que a contaminam, enquanto a glicerina tem ação, sobretudo, contra as formas bacilares. Deixou em contacto, durante 30 dias em câmara frigorífica, mistura de uma parte de polpa com outra de 2/3 de glicerina e 1/3 de penicilina (solução contendo 25 Unidades Oxford por cm³). Fazendo provas em coelhos, verificou que a polpa assim tratada conservou, integralmente, o poder vacinante.

RIVAROLA ²⁴³ adicionou à polpa vacínica glicerinada, penicilina bruta e verificou grande redução do número de bactérias de contaminação, após 6 a 15 dias de contacto. Em seu trabalho, publicado logo após o de MIRANDA ²⁰⁰, sugeriu, também o emprêgo da penicilina para a purificação da polpa vacínica por ter verificado que é processo rápido, eficiente e que conserva as propriedades do vírus variólico.

IX

ESTUDO FARMACOLÓGICO DA PENICILINA

PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

FLOREY ⁹⁴ estudou as propriedades farmacológicas da penicilina e classificou, como mais importantes, as seguintes:

- 1) ausência de toxicidade para camundongos e outros animais;
- 2) os leucócitos e culturas de tecidos não são afetados por concentrações de penicilina algumas centenas de vezes maiores do que a necessária para impedir o crescimento bacteriano;
- 3) a atividade da penicilina não é afetada pelo pus, sangue ou produtos da autólise de tecidos mortos;
- 4) sua atividade é pouco influenciada pelo número de bactérias presentes;
- 5) é absorvida após injeção nos músculos ou sob a pele e pelo intestino delgado;
- 6) não pode ser dada pelo estômago, devido à presença do ácido; nem pela bexiga, pela presença de bactérias que a destróem;
- 7) é mui rapidamente excretada pela urina, por isso devem ser administradas doses grandes e freqüentes; é também excretada pela bile.

FLOREY ⁹⁴ chama a atenção para os pontos 3 e 4 que mostram nítido contraste com as sulfonamidas.

É muito importante que a penicilina tenha pequeno efeito sobre os leucócitos, pois, deixa livre a atividade fagocitária, que aumenta a capacidade do organismo no combate à infecção.

TOXICIDADE DA PENICILINA BRUTA

Os primeiros estudos sobre a toxicidade da penicilina foram feitos por FLEMING ⁸⁸ em preparações brutas, não purificadas.

Observou que a toxicidade, para animais, de filtrados de caldo de cultura de *P. notatum*, fortemente antibacterianos, parece ser

muito baixa. 20 cm³, injetados por via endovenosa em coelho não foram mais tóxicos do que igual quantidade de caldo.

Meio cm³ injetado por via intraperitoneal em camundongo pesando cerca de 20 grs. não provocou sintômas tóxicos.

A irrigação constante de grandes superfícies infectadas, no homem, não determinou nenhum sintoma tóxico e a irrigação da conjuntiva humana, de hora em hora, durante um dia, não produziu efeito irritante.

Verificou, também, que a penicilina bruta, que inibe completamente o crescimento de estafilococos em diluição a 1:600, não interfere com a função leucocitária de maneira mais intensa do que o caldo comum.

ROBINSON²⁴⁷ estudou a toxicidade e a eficiência da penicilina, em camundongos. Verificou que a penicilina bruta é tóxica quando administrada pela veia em dose de 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 cm³ por quilo de animal.

Os pesquisadores de Oxford³ estudaram a ação tóxica da penicilina e verificaram que as preparações brutas contêm impurezas, inclusive uma substância pirogênica que podia ser removida por tratamento adequado.

TOXICIDADE DA PENICILINA PURIFICADA

ABRAHAM e colaboradores³, usando preparações parcialmente purificadas, verificaram que a dose tóxica para camundongos era de 50.000 Unidades Florey por quilo. FLOREY e JENNINGS⁹⁷, empregando preparação mais pura de penicilina, observaram que não era tóxica quando administrada na veia de camundongos na dose de 375.000 Unidades Florey por quilo.

ROBINSON²⁴⁷, usando penicilina purificada, verificou ser incomparavelmente menos tóxica do que a bruta, injetando na veia de camundongos 600.000 Unidades Florey, por quilo de pêso do animal, sem observar efeitos letais.

Por via subcutânea, 3,2 gramas por quilo já eram letais; porém, administrando metade desta dose (1,6 gramas) diariamente, durante 5 dias, não observou fenômenos tóxicos. ROBINSON relatou que a dose tóxica de penicilina bruta é 64 vezes maior que a dose ativa determinada por injeção subcutânea, em camundongos. Como vemos, êsses estudos experimentais indicam que a penicilina purificada não produz fenômenos tóxicos, mesmo em doses elevadas. As

divergências de resultados entre os pesquisadores depende dos sais de penicilina usados e do grau de pureza dos mesmos.

Estudo comparativo rigoroso só é possível usando-se os sais de penicilina e com grau de pureza determinado pelo número de Unidades Oxford por miligrama. É sabido que, quanto mais pura fôr uma preparação de penicilina, tanto mais ativa e menos tóxica será.

HAMRE e colaboradores¹²⁵ pesquisaram a toxicidade, em animais de laboratório, da penicilina preparada para uso clínico. Verificaram que a dose letal intravenosa para o camundongo branco era de cerca de 90.000 unidades (1 gr.) por quilo de peso corporal, usando uma preparação contendo 90 unidades por miligrama. Empregando, porém, preparação mais purificada, contendo 500 unidades por miligrama, observaram que 250.000 unidades (0,5 gr.) por quilo determinavam apenas ligeira reação.

Os resultados de HAMRE e colaboradores¹²⁵ confirmam que a purificação remove as substâncias responsáveis pela ação tóxica das preparações impuras ou brutas.

Referem que, em geral, cerca de 100.000 unidades (1 gr.) da preparação impura por quilo de peso corporal eram tóxicas para camundongos, coelhos e cobaias, injetados por via endovenosa. A administração subcutânea em animais, de 7.000 a 12.000 unidades por quilo, durante vários dias ou semanas, determinou reações acentuadas no local da injeção. Estas reações consistiam em edema dos tecidos subcutâneos, infiltração de monócitos e leucócitos polimorfo-nucleares e destruição do tecido muscular, tanto de camundongos como de coelhos ou de cobaias. Em alguns animais apareceram também fenômenos hemorrágicos. Devemos notar, entretanto, que as doses usadas nestas experiências são, proporcionalmente ao peso, muito maiores do que as usadas, com sucesso, em casos clínicos. Empregando, em proporção ao peso, as mesmas doses usadas em casos humanos, HAMRE e colaboradores¹²⁵ não verificaram efeitos tóxicos ou morte dos cobaias injetados.

KEEFER e colaboradores¹⁵⁴, após estudo de 500 casos de infecções tratadas com penicilina, referindo-se à toxicidade dessa substância disseram: "One of the remarkable features of penicillin is its relatively low toxicity and the extremely low incidence of reactions of a systemic nature. This is all the more remarkable in view of the fact that the material that is available for clinical testing at present is perhaps not more than 10-15 per cent pure penicillin".

As manifestações tóxicas encontradas entre os 500 pacientes tratados foram: 5 de febre, 12 de calafrios e febre, 14 de urticária e 19 de tromboflebite no local da injeção. Em alguns casos apareceram ataques de soluço, dores de cabeça, rubor na face, picadas nos testículos e dores nos músculos. Estes sintomas, entretanto, duraram somente alguns minutos e desapareceram espontaneamente. As partidas de penicilina de maior pureza não determinaram tais reações tóxicas.

Praticamente todos os pesquisadores são de opinião que os sintomas tóxicos encontrados são atribuíveis ao pirogênio ou outras impurezas uma vez que, com as preparações de penicilina ultimamente purificadas, a maior parte dos sintomas se tornou menos freqüente ou desapareceu completamente.

DAWSON e HOBBY⁷¹, após estudo clínico de 100 casos, concluíram que a penicilina é completamente destituída de efeitos tóxicos em concentrações muito além das necessárias para fins terapêuticos. Verificaram, também, que a administração prolongada não determina aparecimento de qualquer intolerância ou sensibilidade.

HERRELL¹³⁷, em seus casos clínicos, não observou efeitos tóxicos pelo uso da penicilina e opinou que a trombose das veias, a febre e a irritação local são determinadas por impurezas da preparação de penicilina e pela existência de pirogênio na água.

Ao contrário do que tem acontecido com o uso das sulfonamidas ou arsfenamida, a administração da penicilina parece não afetar os rins, fígado, medula óssea ou cérebro, não observou reações cutâneas, excepto 1 caso em que houve urticária.

PRIEST²²³ administrou 500.000 unidades de penicilina pura em 100 cm³ de água, em 30 minutos, por via endovenosa, e 40.000 unidades em 5 cm³ de solução salina, por via intratecal, sem reação visível.

Do mesmo modo, a administração de 1.000.000 de unidades de um sal de cálcio, por via endovenosa, em período de 7 dias, não determinou reações tóxicas. Concluiu que a penicilina pura é inócua mesmo em grandes doses terapêuticas.

GARROD¹¹³, tendo estudado as propriedades da penicilina e sua atividade terapêutica, chegou à conclusão de que: "a penicilina combina seu enorme poder antisséptico com um tal grau de ausência de toxicidade para mamíferos que, mil vezes a concentração necessária para ação terapêutica pode ser introduzida no sangue, sem efeito maléfico".

Diante dessas observações podemos considerar a penicilina pura como destituída de efeitos tóxicos. Observe-se, porém, que os efeitos tóxicos de certas preparações de penicilina são devidos, principalmente, se não totalmente, à presença de impurezas e pirogênio. Os sinais de intolerância, antes observados, praticamente desapareceram com o emprêgo atual da penicilina purificada.

TOXICIDADE DOS SAIS DA PENICILINA

HOBBY, MEYER e CHAFFEE¹⁴⁸ verificaram que o sal de sódio da penicilina injetado na veia de camundongos era muito menos tóxico que o de amônio. Êste, entretanto, não produzia fenômenos tóxicos quando aplicado diretamente no olho humano ou nas culturas de tecidos.

CHAIN⁴⁵ acha que o sal de bário é inócuo e satisfatório para administração terapêutica. Por diversas vêzes experimentamos, para uso local, um sal de bário por nós preparado e não foram observados efeitos irritantes, mesmo quando aplicado na conjuntiva humana. Achamos, entretanto, que o sal de bário da penicilina, embora mais estável que o de sódio, não deve ser usado em terapêutica por via parenteral. Os conhecidos efeitos excitantes e nefastos do bário sôbre as fibras dos músculos lisos e estriados, especialmente sôbre as fibras musculares do coração, são suficientes para proscreverem o uso do sal de bário em administração parenteral.

FLOREY e JENNINGS⁹⁷ haviam observado que o sal de cálcio da penicilina era tóxico para camundongos, quando injetado por via endovenosa ou subcutânea. FLOREY e FLOREY⁹⁵, porém, preferiram o sal de cálcio ao de sódio para a aplicação local em virtude da grande higroscopicidade dêste último.

Posteriormente, HERRELL e NICHOLS¹³⁹ observaram que o sal de cálcio da penicilina podia ser usado, sem inconvenientes, em terapêutica. Verificaram que a dose mínima letal do sal de cálcio para camundongos era de 200.000 Unidades Oxford por quilo de pêso corporal, quando injetado na veia e 500.000 por quilo, quando administrado subcutâneamente.

GYORGY e ELMES¹²³ fizeram experiências em camundongos com sal de cálcio contendo 230 unidades por miligrama. Injetaram, por via intramuscular e intraperitonal, solução aquosa do sal de cálcio em doses, proporcionalmente, 50 vêzes maiores que a usada em casos humanos e não observaram fenômenos irritativos ou tóxicos.

Verificaram tolerância em casos humanos às doses de 160.000 e 400.000 unidades do sal de cálcio em solução aquosa, injetada gôta a gôta, na veia, durante período de 24 horas. Do mesmo modo, foram toleradas 6 a 8 injeções intramusculares de 5.000 a 20.000 unidades em volumes de 1 a 3 cm³ de água.

HERRELL¹³⁷ empregou, em casos humanos, um sal de cálcio, por via intramuscular, em doses de 11.000 unidades em 10 cm³ de solução isotônica de cloreto de sódio, cada 3 horas, e não verificou sinais de irritação dos tecidos.

WELCH e outros³⁰⁵ observaram que a toxidez aguda da penicilina varia, conforme os produtos comerciais. Concluiu, entretanto, que o sal de cálcio da penicilina é muito mais tóxico que o de sódio.

WELCH e colaboradores³⁰⁵ estudaram, comparativamente, a toxicidade relativa de 6 sais da penicilina. Um dêles, o de cálcio, foi obtido de um produto comercial; porém, os outros cinco: sódio, amônio, estrôncio, potássio e magnésio, foram obtidos de uma única partida de penicilina. Em experiências feitas, em camundongos de 20 gramas, verificaram que a ação tóxica dêesses sais é, primariamente, devida aos cations (metais) usados na preparação. Baseando-se no título em unidades por miligrama de cada sal e no teor do cation presente, chegaram às seguintes conclusões:

A toxicidade relativa, baseada em miligramas do cation na dose letal, do sal de penicilina, foi, em ordem crescente a seguinte: sódio, estrôncio, amônio, cálcio, potássio e magnésio. Nas mesmas condições, a toxicidade relativa dos acetatos dêestes sais foi em ordem crescente a seguinte: Na, Sr, NH₄, K, Ca e Mg.

Os autores, baseando-se em miliequivalentes do cation usado na preparação dêesses sais, verificaram que a sua relativa toxidade era, em ordem crescente, a seguinte: sódio, amônio, estrôncio, cálcio, magnésio e potássio.

PUTNAM e WELCH²²⁵ trataram 35 pacientes com gonorréia sulfonamido-resistente, empregando para cada 5 pacientes um dos sete sais de penicilina (sódio, lítio, amônio, estrôncio, cálcio, magnésio e potássio). Todos os doentes foram curados, com provas de cultura negativas nos 1.º, 3.º e 5.º dias após o tratamento.

Apenas uma preparação (sal de amônio) produziu dôr intensa por injeção intramuscular. Esta preparação, em contraste com os outros 6 sais estudados, produziu reação hemorrágica em coelhos injetados, intradêrmicamente, em concentração de 6.000 unidades ou mais.

As injeções na nádega produziam menos dôr comparada com as feitas no deltóide ou no triceps.

TOXICIDADE DOS ÉSTERES DA PENICILINA

MEYER, HOBBY e DAWSON¹⁹⁷ obtiveram os ésteres etil e n-butyl da penicilina e demonstraram, por provas em camundongos, que, embora ativos, eram duas a três vêzes mais tóxicos que a penicilina.

Por via subcutânea, a dose tóxica está muito acima da dose terapêutica. Por administração oral a dose terapêutica se aproxima muito da tóxica.

TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS E TECIDOS

Os pesquisadores de Oxford³ fizeram estudos minuciosos a respeito da ação tóxica da penicilina sobre as células. Empregando-a purificada, fizeram estudos comparativo entre ela e outras substâncias, sobre os leucócitos humanos "in vitro".

Na diluição a 1:100, a penicilina produziu morte dos leucócitos imediatamente; a 1:250, mais de 50% dêles sobreviveram por 24 horas (tempo máximo em que foram observados); diluída a 1:500, os leucócitos se apresentaram em condições idênticas às dos de contrôle.

Usando sulfanilamida a 1:500, os leucócitos apresentaram, 2 horas após, inibição dos movimentos, com apenas ligeira emissão de pseudópodos; a 1:100 os leucócitos permaneceram vivos, porém, menos ativos que os de contrôle. Resultados semelhantes obtiveram com a sulfacetamida sódica "Albucid" nas diluições a 1:500 e a 1:1.000; entretanto, a 1:100 os leucócitos morreram imediatamente.

A proflavina mostrou-se muito mais tóxica, pois, na concentração a 1:20.000 determinou morte dos glóbulos brancos do sangue imediatamente, e, após 2 horas, na diluição a 1:50.000.

Estas provas demonstram que a penicilina é menos tóxica do que as sulfonamidas para os leucócitos. Estas em diluição a 1:500, embora não impeçam completamente a ação dos leucócitos, não se comparam à penicilina quanto à atividade antimicrobiana.

FLOREY e JENNINGS⁹⁷ verificaram que os leucócitos humanos sobrevivem após contacto de 1 hora em solução de penicilina a 1%, contendo 240 unidades por miligrama.

ABRAHAM e colaboradores³ estudaram, também, a ação da penicilina sobre os fibroblastos em cultura de tecido. Verificaram que

a penicilina purificada diluída a 1:800 inibia totalmente o crescimento destas células; a 1:1.600 houve ainda ação tóxica mas, o crescimento diminuiu e cessou após 24 horas de incubação. Os fibroblastos submetidos à ação, durante 48 horas, da penicilina a 1:1.600 voltaram ao seu crescimento e atividades normais após 3 a 4 passagens em meio da cultura normal. Para se observar isto com a proflavina era preciso diluí-la a 1:250.000.

Os macrófagos do sangue de galinha sofreram redução nas mitoses em presença da penicilina diluída a 1:500; essas células apresentaram também alterações morfológicas que desapareciam ao retornar os macrófagos ao sêro fresco. Na diluição a 1:200 a penicilina inibia, completamente, o fenômeno da divisão direta dos macrófagos.

Fizeram, ainda, inoculações intracisternais de penicilina purificada, em coelhos e verificaram, após 6 dias, por autópsia, que as meninges desses animais permaneciam normais, não revelando sinais de inflamação ou de quaisquer lesões.

Os pesquisadores de Oxford³, baseados nesses estudos, concluíram que a penicilina purificada é inócua para os tecidos, podendo ser aplicada em uso local, mesmo em soluções muito concentradas.

CORNMAN⁶⁶, estudando a ação da penicilina bruta sôbre células normais e de tumores malignos, verificou efeito deletério sôbre células sarcomatosas, pelo antibiótico, em concentração 2 a 3 vezes menor do que a necessária para as células normais. As culturas de células sarcomatosas que sofreram alterações por ação da penicilina não mais produziram tumores após serem implantadas em ratos ou em camundongos. LEWIS¹⁶⁷, entretanto, usando penicilina purificada, não observou qualquer retardamento no crescimento de enxertos de sarcoma, em camundongos.

Na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, os Drs. ORLANDO AIDAR e CONSTANTINO MIGNONE⁸ estão estudando a ação da penicilina, aplicada localmente, sôbre as fibras nervosas periféricas. Operaram dois lotes de coelhos, um em condições assépticas e outro infectado por *Staphylococcus aureus*. Ambos foram divididos em 2 grupos: um tratado e outro não tratado pelo antibiótico. O estudo que já fizeram do material dos animais operados assépticamente (16 coelhos), revelou absoluta inocuidade da penicilina, em concentração de 250 Unidades Oxford por cm³, sôbre as fibras nervosas periféricas, quer normais, quer em regeneração.

HERRELL e HEILMAN¹³⁰ fizeram estudos comparativos do poder bactericida e da toxicidade da gramicidina, tirotricina e penicilina sobre as células dos gânglios linfáticos de mamíferos, em culturas de tecidos. Verificaram ser a tirocidina mais tóxica que a gramicidina sobre as referidas células, possuindo, também, maior poder bactericida. Nas mesmas condições a penicilina mostrou-se 10 vezes menos tóxica do que a gramicidina e revelou maior poder bactericida sobre o *Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

A penicilina e a gramicidina agem sobre as bactérias, tanto em meios simples como em meios com cultura de tecidos.

HERRELL e HEILMAN¹³⁸ verificaram que são comparáveis as atividades antibacterianas, sobre os cocos Gram-positivos, da penicilina e da gramicidina, nos meios em que há cultura de tecidos.

Não nos devemos esquecer, entretanto, de que a penicilina mostrou-se 10 vezes menos tóxica¹³⁸ e não possui propriedade hemolítica¹³⁰.

AÇÃO SOBRE OS APARELHOS CIRCULATÓRIO E RESPIRATÓRIO

CHAIN e colaboradores⁴⁸ fizeram experiências em gatos e verificaram que 40 miligramas de penicilina não exerciam qualquer influência sobre a respiração, pressão sanguínea ou batimentos cardíacos. Fazendo a perfusão do coração isolado do gato, em solução de Ringer-Locke, contendo 1:5.000 de penicilina, observaram progressiva lentidão dos movimentos, durante 15 minutos; a atividade do coração, em perfusão, voltou ao normal em solução pura de Ringer-Locke.

VIEIRA DA ROCHA²⁵¹, em sua brilhante tese de doutoramento, apresentou interessantíssimo estudo experimental electrocardiográfico das injeções endovenosas de penicilina em coelhos. Foram as seguintes as conclusões tiradas:

“1.º) no estudo electrocardiográfico a freqüência dos ciclos foi relativamente maior nos animais anestesiados que nos animais normais, exceto durante os acidentes de inibição respiratória, quando aparecia uma bradicardia sinusal;

2.º) após a administração de doses elevadas de penicilina, tanto nos anestesiados como nos não anestesiados, apareceu uma leve bradicardia que, aliás, não foi constante, sendo sempre transitória e sem maiores conseqüências;

3.º) nos animais em que havia um típico sofrimento do funcionamento cardíaco, após ou durante as síncope respiratórias, a administração de grandes doses de penicilina não agravou este estado;

4.º) os coelhos que receberam, durante vários dias, doses elevadas de penicilina, apresentaram electrocardiogramas comparáveis àqueles obtidos quando este tratamento ainda não fôra feito, nos coelhos submetidos ao éter, fôra dos acidentes respiratórios; as modificações electrocardiográficas não foram, portanto, irremissíveis e não dependeram da ação da penicilina;

5.º) pelas experiências que relatamos, acreditamos que, em corações com electrocardiogramas normais, e mesmo naqueles em que as lesões sejam mínimas, estamos autorizados a empregar doses elevadas de penicilina sem receio de que, por si só, possa esta substância determinar alterações do trabalho íntimo da fibra do miocárdio”.

ABSORÇÃO E ELIMINAÇÃO DA PENICILINA

A penicilina, que é muito solúvel em veículo aquoso, é facilmente absorvida pelo organismo e também rapidamente eliminada pela urina. Não é totalmente eliminada pela urina, seja qual fôr a via de administração. Embora ocorra perda de penicilina injetada, não se sabe, ainda, se ela sofre alguma transformação durante sua passagem pelo organismo. Os pesquisadores de Oxford recuperaram a penicilina, da urina, verificaram que possuía elevado título antibacteriano, e a injetaram novamente em pacientes, sem reação tóxica e com ação terapêutica. É interessante notar que a penicilina, sendo injetada sob a forma impura (contendo pirogênio), quando recuperada pela urina após passagem pelo organismo, apresenta-se livre desta impureza. Cerca de 58 a 60% da penicilina injetada no homem pode ser recuperada pela urina³.

ABRAHAM e colaboradores³, estudando comparativamente a absorção e a excreção da penicilina em coelhos, gatos e homens, verificaram que os coelhos se comportavam diferentemente. A administração endovenosa de 400 unidades de penicilina, em coelho, não demonstrou atividade no sangue, após 1/2 hora, enquanto que, em gato, com dose igual, o sangue mostrou-se ativo, pelo menos, durante 1 e 1/2 horas.

Após a administração por via duodenal, o sangue não se mostrou ativo e a urina muito pouco; no gato, porém, a atividade no sangue pôde ser demonstrada, havendo, também, eliminação considerável pela urina. Os pesquisadores de Oxford acham que o mecanismo de absorção e eliminação da penicilina, no homem, parece mais semelhante ao do gato.

Num paciente com blenorragia aguda, que tratamos com penicilina sódica, fizemos dosagens no sôro sanguíneo e na urina, para verificar o tempo de sua permanência na corrente sanguínea e de sua eliminação por via renal. Retiramos, cada vez, 8 cm³ de sangue, nos seguintes tempos: 1.^a colheita, 1/2 hora antes da administração endovenosa de 10.000 Unidades Oxford, a 2.^a, 3.^a e 4.^a colheitas de sangue foram feitas, respectivamente, 15 minutos, 1 hora e 2 horas após a injeção endovenosa. Usamos para estas dosagens o método das diluições seriadas (processo de Fleming). Os resultados foram os seguintes: o sôro do sangue colhido antes da administração da penicilina (contrôle prévio) comportou-se como o testemunha positivo, que continha só meio adicionado de germe (*Staphylococcus aureus* H). A dosagem no sôro do sangue colhido após 15 minutos revelou inibição total do estafilococo na diluição a 1:5; inibição parcial a 1:10, e, a 1:20 comportou-se como o testemunha.

Nas dosagens do material colhido após 1 e 2 horas não verificamos sinais de inibição, mesmo em diluição baixa, a 1:5.

O sal sódico da penicilina administrada foi diluído em solução fisiológica de cloreto de sódio de modo a conter 10.000 Unidades Oxford em volume de 2 cm³.

Fizemos o controle da atividade da penicilina imediatamente antes de injetar a solução. Previstos êsses cuidados técnicos pudemos concluir que, no caso estudado, a maior parte da penicilina desapareceu da corrente sanguínea com rapidez extraordinária. Considerando-se o volume total do sangue do paciente como sendo 5.000 cm³, injetando 10.000 unidades deveríamos, teoricamente, encontrar imediatamente após, 2 unidades por centímetro cúbico. A dosagem após 15 minutos (feita no sôro sanguíneo) revelou atividade apenas igual a 1/10 de unidade; isto significa que, após 15 minutos, apenas 1/20 da penicilina injetada permanece no sangue circulante.

Observamos a eliminação renal dosando a penicilina na urina, pelo mesmo processo. A urina (cêrca de 50 cm³) foi refrigerada e filtrada em vela, logo após a colheita. A dosagem feita imediata-

mente após a filtração revelou presença de 16 unidades por cm^3 . O paciente recebeu durante o tratamento 100.000 unidades, em doses de 10.000, sendo que as que se seguiram à primeira foram administradas por via intramuscular. Depois de 8 horas da última dose colhemos novamente cêrca de 100 cm^3 de urina e, dosando a atividade, verificamos que apresentava inibição total na diluição a 1:80, o que representava 1.6 Unidades Oxford por cm^3 .

RAMMELKAMP e KEEFER²³² fizeram estudos sôbre a absorção, distribuição e eliminação da penicilina no organismo. Verificaram que a inoculação intravenosa determina concentração inicial elevada no plasma, seguida de queda rápida, tendo encontrado traços de penicilina no sôro, 3 a 210 minutos após a administração. A penicilina é rapidamente absorvida quando administrada por via intramuscular e também rapidamente eliminada pela urina.

Por via subcutânea a absorção é mais lenta, acontecendo o mesmo com a eliminação renal.

Êsses autores²³² verificaram que a média de eliminação urinária é de 58% da dose administrada.

Por via intestinal a penicilina é rapidamente absorvida no duodeno, porém, pouco por via oral ou retal. A eliminação pela urina é muito pequena após a administração desta substância por via oral, duodenal ou retal.

RAMMELKAMP e KEEFER²³² não encontraram penicilina no líquido cefalorraquidiano, na saliva e nas lágrimas, após inoculação de pacientes por via endovenosa.

A penicilina injetada por via raquidiana é absorvida e posteriormente eliminada, quer em pessoas normais, quer em doentes com meningite²³⁴. Após a administração de 5.000 a 10.000 unidades de penicilina em indivíduos normais a absorção e a eliminação pela urina são lentas. A dose de 10.000 unidades determina aumento da pressão do liquor, com cefaléia; entretanto, a dose de 5.000 apenas provoca ligeiro mal estar. Pelo contrário, em indivíduos com meningite as doses de 3.000 a 10.000 unidades não provocam qualquer perturbação, sendo a absorção e a eliminação rápidas²³⁴.

RAMMELKAMP e HELM²³⁷ verificaram que, após administração de penicilina por via endovenosa, no homem, há eliminação dessa substância pela bile, às vezes em concentrações mais elevadas do que no sangue. Êste fato indica o uso da penicilina no tratamento de infecções das vias biliares por germes penicilino-sensíveis.

Êsses autores, em suas experiências, usaram a penicilina sódica diluída em solução fisiológica de modo a conter 1.000 unidades por cm^3 . Cada paciente recebeu 20.000 unidades por via endovenosa. Verificaram que a saliva, a bile e o suco entérico não inativam a penicilina. O suco gástrico, obtido de pessoas normais, lhe destrói a atividade. Aham que a ação inativante do suco gástrico é provavelmente devida ao ácido nêle presente.

ABSORÇÃO POR VIA ORAL

FREE e colaboradores¹⁰⁹ verificaram que a administração conjunta de bicarbonato de sódio podia diminuir a quantidade de penicilina destruída no tracto gastrintestinal. Administraram a três indivíduos, por via oral, 100.000 Unidades Oxford. A preparação usada foi solução de penicilina sódica contendo 500 unidades por miligrama. Verificaram que 8 a 33% da penicilina ingerida era eliminada pela urina. O máximo de excreção ocorreu durante a primeira hora após a administração e a penicilina não mais era encontrada na urina no fim de 6 horas.

Verificando por êsses resultados que a penicilina era parcialmente absorvida, fizeram novas provas, administrando, por via oral, 100.000 unidades com 10 gramas de bicarbonato de sódio. Num dos 3 casos estudados a quantidade de penicilina excretada era, aproximadamente, metade da eliminada após ingestão isolada, enquanto nos dois outros casos a excreção era apenas 20 a 25% maior do que quando a penicilina era tomada com bicarbonato de sódio. De duas maneiras os autores procuraram explicar a diminuição do coeficiente de excreção renal após administração da penicilina, por via oral, com bicarbonato de sódio. A primeira explicação era que podia haver suficiente diminuição de atividade da substância no estômago. Fala a favor desta hipótese o fato de que o máximo de eliminação renal da penicilina tomada isoladamente se dava em 1 hora, ao passo que, administrada com bicarbonato, o máximo da eliminação se dava entre 1 e 2 horas.

A segunda possibilidade aventada foi que o bicarbonato de sódio, alcalinizando a urina, destruía a penicilina durante a retenção da mesma na bexiga.

CHARNEY, ALBURN e BERNHARDT⁵¹ fizeram numerosas experiências sôbre a eliminação, pela urina, da penicilina administrada por via oral.

Verificaram que a excreção urinária dessa substância administrada com 1,4 a 7,0 gr. de citrato trissódico (2 horas após o almoço) é, aproximadamente, 100% maior do que quando ingerida somente com água, nas mesmas condições.

Com o uso de 2 a 10 grs. de fosfato bissódico ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) observaram resultados comparáveis aos obtidos com o referido citrato.

Este aumento de eliminação urinária da penicilina parece ser devido à neutralização da acidez gástrica que permite absorção maior quando a substância é administrada pela boca.

Confirmando as observações de ROMANSKY e RITTMAN²⁵⁴, LIBBY¹⁶⁸ verificou que a penicilina sob a forma de sal de sódio cálcio, magnésio e amônio mantém-se estável, à temperatura ambiente, durante período de dois a três meses, sem perda aparente de atividade.

LIBBY¹⁶⁸ usou, em experiências de administração por via oral, suspensões, em óleo de caroço de algodão, dos sais de sódio e cálcio de penicilina dosando 150 a 300 unidades por miligrama.

Estas suspensões foram distribuídas em cápsulas de gelatina, de modo a conterem 10.000, 25.000 ou 50.000 Unidades Oxford por cápsula. Um homem de 86 quilos ao qual se administrou, por via oral, dose única de 90.000 unidades de penicilina sódica suspensa em óleo de caroço de algodão, apresentou na urina, 25 minutos após, 0,4 Unidade Oxford de penicilina por cm^3 . Isto revela a possibilidade de rápida passagem da penicilina em óleo através do estômago e absorção pelo intestino. Neste mesmo caso, a concentração terapêutica de penicilina no sangue (0,3 a 0,06 Unidade Oxford) foi mantida, pelo menos, durante 4 horas¹⁶⁸.

MC DERMOTT e colaboradores¹⁸⁴ observaram, em casos clínicos, ser possível manter a mesma concentração de penicilina no soro sanguíneo obtida com as habituais injeções intramusculares administrando, por via oral, quantidade aproximadamente cinco vezes maior. As pesquisas desses autores apresentam grande valor prático, pois com a possibilidade da penicilinoterapia por via bucal evita-se dor local pela aplicação de numerosas injeções intramusculares e também se dispensa presença de uma pessoa, durante dias e noites, para fazer as inoculações com intervalos de poucas horas. Além disso, segundo LIBBY¹⁶⁸, para a administração oral não são necessárias preparações altamente purificadas, o que simplifica os processos de produção industrial da penicilina.

ABSORÇÃO PELAS CAVIDADES DO ORGANISMO

A penicilina é mui lentamente absorvida pelas bolsas e cavidades articulares e pelas cavidades pleurais; por isso a ação local é prolongada nessas áreas.

RAMMELKAMP e KEEFER²³⁴ injetaram 10.000 unidades de penicilina na articulação do joelho direito de um paciente e verificaram sua presença no sangue, 25 minutos após a injeção. Em 70 minutos a penicilina atingiu o teor máximo de 0.019 unidade por cm³ de sôro sanguíneo. A eliminação pela urina foi lenta e de modo semelhante a excreção, após administração subcutânea.

O líquido aspirado da articulação, 13 horas após a injeção, continha, ainda, 0.039 unidade por cm³. Sômente 21% da quantidade injetada pôde ser recuperada da urina.

Com injeção de 10.000 unidades na bolsa suprapatellar, cujo líquido fôra prèviamente aspirado, a presença de penicilina no sangue só foi verificada 1 hora e 55 minutos após a injeção. Houve retardamento da eliminação renal, porém 43% da substância ativa foi recuperada da urina²³⁴.

A absorção pela cavidade pleural também é lenta. Num paciente com empiema, após a punção injetou-se na cavidade 10.000 unidades de penicilina sódica. 15 minutos após encontrou-se traços de penicilina no sangue e as dosagens no plasma durante as 7 horas seguintes revelaram desde traços a 0,007 unidade por cm³. O exsudato aspirado, por punção, da cavidade, 22 horas após a injeção, continha 0.78 unidade de penicilina por cm³²³⁴.

MÉTODOS DE PROLONGAR A AÇÃO DA PENICILINA

Em virtude da facilidade e rapidez com que a penicilina, administrada em soluto aquoso, é eliminada do organismo, torna-se necessário o uso de doses elevadas e freqüentes para se conseguir manter, por inoculação, concentração ativa desta substância.

A aplicação repetida de injeções com curto intervalo de tempo, durante o dia e a noite, constitui dificuldade, sem dúvida, no tratamento. Para eliminá-la foram estudados diversos meios de prolongar a ação da penicilina no organismo.

Por dois mecanismos tentou-se manter durante maior tempo concentração terapêutica no organismo:

1.º) retardamento da eliminação renal;

2.º) retardamento da absorção.

Retardamento da eliminação: RAMMELKAMP e KEEFER²³² investigaram métodos de prolongar a ação de determinada dose de penicilina, retardando sua eliminação. Entre suas pesquisas incluiu-se um estudo da influência da função renal sobre a excreção da penicilina. Injetaram 10.000 unidades de penicilina sódica em 3 indivíduos, um normal e dois pacientes com insuficiência renal. No sangue do normal, após 110 minutos não havia mais nem traços de penicilina; porém, nos dois pacientes com perturbação da função renal, a concentração no sangue manteve-se elevada, por período maior de tempo.

No indivíduo normal, 57% da dose injetada foi recuperada da urina na primeira hora. Num dos casos de função renal prejudicada, 14% da penicilina foram recuperados da urina em 6 horas; no outro caso, somente 12% foram eliminados em 13 horas.

Emprêgo do diodrast — Diante das referidas observações, RAMMELKAMP e BRADLEY²³⁶ procuraram administrar com a penicilina, substâncias que tornavam menos ativa a função renal. Obtiveram resultados interessantes empregando o diodrast (3,5-diiodo — 4-piridina-N-dietanolamina acética), meio de contraste muito usado em urografia intravenosa. O diodrast não interfere sobre a atividade antibacteriana própria da penicilina, porém, prolonga seu tempo de ação, pelo acentuado retardamento da sua excreção.

Em experiências preliminares usaram sal sódico da penicilina, em concentração de 1.000 unidades por cm³ de solução a 0,85% de cloreto de sódio.

6 indivíduos receberam 5.000 unidades por injeção na veia, gôta a gôta, na base de 9.600 por hora. 24 horas após foi repetida a mesma dose; desta vez, entretanto, os indivíduos receberam, 30 minutos antes, simultânea ou imediatamente após, uma única dose de 30 cm³ de diodrast. A penicilina normalmente desapareceria do sangue em 40 minutos, mas, com o diodrast levou 75 minutos. A diferença na eliminação urinária foi, sem dúvida, mais acentuada. Enquanto 57,2% da penicilina injetada isoladamente foram eliminados pela urina durante as primeiras 4 horas, apenas 32% da administrada com diodrast foram excretados em 24 horas. A redução da quantidade de penicilina excretada pela urina, após a administração do diodrast, não depende só da diminuição da função

excretora do rim, mas, em maior parte, da destruição ou inativação da penicilina no organismo, cujo mecanismo ainda não é conhecido.

Emprêgo do ácido p-aminohipúrico — BEYER e colaboradores²³ usaram o ácido p-aminohipúrico e conseguiram reduzir o teor da excreção renal da penicilina a cerca de dois terços. Como consequência desta reduzida excreção, o título da penicilina, na corrente sanguínea, manteve-se em concentração terapêutica durante, aproximadamente, 6 horas; portanto, bem mais do que as 2 horas do período terapêutico, ativo conforme contróle em pacientes sem “bloqueio” renal. Tanto o diodrast como o ácido p-aminohipúrico, administrados simultâneamente com a penicilina, reduzem a eliminação renal dela a cerca de dois terços.

RETARDAMENTO NA ABSORÇÃO

Pelo uso de veículo oleoso — ROMANSKY e RITTMAN²⁵⁴ conseguiram prolongar o efeito terapêutico de determinada dose de penicilina, injetando-a com veículo oleoso. A suspensão de penicilina em óleo inerte determina diminuição no coeficiente de absorção no local dos tecidos injetados. Experimentaram diversos óleos e cêras e verificaram que uma mistura de óleo vegetal “peanut” e de 1 a 6% de cêra de abelhas dava os melhores resultados. As injeções intramusculares de 50.000 Unidades Oxford, em 2 a 2,5 cm³ de mistura óleo-cêra, diminuíam tanto o grau de absorção no músculo, que mantinham na corrente sanguínea concentração terapêutica eficiente por período de 6 a 7 horas. A penicilina em suspensão na mistura referida manteve sua atividade, mesmo em temperatura ambiente, durante 30 a 62 dias, sem demonstrar sinais de alteração.

A mistura foi experimentada em 65 pacientes com uretrite gonocócica, 64 dos quais foram curados por uma única injeção intramuscular.

RAIZISS²²⁸ verificou que a suspensão de penicilina sódica em óleo vegetal, como o “peanut”, permanecia estável por mais de dois meses, conservando a mesma atividade bacteriostática. A maior estabilidade da penicilina suspensa em óleo em relação às soluções aquosas, e sua absorção mais gradual, constituem vantagem sob o ponto de vista terapêutico.

Por vasoconstrição local — TRUMPER e HUTTER²⁸⁸ descreveram um método de retardar a absorção da penicilina por prolongada vasoconstrição do músculo injetado. Realizaram-na por técnica de resfriamento atribuída ao “Bethesda Medical Center”.

Consiste em se aplicar na região deltóide uma bolsa de gêlo 2 horas antes da injeção intramuscular e recolocá-la, por período de 6 a 12 horas, após a injeção. Com esta técnica, uma simples injeção intramuscular de 50.000 Unidades Oxford de penicilina em solução salina mantém, na corrente sanguínea, concentração bacteriostática adequada, durante 6 a 12 horas.

Esta técnica de resfriamento foi aplicada a 18 pacientes com blenorragia, 17 dos quais foram curados por uma única injeção intramuscular. Como vemos, é porcentagem igual à obtida com a mistura óleo-cêra. O autor refere que a aplicação da bolsa de gêlo 2 horas antes torna a injeção indolor.

FIISK, FOORD e ALLES⁸⁷ usaram a adrenalina como vaso constritor para diminuir o coeficiente de absorção local da penicilina.

A penicilina diluída em solução de adrenalina não excedente a 1:16.000, não mostrou perda de atividade, comparada com as soluções aquosas de controle, após ser mantida por 24 horas a 37°C., 5°C. ou temperatura ambiente.

A ação da adrenalina foi verificada em 7 indivíduos injetados, por via intramuscular, com soluções de 50.000 unidades de penicilina sódica dissolvidas em 4 cm³ de solução de adrenalina a 1:50.000, e em 2 pacientes que receberam 20.000 unidades contidas em 2 cm³ de solução de adrenalina a 1:25.000. 6 indivíduos de controle foram injetados, pelo mesmo modo, com penicilina em solução salina. Nas dosagens do teor sanguíneo, feitas pelo processo de RAMMELKAMP, nos indivíduos injetados com 4 cm³ de adrenalina a 1:50.000 o título do sangue após 2½ horas, era de 0.039 unidade ou mais; êste título era encontrado, após 2 horas, nos casos injetados com 2 cm³ de adrenalina, e após 1½ nos casos de controle. Depois destas observações sugeriram o uso, em terapêutica de penicilina associada à pequenas quantidades de adrenalina, por via intramuscular.

Com o mesmo fim cremos poder ser usada a efedrina, que é vasoconstritora de ação mais duradoura que a adrenalina. Ainda não experimentamos a efedrina em casos humanos, porém já verificamos que a penicilina sódica, diluída em solução aquosa de cloridrato de efedrina a 1%, conservou sua atividade, comparada com controles sem efedrina, após ter sido mantida em geladeira por 7 dias. Achamos interessante experimentar a associação de pequenas quantidades de adrenalina e efedrina de modo a aliar a ação vasoconstritora imediata e efêmera da adrenalina e a lenta, porém mais duradoura, da efedrina.

ASSOCIAÇÃO DA PENICILINA COM OUTRAS SUBSTÂNCIAS

ASSOCIAÇÃO COM SULFONAMIDAS E COM ÁCIDO P-AMINOBENZÓICO

UNGAR²⁸⁸, pesquisando a ação bacteriostática da penicilina sobre o *B. subtilis*, verificou que no meio sintético de Leonard e Holme (J. Imm. 1935, 29:209) este germe era inibido pela diluição a 1:100 de uma solução de penicilina sódica contendo 1.200 unidades por cm³.

Verificou que adicionando a este meio o ácido p-aminobenzóico em diluições a 1:2.500 — 1:10.000, o poder inibidor da penicilina sobre o *B. subtilis* foi aumentado para 1:6.000. Portanto, o ácido p-aminobenzóico aumentou 60 vezes a atividade bacteriostática da penicilina. Usando uma raça de *Staphylococcus aureus* verificou que o ácido p-aminobenzóico agia de forma semelhante; porém, com uma raça de *Streptococcus hemolyticus* (grupo A) não houve aumento da atividade antibiótica.

A sulfapiridina revelou possuir ação (sinérgica) mais acentuada do que o ácido p-aminobenzóico sobre o poder bacteriostático da penicilina. Não só sobre o estafilococo, mas também sobre o estreptococo a sulfapiridina aumentou o poder bacteriostático da penicilina.

Uma solução de penicilina sódica, inibindo o crescimento do *St. aureus* em título a 1:20.000 passou a inibi-lo em diluição a 1:50.000 quando em presença de sulfapiridina (a 1:50:000). De modo semelhante, uma solução de penicilina sódica que inibia o estreptococo na diluição a 1:50.000, em presença de sulfapiridina (diluída a 1:50.000 passou a inibi-lo em diluição a 1:100.000.

A sulfapiridina, isoladamente, revelou inibir o mesmo germe até a diluição a 1:2.500.

As provas feitas em camundongos confirmaram os resultados obtidos "in vitro". UNGAR²⁸⁸ acha que a atividade aumentada de ambas as substâncias, quando aplicadas simultaneamente, pode ser devida à ação sinérgica das duas sobre os microrganismos ou, menos provavelmente, à uma reação química entre a sulfonamida e a penicilina.

HOBBY e DAWSON¹⁴² fizeram provas com *Staphylococcus aureus* e com *Streptococcus pyogenes*, porém, não observaram ação sinérgica verdadeira associando sulfadiazina ou sulfapiridina à penicilina. BIGGER²⁵, entretanto, usando as referidas bactérias, verificou que, em associação com a penicilina, o sulfatiazol é mais ativo do que a sulfanilamida ou a sulfapiridina.

São estudos importantíssimos sob o ponto de vista terapêutico, nos casos de infecções mistas, em que entram em jôgo germes sensíveis à penicilina e outros insensíveis mas que podem ser inibidos por uma sulfonamida. Por êste motivo, pode-se esperar êxito terapêutico, em tais infecções mistas, administrando-se, associadamente, ambos os agentes antimicrobianos, uma vez que, segundo HERRELL¹⁴⁰, não há contra-indicação do uso simultâneo de penicilina e qualquer das sulfonamidas.

ASSOCIAÇÃO COM ALBUMINA

CHOW e MAC KEE⁵³ demonstraram por provas de diálise que a penicilina se combina bem com o sôro humano. O complexo penicilina-albumina conserva a atividade antibiótica, ao contrário do complexo sulfonamida-albumina que, segundo DAVIS e outros, é isento de propriedades bacteriostáticas. Fizeram estudos sôbre a excreção em camundongos e verificaram que o complexo penicilina-albumina era excretado mais lentamente do que o sal sódico da penicilina. Isolaram o complexo penicilina-albumina por precipitação em solução aquosa de álcool a 50%, a 5°C.. A penicilina isolada é solúvel nessa concentração de álcool. O complexo proteína-penicilina, precipitado, era redissolvido em água e precipitado com 50% de álcool, sem perda apreciável da atividade da penicilina. Para se obter pó sêco do novo composto, o precipitado do álcool era dissolvido em água e a solução liofilisada.

ASSOCIAÇÃO COM EFEDRINA E ANESTÉSICOS

Interessando-nos pelo emprêgo local das soluções de penicilina no tratamento das rinofaringites e sinusites, procuramos investigar a possibilidade de associação desta substância ao cloridrato de efedrina, de ação vasoconstritora, e à etocaína, de ação analgésica. Fizemos, ao mesmo tempo, provas para verificar a influência do ácido p-aminobenzóico nessas associações.

As provas foram feitas "in vitro"; usamos caldo comum como meio de cultura contendo 1.6 Unidades Oxford de sal sódico por cm³ e a raça *Staphylococcus aureus* H como bactéria de prova de inibição.

A solução de penicilina em caldo inibia totalmente o crescimento do estafilococo na diluição a 1:80. Tôdas as soluções foram feitas diretamente no caldo de pH 7.0; usamos sempre caldo da mesma partida. As referidas substâncias foram diluídas isoladamente e em associação segundo as porcentagens apresentadas no quadro IV.

QUADRO IV

Solução	Concentração das substâncias diluídas em caldo contendo 1,6 Unidades Oxford de penicilina sódica	ATIVIDADE INIBIDORA SOBRE O <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS H</i>					
		Logo após o preparo das soluções		7 dias após permanência em geladeira		25 dias após conservação em geladeira	
		Total	Parcial	Total	Parcial	Total	Parcial
1	Etocaína	1 80	1/100	1/40	1/80	1'40	1 80
2	Cloridrato de efedrina a 1:1000 ..	1 80	1 100	1/40	1/80	1/40	1 80
3	Ácido p-aminobenzóico (Merck) a 1:1000	1 80	1/100	1/20	1/40	0	1 10
4	Etocaína a 1:1000 e efedrina a 1:100	1 80	1 100	1/40	1 80	1/40	1 80
5	Efedrina a 1:100 e ácido p-aminobenzóico a 1:1000	1 80	1 100	1/40	1 80	1/40	1/80
6	Etocaína a 1:1000 e ácido p-aminobenzóico a 1:1000	1/80	1/100	1/40	1/80	1/40	1/80
7	Caldo comum (contrôle) com penicilina	1/80	1/100	1/40	1/80	1/40	1/80

Esterilizamos as soluções por filtração em vela. Fizemos 3 dosagens de sua atividade inibidora sobre o *Staphylococcus aureus H*. A 1.^a, no dia em que preparamos as soluções, logo após a filtração em vela; a 2.^a, após 7 dias de permanência em geladeira e, a 3.^a, após 25 dias em geladeira.

Os estudos preliminares dessas associações medicamentosas permitiram deduzir que, pelo menos “in vitro” e, provavelmente “in vivo”, a etocaína a 1:1000 e o cloridrato de efedrina a 1:100, isolados ou associados, não inibem nem reforçam a ação bacteriostática da penicilina sobre o *Staphylococcus aureus*.

Ambas substâncias em presença do ácido p-aminobenzóico a 1:1000 não influíram, comparativamente, sobre a atividade da penicilina. O ácido p-aminobenzóico a 1:1000, usado isoladamente, mostrou reduzir à metade a atividade da penicilina, após 7 dias de conservação em geladeira; após 25, a solução havia praticamente perdido a atividade bacteriostática sobre o *Staphylococcus aureus H*.

A discordância entre nossos resultados e os de UNGAR²⁸⁸ cremos ser devida à grande diferença de concentração do ácido p-aminobenzóico. Usamo-lo diluído a 1:1000, enquanto UNGAR o diluiu

a 1:50.000. É bem sabido que uma mesma droga pode agir de maneira oposta, dependendo das condições e, principalmente, da concentração em que é usada.

Recentemente CAMERON³⁸ fez estudos da influência das drogas mais comumente usadas em clínica oftalmológica sobre a atividade da penicilina. Incubou a 37°C., durante 1 hora, mistura, em partes iguais, de solução de adrenalina a 1:1000 e solução de penicilina com 10 Unidades Oxford por cm³.

Verificou que com solução de adrenalina preparada vários anos antes, a atividade da mistura que deveria ser de 5 unidades por cm³ ficou reduzida a 0.5 unidade por cm³; usando, porém, amostra recente de adrenalina, a penicilina foi completamente inativada. Manteve, também, a 37°C, durante 3 horas, misturas em partes iguais, de solução de penicilina (2 unidades por cm.³) e soluções de atropina, eserina, cloridrato de cocaína, decicaina (choridrato de ametocaína), argirol e fluoresceína. Estas substâncias usadas em concentração dupla da empregada em clínica não revelaram efeito inibidor sobre a penicilina. As dosagens foram feitas pelo método do cilindro em placa, sendo usado o *Staphylococcus aureus H* como germe de prova. As referidas substâncias, isoladamente, não mostraram ação inibidora sobre o *Staphylococcus aureus H* exceto a de argirol misturada com água, em partes iguais, a qual revelou zona de inibição no ágar quase igual à da mistura de argirol e penicilina³⁸.

É nosso intuito fazer provas de associação com outras substâncias vasoconstritoras como a privina e com analgésicos, como a neotutocaína, a fim de verificarmos a possibilidade de êxito na aplicação local da penicilina, no tratamento das nasofaringites e das sinusites.

RESISTÊNCIA DAS BACTÉRIAS A PENICILINA

No capítulo das propriedades físico-químicas da penicilina estudamos as seguintes substâncias inativantes: ions metálicos, álcoois primários, bases, agentes oxidantes, reagentes das cetonas. Incluímos, também, o estudo da penicilinase, substância produzida por certas bactérias e que inibe a ação antibacteriana da penicilina.

Assim, analisaremos aqui apenas os fatores biológicos que impedem a atividade da penicilina, dependentes do desenvolvimento de resistência das bactérias à ação desta substância.

ABRAHAM e colaboradores³ foram os primeiros a observar a resistência, adquirida, à penicilina por uma raça de *Staphylococcus aureus*. Durante nove semanas cultivaram-na repicando-a, com intervalos de poucos dias, em caldo contendo doses crescentes de penicilina. Após 7 semanas de cultivo, a raça adaptada cresceu em diluição a 1:1.000, enquanto a raça original foi quase completamente inibida por 1:1.000.000.

Houve redução na velocidade de crescimento e atividades enzimáticas; porém, não houve evidência de que a adaptação do estafilococo à penicilina, seja devida à produção de enzima destruidora dessa substância porque não houve perda da atividade da penicilina.

FLOREY e FLOREY⁹⁵ verificaram que em dois casos reincidentes submetidos a tratamento, foi necessário dar 4 vezes mais penicilina no 15º e no 51º dias, após o início do primeiro tratamento, para inibir completamente os germes infectantes que eram, respectivamente, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus viridans*. A necessidade de aumentar a dosagem da penicilina fala a favor do desenvolvimento de resistência dos germes.

SCHNITZER, CAMAGNI e BUCK²⁶³, estudando a resistência dos estafilococos à penicilina, classificaram-na em 3 tipos: a) resistência natural; b) resistência adquirida por adaptação em concentrações crescentes de penicilina; c) resistência de pequenas colônias variantes.

Esta última ocorreu quando uma cultura normal de *Staphylococcus albus* ficou em contacto com a penicilina. As pequenas colônias variantes (formas G) do *Staphylococcus albus*, isolados de placas contendo penicilina, mostraram-se não só resistentes a esta substância como também ao violeta de metila, demonstrando não ser específica essa resistência.

RAMMELKAMP e MAXON²³³ verificaram que, das raças de estafilococos isoladas de 14 pacientes com infecções locais, somente 4 adquiriram aumento de resistência à penicilina durante a marcha do tratamento. Nestes 4 pacientes administraram a penicilina endovenosamente para tratar osteomielite crônica; localmente, em 2 casos de empiema e, também localmente, em 1 caso de abscesso axilar. Uma das cavidades com empiema tornou-se estéril por injeções freqüentes de penicilina, a despeito da alta resistência da raça do estafilococo. A osteomielite e o abscesso não foram esterilizados.

SCHMIDT e SESLER²⁶² observaram o desenvolvimento de resistência à penicilina em duas raças de pneumococo (tipos I e III) por

passagem em série através de 7 grupos de camundongos tratados com penicilina.

O pneumococo tipo III mostrou maior resistência que o I; sua resistência manteve-se após 30 passagens em série, em camundongos normais. Isto indicava que a resistência do germe à penicilina, uma vez adquirida, persiste por algum tempo. A resistência "in vivo" à penicilina era acompanhada de resistência "in vitro".

Êsses autores verificaram que o desenvolvimento de resistência à penicilina em camundongos não afetava a ação das sulfonamidas. Depreende-se disso a vantagem de se empregar, alternativamente, penicilina e sulfonamidas no tratamento de infecções por germes resistentes a uma dessas drogas.

Efeito sinérgico foi verificado por UNGAR²⁸⁷, associando êsses dois agentes quimioterápicos.

DUNHAM e colaboradores⁷⁵ verificaram que uma raça de *Treponema pallidum*, obtida de coelho por ela infectado e tratado insuficientemente com penicilina, era mais resistente à ação dessa substância do que a raça original. Lembram que, no tratamento da sífilis humana, se deve administrar quantidades elevadas de penicilina para se obter cura rápida.

X

APLICAÇÃO DA PENICILINA EM TERAPÊUTICA

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em 1941, um ano após os estudos experimentais dos pesquisadores de Oxford³, ficou demonstrado que a penicilina era extraordinariamente ativa "in vivo", contra determinados microrganismos. Desde então, numerosos trabalhos têm sido publicados sobre estudos que demonstram o efeito da penicilina em infecções humanas.

Entre nós, o estudo da aplicação terapêutica da penicilina não foi descuidado, pois, além dos trabalhos já citados queremos lembrar a valiosa revisão feita por LINHARES¹⁷² sobre a penicilina; o interessante estudo comparativo entre a penicilina e a sulfanilamida publicado por MINGOIA¹⁹⁹; o importante estudo químico e terapêutico da penicilina, de MILITINO ROSA²⁵⁵, além dos trabalhos de divulgação feitos por ALGODOAL⁹, LINS¹⁷³, LACAZ¹⁵⁰ e MONIZ DE ARA-GÃO¹¹.

As primeiras experiências clínicas foram feitas com preparação parcialmente purificada, contendo 40 a 50 Unidades Oxford por miligrama³.

A penicilina foi administrada, parenteralmente pelos pesquisadores de Oxford³ a 5 pacientes com infecções estafilocócicas e estreptocócicas; por via oral, a 1 criança com infecção estafilocócica rebelde das vias urinárias; localmente, a 4 pacientes com infecções oculares: às gôtas, em 3 e sob a forma de unguento, em 1 que apresentava erupção na face. Desses casos, 7 eram de infecções graves onde tinham sido experimentados, sem resultado, o tratamento sulfonamídico ou outras formas de quimioterapia e tratamentos cirúrgicos. Obtiveram respostas terapêuticas favoráveis em todos os 10 casos, apesar da falta de experiência no uso da penicilina. As doses foram pequenas e, provavelmente, inadequadas em alguns casos; além disso, somente repetidas durante 4 a 6 dias. Desses pacientes, dois morreram, sendo que, em 1 deles a penicilina somente foi aplicada já no fim do curso da infecção; no outro, a infecção havia

quase regredido, mas o doente já em convalescença veio a falecer em virtude da ruptura de um aneurisma micótico.

Em virtude talvez das dificuldades havidas na preparação da penicilina terapêutica, ela foi recuperada da urina de um dos pacientes e, injetada noutra não produziu qualquer reação.

Já referimos que a penicilina, embora administrada sob a forma impura, passando pelo organismo é eliminada pela urina, livre de impurezas.

Dois pacientes apresentaram calafrios e elevação temporária de temperatura, provavelmente devido às substâncias pirogênicas da penicilina semipurificada.

Em todos os casos houve queda de temperatura e melhora das condições gerais e locais pela administração da penicilina.

Referiram, ainda, os pesquisadores de Oxford que o estado psíquico e o apetite dos pacientes melhoraram durante o tratamento.

Em março de 1943, FLOREY e FLOREY⁹⁵ relataram, detalhadamente, suas experiências no tratamento, com penicilina, de 187 pacientes, tanto por aplicação local como por administração sistêmica, 15 tinham moléstia grave e os 172 restantes eram casos de infecção em que a penicilina foi aplicada localmente. Usaram preparação impura que não continha mais que 10% de penicilina. Consideram que o método mais prático de administração é a via intramuscular geralmente com cerca de 15.000 Unidades Oxford, dadas com intervalos de 3 horas.

A dosagem deve ser regulada de modo que, durante todo o tempo, o sangue contenha teor suficiente de penicilina para inibir o germe infectante, variando de caso para caso. As dosagens da concentração no sêro sanguíneo podem ser feitas 3 horas após a injeção para se determinar o poder bacteriostático do sangue que indica se é ou não necessário aumentar as doses. O tratamento é continuado até que, pelas provas culturais, o agente infeccioso não se desenvolva. Durante o tratamento não foram observados efeitos tóxicos em qualquer desses casos, ainda com dose total tão elevada como 4.670.000 Unidades Oxford durante período de 30 dias em 1 caso, administrada por via intramuscular, com intervalos de 3 horas.

A maior dose intramuscular foi de 25.000 Unidades Oxford em 4 cm³, cada 3 horas, durante uma semana. A maior dose endovenosa foi de 10.000 unidades, de hora em hora, durante 3 dias. Em alguns pacientes houve elevação da uréia no sangue, a qual dimi-

nuía com a descontinuidade da administração da droga, não parecendo indicar perturbação da função renal.

Durante o tratamento quase todos os pacientes mostraram melhora na contagem dos globulos sanguíneos e na taxa de hemoglobina. Com o desaparecimento da infecção melhoraram as condições gerais e o apetite. Havia policitemia durante a administração da penicilina, a qual cessava logo que o uso da substância era suspenso; não havia albuminúria.

Todos os 10 indivíduos com infecção estafilocócica foram curados. 8 tinham sido desenganados após a ineficácia de outros meios de tratamento. Houve indícios de que em dois se desenvolveu certa resistência à penicilina. Um tinha meningite estreptocócica resistente à sulfamidoterapia; curou-se com a penicilina. Em dois casos de actinomicose, os resultados não foram decisivos; em um de empiema por estreptothrix o germe foi aparentemente eliminado. Em 1 caso de endocardite bacteriana subaguda houve melhora durante o tratamento pela penicilina, porém, o paciente piorou logo que o tratamento foi interrompido; as lesões do coração não sofreram modificação e houve êxito letal. Em dois pacientes com osteomielite, apareceu rarefação óssea com os curativos durante o tratamento pela penicilina; a rarefação foi considerada como evidência de que o tecido ósseo estava sendo limpo, pois, a recalcificação procedeu-se gradativamente após a interrupção do uso da penicilina. Verificaram os autores que, pelo uso de doses adequadas, era eliminada a infecção e não se formavam novos abscessos.

Em maio de 1943, na América do Norte, RICHARDS²⁴², Presidente do "Committee on Medical Research", referiu-se à produção de penicilina nos Estados Unidos e pôs em evidência que as pesquisas que estavam sendo feitas confirmavam completamente os resultados obtidos pelos pesquisadores ingleses. São suas estas palavras: "Mais de 300 pacientes têm sido ou estão sendo tratados com penicilina. Há suficiente razão para se acreditar que ela é superior a qualquer das sulfonamidas no tratamento das infecções pelo *Staphylococcus aureus*, com ou sem bacteremia, incluindo a osteomielite aguda e crônica, celulite, antraz do lábio e face, pneumonia e empiema, ferimentos e queimaduras infectadas. É também extremamente ativa no tratamento das infecções por estreptococos hemolíticos, pneumococos e gonococos que são resistentes às sulfonamidas. Verificou-se que é ativa no tratamento da endocardite bacteriana subaguda. Os estudos dos resultados de sua aplicação local são ainda insuficientes".

RICHARDS²⁴² concluiu que a penicilina, convenientemente preparada, não produz reações tóxicas, mesmo com elevada dosagem e que, pela rápida eliminação da substância pela urina, é necessária a administração freqüente da penicilina quando por via endovenosa ou intramuscular.

Em agosto de 1943, KEEFER, BLAKE, MARSHALL, LOKWOOD e WOOD¹⁵⁴, membros do "Committee on Chemotherapeutic and Other Agents" do "National Research Council", dos Estados Unidos, publicaram um resumo dos resultados obtidos pelo uso da penicilina no tratamento de 500 pacientes com infecções diversas. Foram tratados por 22 grupos de pesquisadores da confiança do referido Comitê e os resultados foram classificados pelo presidente, Dr. Chester S. Keefer. Vejamos as importantes conclusões que resumem tôdas as informações essenciais sôbre o emprêgo da penicilina em terapêutica:

"A penicilina foi considerada o agente mais ativo no tratamento das infecções estafilocócicas, gonocócicas, pneumocócicas e por estreptococos hemolíticos. Não foi satisfatória no tratamento das endocardites bacterianas. Seu efeito é particularmente decisivo nas infecções gonocócicas sulfonamido-resistentes.

Embora a dosagem tabelada exija mais pesquisas, parece evidente que a média necessária para injeções endovenosas ou intramusculares, em infecções estafilocócicas graves, é de 500.000 a 1.000.000 Unidades Oxford, e os melhores resultados foram observados quando o tratamento foi prolongado, pelo menos, por dez dias a duas semanas. No mínimo, 10.000 unidades devem ser dadas cada duas ou três horas no início do tratamento, ou por injeção endovenosa contínua ou por periódicas injeções endovenosas ou intramusculares intermitentes.

Foram obtidos resultados satisfatórios em casos de gonorréia sulfonamido-resistentes pela administração de 100.000 a 160.000 unidades, durante período de 48 horas.

Os pacientes com pneumonia pneumocócica, freqüentemente se restabeleceram, após o uso de 100.000 unidades administradas durante 3 dias. Este fato é particularmente importante nas infecções pneumocócicas resistentes às sulfonamidas. Para se obter o máximo efeito pode ser necessário dar 60.000 a 90.000 Unidades Oxford diárias, durante 4 a 7 dias. No tratamento do empiema ou meningite é recomendável o uso local da penicilina, injetando-a diretamente na cavidade pleural ou no espaço subaracnóideo".

QUADRO V

RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA PENICILINA EM 500 PACIENTES

(KEEFER e Col.) 154

Diagnóstico	Número de casos	Cura ou Melhora	Morte	Ausência de efeito
Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> :				
Com bacteremia:				
Septicemia sem porta de entrada evidente	10	9	..	1
Osteomielite aguda	22	18	2	2
Pielonefrite	5	2	3	..
Infecções da pele e do tecido subcutâneo, incluindo antraz, furúnculos e celulites	10	10
Tromboflebite com ou sem embolia pulmonar	3	2	1	..
Queimaduras	5	2	3	..
Pneumonia	5	3	2	..
Artrite	1	1
Abscesso subaracnóideo	1	1
Meningite	2	1	1	..
Trombose do seio cavernoso	2	1	1	..
Infecção de ferida pós-operatória ..	3	1	2	..
Abscesso epidural	2	2
Celulite orbitária	1	1
Endocardite	9	..	9	..
Pansinusite	1	..	1	..
Aneurisma dissecante da aorta	1	..	1	..
Câncer do reto	1	..	1	..
Uremia a sulfadiazina	1	..	1	..
Anemia aplástica	2	..	2	..
Abscessos múltiplos	4	..	4	..
TOTAIS	91	54	34	3
Sem bacteremia:				
Osteomielite	55	48	..	7
Empiema	9	7	1	1
Septicemia puerperal	2	2
Infecções da pele e tecido subcutâneo	23	19	..	4
Laringo-traqueites	1	1
Abscessos cerebrais	3	1	2	..
Queimaduras	9	5	4	..
Mastites	5	5
Pneumonia	3	3
Abscessos pulmonares	3	2	1	..
Feridas infectadas	1	1
Parotidites	1	1
Abscessos epidurais	1	1
Infecções pós-operatórias	4	3	..	1
Abscessos, 1 caso de cada (nariz, parede abdominal, garganta, quadrante direito inferior do abdômen, retroperitônio, sub-mento, bochecha, couro cabeludo)	9	6	..	3
Artrite	1	1
Carcinoma reffculo-celular	1	..	1	..
Meningite	3	1	2	..
Prostatite	2	2
TOTAIS	137	109	11	16

RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA PENICILINA EM 500 PACIENTES

(KEEFER e Col.) 154

Diagnóstico	Número de casos	Cura ou Melhora	Morte	Ausência de efeito
Infecções estreptocócicas exceto endocardite bacteriana:				
Estreptococo hemolítico (23 casos):				
Septicemia pós-aborto	1	1
Bacteremia com meningite	1	1
Conjuntivite	1	1
Osteomielite da espinha	2	2
Mastoidite com bacteremia	1	1
Úlcera da pele	3	2	..	1
Úlceras cutâneas microaerófilas	1	1
Abscessos múltiplos da pele	1	1
Infecção da pele e abscesso subfrênico	1	..	1	..
Empiema	2	2
Mastoidite e pericardite	1	1
Abscesso da axila	1	1
Septicemia pós-amigdalite	2	..	2	..
Cirrose do fígado	1	..	1	..
Meningite	2	..	2	..
Nefrite crônica	1	..	1	..
Portador	1	1
Estreptococo não hemolítico (4 casos):				
Pielonefrite com endocardite	1	1
Abscesso cerebral	2	..	2	..
Abscessos múltiplos	1	..	1	..
Estreptococos anaeróbios (6 casos):				
Abortamento séptico	5	3	2	..
Fratura do crânio, meningite	1	1
TOTAIS	33	17	12	4
Infecções pneumocócicas:				
Pneumonia	42	35	6	1
Menigite	21	7	14	..
Meningite com endocardite	2	..	2	..
Endocardite	6	1	5	..
Pericardite	1	..	1	..
Pneumonia com empiema	2	..	1	1
Empiema	2	2
TOTAIS	76	45	29	2
Infecções gonocócicas	129	129*
Infecções meningocócicas	5	4	1	..
Endocardite bacteriana subaguda	17	3	4	10
Infecções várias:				
Pneumonia atípica	1	1
Monilíase	1	1
Agranulocitose	1	1
Septicemia por <i>Micrococcus tetragenus</i>	1	1
Colite ulcerativa	1	1
Actinomicose	3	1	2	..
Septicemia por <i>Micrococcus auranticus</i>	1	1
Abscessos <i>Escherichia coli</i> e estreptococo não hemolítico	1	1
Abscessos subcapsular, infecção mista	1	1
Abscesso pútrido	1	..	1	..
TOTAIS	12	5	3	4

(*) 4 destes casos mostraram apenas melhora temporária.

Até agora, o Comitê presidido pelo Dr. Chester S. Keefer reuniu dados sobre o tratamento da penicilina de mais de 3.000 casos, entretanto, os resultados não são significativamente diferentes dos referidos acima e apresentados com detalhes no quadro V.

Numerosos estudos têm sido feitos por pesquisadores de todos os Continentes. A grande maioria das observações clínicas de pacientes tratados com penicilina têm sido feitas nos Estados Unidos da América do Norte, onde a penicilina é produzida em maior escala. Entre os mais importantes grupos de pesquisadores distinguem-se os da "Columbia University", "Mayo Clinic", "Stanford University School of Medicine" e "Washington University".

Na Inglaterra, a "Oxford University" foi a pioneira nos estudos terapêuticos da penicilina. Nos outros países, que posteriormente começaram a produzir penicilina ou recebê-la por importação, principalmente dos Estados Unidos, também foram feitos estudos terapêuticos. Sendo vastíssima a atual literatura, preferimos apresentar apenas os resultados dos trabalhos consultados que julgamos mais interessantes e importantes tornando, deste modo, o presente capítulo mais conciso e de leitura menos exaustiva. Consideraremos primeiramente a terapêutica local e, a seguir, o emprêgo sistêmico da penicilina.

TERAPÊUTICA LOCAL PELA PENICILINA

A princípio, na terapêutica local, foi usada, exclusivamente, a penicilina bruta; entretanto, atualmente, com a produção em grande escala de preparações da penicilina purificada, estão sendo empregadas soluções dos seus sais.

EMPRÊGO LOCAL DA PENICILINA BRUTA

Após ter Fleming, em 1929, sugerido o uso da penicilina bruta para o tratamento local de feridas infectadas, numerosos pesquisadores empregaram-na, com fim terapêutico, em processos infecciosos locais.

PULVERTAFT²²⁴, usando em alguns casos o filtrado de cultura do *Penicilium notatum*, obteve bons resultados pela aplicação local.

FISCHER⁸⁶ fez estudos minuciosos com a penicilina bruta, que se mostrou de grande valor no tratamento local das infecções. Verificou que não era tóxica para animais, quando administrada por via oral ou parenteral. Estudando sua ação sobre os estafilococos verificou que 13% das culturas eram resistentes. As concentra-

ções elevadas de penicilina bruta são bactericidas e as soluções fracas são apenas bacterioinibidoras.

VOGEL²⁹³ preparou em casa a penicilina bruta e diz ter obtido bons resultados pela aplicação local em 29 casos de infecções piogênicas superficiais.

ROBINSON e WALLACE²⁴⁸ empregaram a penicilina bruta, localmente, por processo muito interessante. Consistia em deixar crescer o *Penicillium notatum* em camadas de gaze embebidas de meio especial de cultura e aplicadas sobre o local da infecção. Trataram com bons resultados 3 pacientes com osteomielite, 1 com furunculose e outro com abscessos superficiais.

Não achamos recomendável tal processo porque exige técnica rigorosa para se evitar as contaminações que podem inativar a penicilina formada (como por exemplo o bacilo coli e certas raças de *B. subtilis*). Outro inconveniente foi lembrado por RAPER e COGHILL²³⁹ que chamam a atenção para o fato da penicilina bruta conter proteínas do cogumelo para as quais certos indivíduos podem estar sensibilizados, tornando assim sua aplicação perigosa em grandes áreas lesadas.

EMPREGO LOCAL DA PENICILINA PURIFICADA

BODENHAM³¹ usou a penicilina purificada e a sulfanilamida no tratamento de úlceras cutâneas e queimaduras infectadas. Verificou que a penicilina age muito melhor nas infecções estreptocócicas e estafilocócicas, inclusive sobre os estreptococos sulfamidoresistentes. Usou soluções aquosas de penicilina contendo 100 a 500 Unidades Oxford e sob a forma de creme contendo 100 a 500 unidades por grama e verificou que este era meio eficaz e econômico para tratamento de queimaduras e úlceras superficiais. Aplicado cada 24 horas, removia os cocos Gram-positivos de extensa área infectada, no prazo de 4 a 6 dias.

Empregou ainda a penicilina sob a forma de pó, associada à sulfanilamida. Para cada grama de pó de sulfanilamida adicionava 1.000 Unidades Oxford de penicilina seca. Verificou ser o pó menos ativo do que o unguento, talvez por ser rapidamente dissolvido no líquido dos tecidos, o que facilitava sua fácil absorção. CLARK e colaboradores⁵⁵ usaram, também, a penicilina, sob a forma de creme, para o tratamento local de 54 casos de lesões por queimadura, infectadas por estreptococos hemolíticos e estafilococos. Em 41 casos (76%) os germes desapareceram das lesões, dentro de cinco dias.

GOLD¹¹⁷ obteve sucesso no tratamento local de ferimentos sépticos, com creme de penicilina. Num caso rebelde de impetigo da face, obteve cura, em 4 dias, aplicando-o localmente, 2 vezes por dia; continha, por grama, 500 Unidades Oxford de penicilina sódica. A base do creme era composta de partes iguais de lanolina, óleo de fígado de bacalhau e água.

SOPHIAN e CONNOLLY²⁷⁰ empregaram, com bons resultados, creme evanescente contendo, por grama, 1.000 Unidades Oxford de penicilina, no tratamento local de 5 pacientes com furunculose, 2 com sicose de barba, 2 com celulite crônica, além de outros. Verificaram que adição de 0,1% de "Aerosol M A" à base do creme, para facilitar a penetração, era preferível ao "Triton" ou "Duponol C". O poder de penetração da penicilina do creme medido pela inibição bacteriana foi observado em tubos de ágar em pé, semeados com *B. subtilis*.

PECK²¹³ tratou casos de antraz em indivíduos diabéticos e observou melhora muito lenta, pela administração de penicilina por via intramuscular. A melhora foi quase imediata, quando injetou, diretamente nos tecidos lesados, solução salina contendo 100 a 1.000 Unidades Oxford de penicilina por cm³.

FLOREY e FLOREY⁹⁵ empregaram a penicilina no tratamento local de 172 pacientes com infecções oculares, da mastoide e outras, obtendo bons resultados na maioria dos casos. Verificaram que, para uso local eram necessárias quantidades relativamente pequenas. Em virtude do sal de sódio ser muito higroscópico, preferiram empregar o sal de cálcio da penicilina em solução ou sob a forma de pó.

Empiemas — TILLET e colaboradores²⁷⁸ trataram 8 pacientes com empiema pneumocócico sulfonamido-resistentes por aplicação local de penicilina. Injetada por via intrapleural mostrou-se ativa, eliminando a infecção e evitando a necessidade de drenagem cirúrgica. A fim de se obter ótimos resultados, os autores recomendam puncionar o empiema, esvaziar a cavidade por aspiração e injetar algumas centenas de centímetros cúbicos de solução fisiológica de cloreto de sódio. Imediatamente após, fazer a injeção local de 30 a 50 cm³ de solução fisiológica contendo, no total, 30.000 a 40.000 Unidades Oxford. Esta injeção intrapleural é repetida cada 48 horas, pelo menos, três vezes.

A atividade antibacteriana da penicilina assim administrada mantém-se, pelo menos, 48 a 72 horas após a injeção. Estes resul-

tados sugerem ser desnecessário praticar a toracocentese com intervalo menor que 2 dias.

Oftalmias — FLOREY e FLOREY⁹⁵ trataram 89 pacientes com infecções oculares aplicando, localmente, a penicilina em água destilada ou em unguento de vaselina, na dose de 400 a 800 Unidades Oxford por cm³ ou grama. O unguento é preferível por garantir menor desperdício; porém, quando o paciente se queixa de sensação de aquecimento pelo unguento, deve-se fazer nova aplicação. O tratamento deve ser continuado até que as culturas se tornem negativas.

Um dos casos mais interessantes de FLOREY e FLOREY⁹⁵ foi o de um recém-nascido com oftalmia gonocócica que permaneceu resistente à terapêutica pela sulfapiridina e irrigações durante 3 semanas e meia. A infecção desapareceu em dois dias, com o uso de solução de penicilina em água destilada, em concentração de 1.200 unidades por cm³. A solução foi instilada de hora em hora. Após 12 horas o pus diminuiu consideravelmente, desaparecendo em 2 dias. O exame bacterioscópico, 8 dias após a interrupção do tratamento, não revelou presença de gonococos.

SALMANN²⁵⁹ fez estudos sobre o uso local da penicilina e verificou que a aplicação, nos seus próprios olhos, de solução a 0,25% não determinava efeitos irritantes. Observou, também, a ação terapêutica da penicilina em infecções experimentais da câmara anterior do olho de coelho, produzidas por pneumococo. Verificou que a introdução iontoforética de penicilina sódica, em solução a 0,1% — 0,25%, era mais eficiente nos casos graves do que a simples irrigação da córnea. No entanto, aplicações iontoforéticas repetidas determinavam, em alguns casos, lesões da córnea.

SALMANN e MEYER²⁶⁰ observaram que, em coelhos, pequenas quantidades de penicilina penetram no humor aquoso por via sanguínea. Fizeram estudo comparativo do grau de penetração da penicilina por aplicação iontoforética ou por simples banho da córnea. Verificaram que, após uma aplicação iontoforética, o humor aquoso revelava poder antibacteriano durante cerca de 4 horas, enquanto que, o banho simples da córnea, com solução de igual concentração, apenas 2 horas.

SALMANN²⁵⁹ fez, em coelho, uma inoculação intralenticular de *Clostridium welchii*. Resultou em oftalmite destrutiva que não foi coibida pela aplicação da penicilina, 6 horas após.

ROBSON e SCOTT²⁴⁹ fizeram tratamento experimental de lesões da córnea de coelho provocadas por *Staphylococcus aureus*. Obtiveram resultados satisfatórios com aplicação local da penicilina quando o tratamento era iniciado 1 hora após a inoculação do germe. Houve pouco ou nenhum resultado com o tratamento iniciado 24 horas após a infecção experimental da córnea. Verificaram, entretanto, que o *Staphylococcus aureus* era eliminado da flora do saco conjuntival pela aplicação local da penicilina²⁵⁰.

Infecções bucais

HERRELL e NICHOLS¹⁸⁴ relataram a eficiência da penicilina no tratamento de 5 pacientes com extensa inflamação da mucosa do assoalho bucal, 2 dos quais apresentavam bacteremia como complicação. A melhora dramática alimentou a esperança de que a penicilina evita a necessidade de tratamento cirúrgico radical e extensivo e reduz a frequência e a severidade das complicações. Segundo SOPHIAN e CONNOLLY²⁷⁰ obtêm-se resultados tão bons no tratamento das infecções bucais com uma irrigação diária da boca com 5.000 unidades de penicilina, como pela administração de grandes doses, por via intramuscular. Esta observação pode, em parte, ser explicada pela ausência de eliminação de penicilina pela saliva após administração parenteral como observaram RAMMELKAMP e KEEFER²³².

Queremos lembrar que as inflamações da cavidade bucal são, com muita frequência, causadas pela associação fuso-espirilar (fuso-espiroquetose). É bem possível que os resultados satisfatórios obtidos no tratamento das infecções bucais dependa, em parte, da sensibilidade do *Treponema vincenti* à penicilina visto que já há observações suficientes demonstrando grande sensibilidade do espiroqueta da sífilis (*Treponema pallidum*).

Mastoidites

FLOREY e FLOREY⁹⁵ usaram sal de cálcio da penicilina, que é menos higroscópico que o de sódio. O de cálcio, usado em soluções ou sob a forma de pó, mostrou-se satisfatório e de mais conveniente aplicação. 22 pacientes com infecção da mastóide foram tratados, por aspiração do exsudato e instilação, por meio de um tubo inserido na abertura cirúrgica. O título da solução de penicilina variou de 250 a 500 Unidades Oxford por cm³, sendo usada a média total de 17.300 unidades. A administração se fez em cada 6 horas nos cinco primeiros dias e, em cada 12 horas, nos dois seguintes. Houve cura primária em 19 dos 22 pacien-

tes. O ouvido deixou de purgar nos primeiros curativos (5 dias) ou dentro de 10 dias após a intervenção cirúrgica. Dois casos de insucesso foram atribuídos à inexperiência da técnica de aplicação.

Sinusites

FLOREY e FLOREY⁹⁵ trataram 11 pacientes com sinusite crônica com solução de penicilina contendo 200 a 500 unidades por cm³. Nos seios paranasais longos e tortuosos a solução foi injetada sob pressão através de cateter, inserido no ponto mais distante possível. A abertura foi fechada com borracha imediatamente após a retirada do cateter. Nos sinus curtos a penicilina foi introduzida sob a forma de pó. O tratamento foi continuado até que os exames culturais revelassem ausência de germes ou somente presença dos não patogênicos. Dos 11 pacientes 9 foram curados em períodos de 20 dias a 4 semanas.

TERAPÊUTICA SISTÊMICA PELA PENICILINA

A penicilina, o poderoso agente quimioterápico que veio depor nas mãos do clínico o melhor recurso para o tratamento de determinadas infecções microbianas, não deve ser considerada panacéia universal. De poderoso agente antibacteriano, porém de ação eminentemente seletiva, deve-se esperar êxito terapêutico apenas nos processos infecciosos determinados por microrganismos a êle sensíveis. Torna-se, pois, necessário estabelecer o diagnóstico etiológico antes de se instituir a terapêutica pela penicilina.

O diagnóstico de um agente patogênico penicilino-sensível é o ponto básico que orienta o terapeuta sobre o modo e via de administração da droga e sobre as doses a serem empregadas. Da posologia adequada depende o sucesso terapêutico; sendo a penicilina substância mui facilmente eliminada pelo organismo, exige administração contínua, ou intermitente, com intervalos convenientes, para que se mantenha em circulação durante todo o tempo concentração terapêutica. O controle dessa concentração pode ser feito pela dosagem da atividade inibidora no soro sanguíneo sobre o microrganismo patogênico.

TRATAMENTO DAS INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS

Com o advento da penicilinoterapia o sério problema da terapêutica das estafilococias foi satisfatoriamente resolvido. Não podemos ainda dizer —ótivamente— pois, ao lado do grande nú-

mero de estafilococias graves, admiravelmente curadas pela terapêutica penicilínica, não são poucos os casos em que ela falhou. Entre os estafilococos que são bactérias da mais alta sensibilidade à penicilina encontram-se raças pouco sensíveis e outras completamente insensíveis.

PULVERTAFT²²⁴ verificou que 13% dos estafilococos são insensíveis à penicilina.

PIRES DE MESQUITA¹⁹⁴, que estudou, minuciosamente, as estafilococias em todos os seus aspectos, verificou serem entre 157 raças de estafilococos, 19 penicilino-resistentes. Destas, 8 não eram plasmocoagulantes e não eram lisadas pelo bacteriófago homólogo; apenas 1 era hemolítica. As 11 restantes, consideradas patogênicas, representavam 15,09% do total das raças estudadas. Diante desses resultados não é de se estranhar, por exemplo, um caso de septicemia estafilocócica, observado por CINTRA DO PRADO²²¹ em que a penicilina falhou, mesmo com administração de 2 milhões de Unidades Oxford. Talvez se tivesse sido feito nesse caso contrôlo de ação terapêutica, pelas provas de inibição “in vitro” com a raça isolada, fôsse possível prever a resistência à droga.

Sobre a resistência dos estafilococos, TODD, TURNER e DREW²⁷⁹ fizeram recentemente estudos interessantes. Verificaram que duas raças plasmocoagulantes, que haviam se tornado resistentes por cultivo em quantidades crescentes de penicilina, voltaram a ser sensíveis após serem repicadas, diariamente, em caldo sem penicilina.

Ao contrário da observação de SCHMIDT e SESLER²⁶² sobre a persistência da resistência adquirida pelas raças de pneumococos tipo III, a resistência adquirida pelas raças de estafilococos estudadas por TODD e col.²⁷⁹ não constituía característica permanente. A possibilidade de resistência temporária fala a favor da necessidade, principalmente nos casos graves, de contrôlo da atividade terapêutica do soro sanguíneo, durante o tratamento, pelas provas de inibição “in vitro” sobre o germe patogênico, e da administração inicial de doses elevadas como, aliás, se dá com as sulfonamidas.

Com êstes cuidados se pode esperar do emprêgo da penicilina em infecções por estafilococos penicilino-sensíveis, resultados incomparavelmente melhores do que com qualquer outro recurso terapêutico. Analisemos os resultados obtidos recentemente por alguns autores.

HARFORD e colaboradores ¹²⁷ trataram com penicilina 20 pacientes com infecção estafilocócica generalizada 1 dos quais apresentava bacteremia. As doses variaram de 5.000 a 40.000 Unidades Oxford administradas cada 2 ou 4 horas. O sal sódico da penicilina contendo 300 unidades por miligrama foi diluído em solução fisiológica que ficou conservada em geladeira no intervalo das injeções. Entre os 16 pacientes, 11 se restabeleceram, embora apresentassem pneumonia estafilocócica metastática; os outros morreram.

Trataram, também, 3 pacientes com endocardite bacteriana aguda causada pelo *Staphylococcus aureus*. Um morreu, mas os outros mostraram-se clinicamente curados após 2 a 4 meses.

HERBST e MERRICKS ¹³³ trataram um paciente com septicemia provocada pelo *Staphylococcus albus*, que ocorrera após nefrostomia para extração de cálculos renais. Tratava-se de caso grave em que se empregou 8.355.000 Unidades Oxford de penicilina. Apesar de usarem o ácido p-aminohipúrico, a fim de diminuir a eliminação da penicilina, a cura completa só foi possível após drenagem cirúrgica dos abscessos renais secundários. Este caso nos induz a admitir que a referida raça de *St. albus* era, como no caso examinado por CINTRA DO PRADO ²²¹, resistente à penicilina. Neste caso também podemos admitir a hipótese de que a penicilina não atuasse por não ter atingido, no interior do abscesso isolado, concentração adequada.

SILVERTHORNE ²⁶⁷ tratou com penicilina dois pacientes com septicemia estafilocócica resistente ao tratamento sulfonamídico. A cura foi rápida e, apesar de se tratar de crianças, uma com 6 semanas de idade, não foi notada qualquer reação. HERRELL ¹³⁷ empregou em 8 pacientes com infecções produzidas pelo *Staphylococcus aureus*, penicilina, por via endovenosa, obtendo resultados satisfatórios.

KEEFER e colaboradores ¹⁵⁴ recomendam para o tratamento das estafilococias graves a administração total de 500.000 a 1.000.000 de Unidades Oxford. Os melhores resultados foram obtidos em tratamento continuado por 10 dias a 2 semanas. 10.000 unidades, pelo menos, devem ser administradas cada 2 ou 3 horas, no início do tratamento, quer por injeção endovenosa, contínua ou interrompida, quer por intramuscular.

WILLIAMS e NICHOLS ³¹³ trataram dois pacientes com osteomielite do frontal com penicilina e obtiveram resultado satisfatório.

Num dêles, em que a sulfadiazina não dera resultado, isolou-se do sangue uma raça hemolítica de *Staphylococcus aureus*.

GUDIN e NEIVA¹²¹ obtiveram êxito terapêutico, em dois casos rebeldes de osteomielite, combinando o tratamento cirúrgico, em sala asséptica com a administração de penicilina por via intrarterial.

KEEFER e colaboradores¹⁵⁴ afirmam que, entre 55 pacientes com osteomielite, 48 foram curados ou melhoraram com o uso de penicilina; os outros não obtiveram resultados que satisfizesse. Pelas expressões “curados ou melhorados” os autores quiseram dizer que “as feridas ou os sinus ficaram completamente limpos pelo tratamento ou que os estafilococos desapareceram do exsudato e as lesões ficaram limpas”. Usaram várias vias de administração, endovenosa contínua, endovenosa ou intramuscular intermitente, e tratamento local.

Desejamos lembrar que nas estafilococias reincidentes ou rebeldes onde tudo leva a pensar em “terreno” inadequado, ou seja, condições deficientes de imunidade, é conveniente o emprêgo da anatoxina estafilocócica, pois a penicilina cura mas não determina proteção ulterior duradoura.

TERAPÊUTICA DAS INFECÇÕES ESTREPTOCÓCICAS

O gênero *Streptococcus* abrange vários grupos de bactérias cuja sensibilidade à penicilina varia muito. Dos grupos A, B, C, D, E, F, G, H e K de Lancefield, caracterizados por reações de precipitação, BIER²⁴ ressalta a importância do grupo A que abrange, praticamente, todos os estreptococos hemolíticos patogênicos para o homem seja qual fôr sua origem: escarlatina, erisipela, infecção puerperal, amigdalite, feridas infectadas, abscessos, meningite, empiema, nefrite, etc. Antes do advento da penicilino-terapia, SÍLVIO LAGO¹⁰⁰, considerando a erisipela como a mais comum das infecções estreptocócicas, afirmou que a sulfamidoterapia era o mais eficiente meio terapêutico. Embora as sulfonamidas continuem sendo preciosos e eficientes recursos terapêuticos, a penicilina é, atualmente, o agente quimioterápico de eleição nas infecções estreptocócicas. Sua ação foi revelada até nas endocardites bacterianas subagudas determinadas pelo *Streptococcus viridans*, germe resistente que, de modo raro e apenas temporariamente, responde às sulfonamidas²⁸. Com efeito, DAWSON e HUNTER⁷², entre 20 casos de endocardite subaguda estreptocócica, obtiveram cura em 15, pelo tratamento associado de penicilina e heparina.

A dosagem diária da penicilina variou de 80.000 a 500.000 Unidades Oxford e a quantidade total administrada a cada paciente variou de 830.000 a 37.700.000 Unidades Oxford.

A quantidade de heparina administrada foi de 200 miligramas em cada 4 ou 5 dias em alguns pacientes e menos em outros. A maioria tolerou o tratamento de modo satisfatório; os outros queixaram-se de dôr no local das injeções.

HARFORD e colaboradores¹²⁷ trataram com penicilina 3 pacientes com endocardite bacteriana subaguda devida ao *Streptococcus viridans*. Um morreu; os outros apresentaram reincidência da moléstia logo após terminado o primeiro curso do tratamento, tendo sido, então, submetidos a novo tratamento e, após mais de dois meses, não apresentaram sinais de reincidência.

HERRELL¹³⁵ não obteve resultado favorável, havendo empregado apenas 128.000 Unidades Oxford num paciente com endocardite estreptocócica; porém, FLOREY e FLOREY⁹⁵ verificaram melhoras em paciente com endocardite produzida pelo *Streptococcus viridans*.

LOEWE e colaboradores¹⁷⁵ trataram sete pacientes com endocardite subaguda com penicilina e heparina associadas. A primeira foi administrada na veia, gôta a gôta, e a heparina por via subcutânea. Observaram melhora rápida dos pacientes, cujas hemoculturas se tornaram negativas. A observação da constância de resultados daria segurança sôbre a eficiência desse método terapêutico. É conveniente lembrar que, em casos semelhantes, KATZ e ELEK¹⁵³ experimentaram as associações heparina-sulfonamida e heparina-sulfonamida-arsfenamina, não obtendo qualquer resultado.

WHITE³⁰⁹ diz não ter obtido resultados satisfatórios em 5 pacientes com endocardite bacteriana subaguda tratados com sulfonamidas associadas à dicoumarina (100 — 200 mgrs. por dia) ao invés de heparina.

KEEFER e colaboradores¹⁵⁴ apresentaram os resultados do tratamento pela penicilina em 17 pacientes com endocardite bacteriana, relatando 4 casos de morte, 10 sem alteração do curso da infecção e 3 com melhoras durante o tratamento. Em dois dêstes últimos houve reincidência quando o tratamento foi interrompido. O período de tratamento foi de 9 a 26 dias e as quantidades totais administradas oscilaram entre 240.000 e 1.760.000 Unidades Oxford. Dizem que algumas raças de germes pareciam ser ligeiramente mais sensíveis do que outras e que havia a possibilidade da esterilização temporária da corrente sanguínea, em alguns casos, pelo menos.

WHITE²⁰⁰ tratou 9 pacientes com endocardite bacteriana subaguda, sendo 6 mulheres e 3 homens cujas idades variavam de 17 a 70 anos. Todos, com exceção de um, apresentavam afecção cardíaca reumatismal. Em 6 casos foram encontrados estreptococos alfa-hemolíticos; em 2, estreptococos não hemolíticos e em um, estreptococo beta-hemolítico. A dose de penicilina variou de 100.000 a 288.000 unidades diárias, por período de duas a quatro semanas, tendo sido a média 200.000 unidades por dia, durante 3 semanas. Apenas em 4 casos houve aparentemente bons resultados, 3 dos quais se apresentaram clínica e bacteriológicamente “curados” 7 semanas, 5 e 8 meses após o tratamento, respectivamente.

MITCHELL e RAMINESTER²⁰¹ curaram com penicilina um paciente com infecção puerperal e septicemia produzida por estreptococo hemolítico sulfonamido-resistente. KEEFER e colaboradores¹⁵⁴ relataram resultados obtidos em 23 pacientes com infecção por estreptococos hemolíticos sulfonamido-resistentes, tratados com penicilina; 13 foram curados ou melhoraram consideravelmente, 7 morreram e 3 não revelaram ação terapêutica. De 6 com infecção por estreptococos anaeróbios, 5 possuíam infecção uterina. Dêstes, 3 curaram-se e 2 morreram, um por embolia pulmonar e o outro devido a abscessos múltiplos dos pulmões. O sexto paciente, que apresentava fratura do crâneo, com meningite, curou-se¹⁵⁴.

PLUMMER e colaboradores²¹⁶ estudaram clínica e bacteriológicamente 54 casos de amigdalite e laringite aguda, dos quais 45 apresentaram culturas positivas de estreptococos hemolíticos do grupo A (Lancefield). Dos pacientes com infecção estreptocócica, 28 foram tratados com penicilina, administrada por via intramuscular, na dose de 15.000 unidades cada 4 horas, durante período que variou de 24 horas a 6 dias. A penicilina mostrou ação intensa sobre os estreptococos do nasofaringe. As culturas feitas 24 horas após o início do tratamento foram quase sempre negativas. Houve reincidência de faringite e amigdalite em 4 dos 9 pacientes tratados durante menos de 4 dias, porém nos 10 casos em que o tratamento durou 6 dias, não houve reincidência.

BLAKE e CRAIGE²⁰ trataram 3 pacientes com infecção supurativa pulmonar resistente à sulfadiazina; em dois, produzida por estafilococos e em um, por estreptococo hemolítico. As respostas favoráveis à penicilina alimentaram a esperança de se curar infecções pulmonares supurativas por meios clínicos ao invés de cirúrgicos.

TERAPEUTICA DAS INFECÇÕES PNEUMOCÓCICAS

Em 1942, POWELL e JAMIESON ²¹⁹ observaram o efeito terapêutico da penicilina em infecções pneumocócicas experimentais em camundongos, resistentes ou não às sulfonamidas.

TILLET e colaboradores ²⁷⁷ isolaram, de dois pacientes, amostras de pneumococos tipo I e III que eram completamente resistentes à sulfadiazina. As infecções produzidas, em camundongos, por êsses germes, responderam muito bem ao tratamento pela penicilina. Com o uso de apenas uma dose de tirotricina não houve proteção satisfatória.

TILLET e outros ²⁷⁸ trataram 46 pacientes com pneumonia lobar e empiema e estudaram, comparativamente, os diferentes modos de administração, dosagem, intervalo de tratamento, tempo de duração do tratamento e reincidências. 14 que apresentavam pneumonia pneumocócica, tratados com penicilina, foram curados. Logo após o início do tratamento houve melhora clínica, desaparecendo rapidamente a bacteremia presente em alguns casos. Os autores, baseando-se nessas observações, sugerem as seguintes doses para o tratamento:

“Casos de gravidade média: 10.000 unidades de penicilina, dadas, intramuscularmente, cada 3 horas, 4 vezes em cada um de três ou possivelmente quatro dias sucessivos.

Casos seriamente graves: 25.000 unidades, dadas endovenosamente, cada 3 horas, nas duas primeiras doses do primeiro dia, seguidas por 10.000, intramuscularmente, com intervalos de três horas, para as duas segundas doses do primeiro dia. O tratamento subsequente do segundo, terceiro e quarto dias segue o plano estabelecido para os casos de gravidade moderada, isto é, quatro doses de 10.000 unidades, cada três horas, em cada dia”.

Lembram a necessidade de se prolongar o tratamento por 3 ou 4 dias, no mínimo, a fim de evitar reincidências. Quando fôr interrompido precocemente e houver reincidência durante os três primeiros dias, a terapêutica deve ser continuada “até os elementos de imunidade ou outros fatores na evolução da moléstia se tornarem ativos” ²⁷⁸.

Contrastando com o que geralmente tem sido aceito, que a penicilioterapia deve ser feita por administração contínua ou por injeções com intervalo mínimo de 3 horas, os estudos de TILLET e colaboradores ²⁷⁸ parecem indicar que os resultados terapêuticos foram

igualmente satisfatórios com intervalos de 12 ou 16 horas entre os tratamentos de cada dia ou continuando-se o tratamento através de 24 horas. Trataram com penicilina 8 pacientes com empiema pneumocócico, 7 dos quais surgiram como complicação de pneumonia lobar. A administração de sulfadiazina na cavidade do empiema tinha sido ineficiente apesar de o exsudato ter contido 415 mgr. de sulfonamida por cento. A injeção intrapleural de penicilina curou a infecção evitando, assim, drenagem cirúrgica. Resultados ótimos foram obtidos pela administração de 30.000 a 40.000 Unidades Oxford na cavidade pleural, após a aspiração do líquido e irrigação com alguns cm³ de solução fisiológica.

KEEFER e colaboradores¹⁵⁴ verificaram que a administração diária de 100.000 Unidades Oxford de penicilina, durante 3 dias, curava os pacientes com pneumonia pneumocócica. Resultados melhores podem ser obtidos pela administração diária de 60.000 a 90.000 unidades, durante 4 a 7 dias.

HARFORD e colaboradores¹²⁷ trataram, pela penicilina, 9 pacientes com meningite pneumocócica, dos quais 8 foram curados; destes, 3 apresentaram reincidência que foi vencida pela continuação do tratamento.

Verificaram que a penicilina era eficiente no tratamento da pneumonia pneumocócica, porém falhou em 2 casos de empiema, até que se fez a drenagem cirúrgica. SWEET e colaboradores²⁷⁴ trataram, pela penicilina, 16 pacientes com meningite pneumocócica; de 3 em que o tratamento foi feito só com penicilina, 2 morreram. Dos 13 casos em que esta foi associada às sulfonamidas, houve 7 letais. Trataram 40 pacientes com a mesma moléstia com sulfonamidas, dos quais apenas 3 foram salvos. Observaram severos sintomas neurológicos com o tratamento pela penicilina administrada por via intratecal e intramuscular.

BARKER²⁰ tratou um paciente com síndrome de Gradenigo (otite média com cefaleia e paralisia do sexto nervo do mesmo lado) complicada com meningite pneumocócica. Obteve resultado satisfatório associado sulfadiazina à penicilino-terapia, por via endovenosa e intrarraqueana. É possível que nesse caso o sucesso tenha dependido da ação sinérgica entre a sulfadiazina e a penicilina, como verificara UNGAR²⁸⁷ com a sulfapiridina.

TERAPÊUTICA DAS INFECÇÕES GONOCÓCICAS

Os resultados obtidos com o tratamento da blenorragia pela penicilina são bastante animadores em virtude da grande sensibilidade dos gonococos a esta substância.

ABRAHAM e colaboradores³ afirmaram que a penicilina diluída a cerca de 1:2.000.000 inibiu o crescimento de 6 diferentes raças de *Neisseria gonorrhoeae*, HERRELL, COOK e THOMPSON¹³⁶ fizeram provas "in vitro", da sensibilidade de 3 raças de gonococos a diluições de penicilina a 1:100.000 e a 1:200.000. Verificaram que o número de germes vivos de duas raças diminuiu consideravelmente, após o contacto com a penicilina entre uma e duas horas, e na outra raça, entre a segunda e a terceira hora. Todos os gonococos morreram após contacto com a penicilina durante 3 ou 4 horas.

Trataram 5 pacientes com gonorréia resistente às sulfonamidas. A dose total, em cada caso, variou de 68.000 a 104.000 Unidades Oxford. Pela administração de doses adequadas de penicilina tornaram-se negativas as culturas de urina e de secreção prostática, após 17 a 48 horas.

COHN, STUDDIFORD e GRUNSTEIN⁶⁰ trataram, com quantidades diferentes de penicilina, 44 mulheres com gonorréia, das quais duas eram sensíveis às sulfonamidas e 42 não reagiram, pelo menos, a duas séries de tratamento com o sulfatiazol. Após cerca de 12 horas do início do tratamento, os exames bacteriológicos do material em 43 dos 44 pacientes com blenorragia tornaram-se negativos. Somente em um caso houve reincidência após a administração de dose total de 50.000 Unidades Oxford; houve, entretanto, reação favorável com dose suplementar de 100.000 unidades. Estes autores acham que a dose total de 75.000 Unidades Oxford de penicilina parece suficiente no tratamento da gonorréia, nas mulheres. Este tratamento pode ser completado dentro de período de 6 horas. Uma criança de 5 anos de idade com vaginite gonocócica resistente às sulfonamidas apresentou resultados bacteriológicos negativos com dose total de 40.000 Unidades Oxford. Não foram observados efeitos tóxicos devidos à administração da penicilina.

Dois pacientes com blenorragia aguda, com diagnóstico elucidado pelo exame bacterioscópico da secreção uretral, foram por nós tratados com penicilina sódica na dose total de 100.000 Unidades Oxford. O tratamento durou 10 horas, pois, aplicamos injeções de

10.000 unidades cada hora. O tratamento foi iniciado às 8 horas da manhã e a última dose foi administrada às 6 da tarde. Administramos as injeções por via intramuscular, exceto a primeira dose, que foi feita por via endovenosa. 48 horas após o início do tratamento ambos os pacientes estavam clínica e bacteriológicamente curados. O sal sódico da penicilina foi diluído em solução fisiológica de cloreto de sódio de modo a conter 10.000 unidades em 2 cm³. Conservamos esta solução durante todo tempo em geladeira, retirando-a apenas no momento de aplicar as injeções. Não observamos quaisquer sinais de intolerância; queixaram-se os pacientes apenas de ligeira dor local, logo após a administração intramuscular.

COOK, POOL e HERRELL⁶³ empregaram a penicilina, com sucesso, em 14 casos de gonorréia, dos quais 13 eram sulfonamido-resistentes. O agente terapêutico foi administrado por via endovenosa, método contínuo, gôta a gôta, ou por via intramuscular. A maior dose total usada para se obter cura de 11 homens foi de 110.000 Unidades Oxford e a menor 65.000. A dose total máxima administrada a uma das 3 mulheres tratadas foi de 162.000 Unidades Oxford e de 113.000 a mínima, havendo cura em todos os casos. KEEFER e colaboradores¹⁵⁴, membros do "Committee on Chemotherapeutic and Other Agents of the National Research Council", disseram que "os resultados do tratamento das infecções gonocócicas pela penicilina têm sido extraordinariamente bons". Entre 129 pacientes tratados pelo grupo do Dr. J. F. MAHONEY e colaboradores, do "United States Public Health Service", desapareceram, em 125, os sintomas e tornaram-se negativas as culturas dentro de um período de 9 a 48 horas após a administração de 100.000 a 160.000 Unidades Oxford. As doses variaram de 10.000 unidades cada 3 horas (16 doses) a 20.000 cada 3 horas (5 doses) ou 25.000 cada 3 horas (3 doses). Em todos estes pacientes, curados com a penicilina, as infecções eram sulfonamido-resistentes. Diante de tais resultados, os autores assim se expressaram: "Here, then, is a most potent weapon in the treatment of sulfonamide resistant gonorrhoea, and it is not too much to predict that penicillin will prove to be one of the most effective agents in the treatment of a disease that causes great ineffectiveness in the forces and in the civilian population".

MAHONEY e colaboradores declaram, em outro trabalho¹⁸³, que as injeções intramusculares de 10.000 unidades de penicilina

sódica em 2 cm³ de água, cada 3 horas, numa dose total de 160.000 unidades, administradas em 45 horas, produziram resultados excelentes num grupo de 72 pacientes do sexo masculino, com gonorréia sulfonamido-resistente de 10 a 330 dias de duração. Na maioria dos pacientes as culturas do material uretral e prostático foram negativas, 24 horas após tratamento pela penicilina.

GRIFFEY¹²⁰ obteve cura completa e rápida em paciente com blenorragia complicada com conjuntivite gonocócica. Aplicou 10 injeções intramusculares de 25.000 Unidades Oxford de penicilina sódica, uma em cada 3 horas. 5 horas após terminar o tratamento, os esfregaços e culturas de urina e das secreções conjuntival e prostática tornaram-se negativas.

HARFORD e colaboradores¹²⁷ trataram 12 mulheres, com gonorréia sulfonamido-resistente, que foram rapidamente curadas com pequenas doses de penicilina. Cada paciente foi observada em hospital, durante 30 dias após o término do tratamento, verificando-se um caso de duvidosa reincidência.

TURNER e STERNBERG²⁸⁵ fizeram, nos Estados Unidos, estudo sobre as moléstias venéreas dos pacientes da Armada internados em vários hospitais. Fizeram investigações clínicas no sentido de determinar a menor dose de penicilina suficiente para a cura da blenorragia. Trataram com diferentes doses de penicilina pacientes com gonorréia que fôra resistente a dois ou mais cursos de tratamento com sulfatiazol ou sulfadiazina ou a piretoterapia. Foi preferida a via intramuscular para as injeções, via que se revelou superior à endovenosa. Os resultados, controlados por culturas das secreções prostáticas no 7.^o, 14.^o e 21.^o dias de tratamento, foram satisfatórios.

Um total de 80.000 Unidades Oxford foi suficiente para curar 95% dos pacientes tratados. 40.000 unidades, porém, curaram mais que 85%. Houve, em geral, melhora subjetiva e objetiva após 24 horas do início do tratamento. Referindo-se aos resultados obtidos, nestes casos, com a penicilina, os autores assim se expressaram: "this remarkable drug bids fair to reduce gonorrhoea to the status of an inconsequential infection".

WELCH e colaboradores³⁰⁶ trataram 68 pacientes com gonorréia, a maioria dos quais com infecções sulfonamido-resistente, aplicando uma única injeção intramuscular de 25.000 unidades de penicilina: 35 eram homens e 33 mulheres. 64 pacientes ou seja 94%.

foram curados. Com o fim de comparação trataram com uma simples injeção intramuscular de 25.000 unidades de penicilina comercial, 58 outros pacientes com gonorréia (31 homens e 27 mulheres) sendo curados com essa dose apenas 37 ou seja 64% dos casos. O critério de cura foi baseado em culturas negativas obtidas em 1, 3 e 5 dias após o tratamento. 3 dos pacientes em que a penicilina comercial falhou foram curados com dose subsequente de 25.000 unidades de penicilina X. Esta diferença de resultados pode ser atribuída, em parte, pela manutenção da penicilina X em circulação durante tempo maior do que o da penicilina comercial. Com efeito, WELCH e outros ³⁰⁶ verificaram que, nas primeiras horas, 59% da penicilina X injetada é eliminada pela urina, enquanto a eliminação da penicilina comercial, comparativamente, foi de 68%.

ROMĀNSKY e RITTMAN ²⁵⁴ curaram 11 pacientes com gonorréia com uma única injeção de penicilina em veículo céreo-oleoso. Verificaram que injeção única de penicilina em suspensão em mistura de óleo de amendoim "peanut" e de 1 a 6% de cêra de abelhas, produz retenção da penicilina no sangue, em concentração terapêutica, durante 7 horas ou mais. Nesta mistura, a penicilina manteve sua atividade em temperatura ambiente ou na geladeira, durante 30 a 62 dias, não demonstrando quaisquer sinais de alteração.

Este processo de prolongar a atividade terapêutica da penicilina no organismo, que já estudamos no capítulo anterior, parece simplificar, grandemente, a solução do problema social das infecções venéreas gonocócicas.

TERAPÊUTICA DAS INFECÇÕES MENINGOCÓCICAS

Os meningococos, como vimos anteriormente, são, como os gonococos, altamente sensíveis à ação bacterioinibidora da penicilina "in vitro".

Relativamente, mui poucos pacientes com infecções meningocócicas têm sido tratados com penicilina, talvez porque, nas meningites meningocócicas, o tratamento pelas sulfonamidas tenha sido bastante eficiente.

KEEFER e colaboradores ¹⁵⁴ trataram 5 pacientes com meningite meningocócica, dos quais um morreu. Um dos curados foi tratado apenas por via parenteral. O número de casos é muito reduzido para se tirar conclusões sobre a eficiência da penicilinoterapia nas infecções meningocócicas. Os resultados obtidos parecem in-

dicar que a administração da penicilina, por via intramuscular ou endovenosa, é eficiente no tratamento das meningites meningocócicas. Os autores acham que resultados melhores podem ser obtidos pelo emprêgo simultâneo da penicilina por via parenteral e intratecal.

DAWSON e HOBBY⁷¹ relataram os resultados de 100 casos de infecção tratada com penicilina. Dêsses, dois eram de meningite meningocócica. O tratamento por injeções intramusculares e intratecais de penicilina curou a infecção de um dos pacientes em que havia aparecido anúria enquanto era tratado por sulfonamida. As injeções somente intramusculares, em outro paciente, não deram resultado satisfatório. Este fato representa confirmação clínica das observações experimentais de RAMMELKAMP e KEEFER²³² segundo as quais a penicilina não penetra no líquido cefalorraquidiano quando administrada por qualquer via a não ser a intratecal, recomendam o emprêgo de 20.000 Unidades Oxford de penicilina diárias, por via intratecal, para tratamento das meningites meningocócicas. Geralmente, são suficientes 2 a 3 injeções. É também indicado o tratamento sistêmico adicional.

HARFORD e colaboradores¹²⁷ obtiveram cura extraordinária, pela penicilina, de paciente com fulminante meningite meningocócica que tinha sido resistente ao tratamento, por 48 horas, com a sulfamerazina.

COOKE e GOLDRING⁶⁵ verificaram presença de penicilina no liquor, após injeção intramuscular e após injeção intraperitoneal, porém, em concentração muito menor do que no sangue.

A penicilina injetada intratecalmente, durante a meningite aguda, persiste no líquido cefalorraquidiano, em concentração elevada, durante 24 horas, quando são administradas grandes doses e, em um caso permaneceu durante 72 horas, após a interrupção das injeções intratecais. Injetando-se pequenas doses intratecais a concentração em 24 horas é menor, não se encontrando mais penicilina após 48 horas. Há alguma evidência de que a penicilina injetada intratecalmente passa rapidamente das meninges medulares para as cerebrais, porém menos rapidamente das cerebrais para as meninges medulares.

TERAPEUTICA DAS INFECÇÕES POR BACTÉRIAS ANAERÓBIAS

Mc INTOSH e SELBIE¹⁸⁵ conseguiram, com solução de sal de bário da penicilina, proteger camundongos experimentalmente in-

fectados por *Clostridium perfringens*, quando a administração de penicilina era feita ao mesmo tempo que a inoculação do germe. Algumas vezes houve proteção dos animais quando a penicilina foi dada uma hora após a inoculação e, apenas retardamento da morte pela administração 3 a 6 horas após.

Verificaram, em suas experiências, que a penicilina, se mostrou absolutamente superior à proflavina, sulfatiazol e sulfanilamida.

Em experiências posteriores MC INTOSH e SELBIE¹⁸⁶ estudaram a ação terapêutica de outras drogas inclusive as sulfonamidas, acri-dinas e penicilina, na gangrena gasosa. A penicilina revelou-se o agente mais eficaz contra *Clostridium perfringens* e *Clostridium novyi*. Em outros estudos¹⁸⁷ verificaram, em camundongos infectados com gangrena gasosa e tratados com doses adequadas de anatoxina, que os resultados eram muito melhores quando se fazia ao mesmo tempo aplicação local de penicilina.

HAC e HUBERT¹²⁴ observaram, também, que a penicilina é mais ativa do que as sulfonamidas contra o *Clostridium perfringens*. Uma única dose de 50 Unidades Oxford injetada simultaneamente com o *Clostridium perfringens* protegeu 98% dos camundongos e cobaias infectados. Com a administração de penicilina 3 horas após a inoculação do germe houve apenas 30% de animais sobreviventes. As lesões locais determinadas pelo *Clostridium perfringens* foram completamente curadas em 3 semanas, injetando-se penicilina diretamente nas lesões.

CHAIN e colaboradores⁴⁸ verificaram a atividade da penicilina contra diversas bactérias anaeróbias encontradas nos ferimentos de guerra e na gangrena gasosa, como *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* e *Clostridium novyi*.

Mac KNIGHT, LOEWENBERG e WRIGHT¹⁹² trataram uma menina de 7 anos apresentando gangrena gasosa após amputação do braço esquerdo que havia sido fraturado. Obtiveram cura da infecção com tratamento com penicilina, por via endovenosa. A administração de anatoxina, peróxido de hidrogênio, sulfonamidas e raios Roentgen de alta voltagem não havia dado resultados.

Por estas observações pode-se avaliar importância e a necessidade de novos estudos sobre o uso da penicilina nas infecções por bactérias anaeróbias.

TERAPÊUTICA DAS MOLÉSTIAS POR PROTOZOÁRIOS

A penicilina, além de possuir intensa ação inibidora sobre numerosas bactérias patogênicas é, também, dotada de ação inibidora sobre determinados protozoários patogênicos.

LOURIE e COLLIER¹⁷⁶ verificaram ser eficiente no tratamento infecções experimentais de camundongos pela *Borrelia recurrentis* (espiroqueta da febre recorrente) e pelo *Spirillum minus*. Observaram em suas experiências, que a penicilina é muito mais ativa do que a neo-arsfenamina.

HEILMAN e HERRELL¹³² fizeram provas "in vitro" e em camundongos, verificando ser também ativa sobre a *Borrelia novyi*. Estas observações foram confirmadas por AUGUSTINE, WEINMAN e ALLISTER¹⁶.

ERCOLI e LAFFERTY⁸¹, em infecções de camundongos por *Borrelia novyi*, verificaram que a dose mínima ativa de sal sódico da penicilina é de 25.000 unidades por quilo; doses de 200.000 unidades por quilo e mais podem ser consideradas curativas.

UBATUBA e VIEIRA²⁸⁶ verificaram que a penicilina bárjica fabricada no Instituto Osvaldo Cruz não influencia na mortalidade, grau de anemia e intensidade da infecção experimental produzida por *Bartonella muris* de rato albino esplenectomizado. Mostrou-se ineficiente na dose de 400 Unidades Oxford por quilo de rato. Se esse antibiótico tiver algum efeito sobre a bartonelose do rato albino, só o exercerá em doses muito maiores²⁸⁶.

Outros protozoários mostraram-se, também, insensíveis à ação da penicilina: *Trypanosoma rhodesiense*, *T. congolense*, *T. cruzi* e *Plasmodium relictum*¹⁷⁶, *Trypanosoma lewise*¹⁶, *Trypanosoma equiperdum*²²⁸, e *Leishmania brasiliensis*⁴¹.

ARANHA CAMPOS⁴¹, estudando o comportamento das formas flageladas de leishmanias (leptomonas), em presença da penicilina "in vitro", observou que não exerce qualquer ação sobre o parasito, quer no crescimento, quer na vitalidade. Adicionou 5.000 a 15.000 Unidades Oxford de penicilina à água de condensação do meio N. N. N., em tubos e nêle cultivou leishmanias. Após 12 dias de cultivo em temperatura de 20°-25°C., foram feitas dosagens que mostraram apenas ligeira diminuição da atividade da penicilina nos tubos em que foi adicionada. Sugeriu a adição de penicilina ao meio de cultura N. N. N., como impediendo de contaminação, tanto

para isolamento de leishmanias como para as culturas destinadas ao preparo de vacina.

RIBEIRO e SAMPAIO²⁴¹ trataram, com penicilina, dois pacientes portadores de leishmaniose cutâneo-mucosa americana e que apresentavam positivas, a pesquisa de leishmania e a reação de Montenegro. Ao 1.º paciente foram administradas, por via intramuscular, 12.500 Unidades Oxford, cada 3 horas, até perfazer 800.000 unidades. Ao 2.º paciente, dose total de 1.200.000 unidades, com aplicação de, 25.000 unidades, cada 3 horas, pela mesma via. Em ambos não houve modificação das lesões mucosas, e as cutâneas se apresentaram unicamente mais limpas. A pesquisa de leishmanias manteve-se positiva, 5 dias após o emprêgo da penicilina.

Os autores atribuem a melhora das lesões cutâneas à ação da penicilina sobre a infecção secundária e admitem a possibilidade de que a penicilina seja ineficaz na leishmaniose cutâneo-mucosa americana.

CUNHA, AREIA LEÃO, e CARDOSO⁶⁹ obtiveram ótimos resultados com emprêgo da penicilina mesmo em pequenas doses, no tratamento de 7 pacientes com boubá (*framboesia*, *pián*, *yaws*). Obtiveram cura clínica com exames microscópicos negativos em todos os casos num período de 12 a 44 dias. As reações sorológicas se mostravam negativas em todos os casos, 60 dias após o tratamento. O tratamento consistiu em injeções intramusculares de 4 em 4, ou de 6 em 6 horas, empregando-se, em média, 200 Unidades Orford de cada vez. A penicilina usada foi preparada no Instituto Oswaldo Cruz e a dose total para cada doente variou entre 9.600 a 52.000 unidades. Apesar da freqüência e o número elevado de injeções, não foi observada nenhuma manifestação tóxica.

Tratando outros cinco pacientes com boubá, com penicilina de fabricação norte-americana (SQUIBB, WINTHROP e LILLY) observaram desaparecimento completo das lesões externas dentro de 12 a 25 dias de tratamento. Como nos casos anteriores, administraram 200 Unidades Oxford cada 4 horas. A dose total empregada variou de 24.000 a 54.000 unidades.

FINDLAY, HILL e MC PHERSON⁸⁵ trataram com penicilina 24 crianças com boubá, das quais 19 ficaram clinicamente curadas após 6 ½ dias de tratamento. Injetaram-na por via intramuscular, na dose de 50.000-100.000 Unidades Oxford, durante 12-24 horas.

35 pacientes com úlceras tropicais fagedênicas em que havia associação do *Treponema pertenue* e bacilos fusiformes foram, tam-

bém, tratados com penicilina. 100.000 Unidades Oxford foram injetadas em 24 horas, além de aplicação local de unguento de penicilina contendo 250 unidades por grama. Numa parte dos pacientes apenas foi feito tratamento tópico. Após 48 horas houve diminuição acentuada do pus, com desaparecimento do cheiro e formação rápida do tecido de granulação na base da úlcera e comêço de epiteliação na borda da mesma. Dos 35 pacientes, 6 ficaram completamente curados após 7-35 dias, enquanto os restantes, em processo de cura, continuaram em observação.

GUIMARÃES¹²² tratou 6 pacientes com boubá terciária, empregando pequenas doses de penicilina. As lesões apresentadas foram: úlceras gomosas, periostite, osteíte, osteoporose e gangoza "rhinopharyngitis mutilans". O tratamento durou 2 a 7 meses e a dose total de penicilina variou de 48.000 a 558.000 Unidades Oxford. Todos ficaram clinicamente curados e apresentaram reações de Wassermann negativas que eram antes positivas. Os pacientes com lesões ósseas não mostraram, entretanto, pelo exame radiológico, completa recomposição da estrutura óssea.

O *Treponema pertenué*, mostrou-se muito sensível à penicilina; o mesmo parece acontecer com a *Leptospira icterohæmorrhagiæ*. CARRAGHER³⁹ tratou um paciente com moléstia de Weil, em que o espiroqueta foi encontrado na urina e no sangue. O paciente recebeu, durante os 3 primeiros dias, injeções intramusculares de 20.000 Unidades Oxford, cada 3 horas. O tratamento foi continuado por mais alguns dias com a mesma dose, porém, com intervalos de 4 horas, até perfazer o total de 900.000 unidades. Após êste tratamento o paciente apresentou-se perfeitamente bem, a febre havia desaparecido e as leptospiras não foram mais encontradas tanto na urina como no sangue.

O *Treponema pallidum* felizmente mostrou-se sensível.

ERCOLI e LAFFERTY⁸¹ em experiência em coelhos, verificaram que com dose única, endovenosa de penicilina sódica, eram necessárias 33.000-47.000 unidades por quilo para o desaparecimento do *Treponema pallidum*. O mesmo efeito pode ser obtido com cêrca de 16.000 unidades por quilo se a droga fôr administrada, repetidamente, em período de 72 horas, em doses de, aproximadamente, 4.000 unidades por quilo. A última dose foi suficiente para tornar limpas as lesões primárias, em 10-15 dias.

MAHONEY, ARNOLD e HARRIS¹⁸² fizeram as primeiras experiências de tratamento de sífilis humana, com penicilina. Trata-

ram quatro pacientes do sexo masculino com lesão primária luética, cujo exame revelou a presença do *Treponema pallidum* em número variável de 2 a 10 elementos por campo. Administraram, por via intramuscular, 25.000 Unidades Oxford, cada 4 horas, durante 8 dias consecutivos. Cada paciente recebeu 48 injeções correspondentes a 1.200.000 unidades. O tratamento pareceu muito eficiente, pois os exames do material das lesões tornaram-se negativos 16 horas após o início do tratamento. As provas sorológicas também foram negativas.

DUNHAM e colaboradores⁷⁵ fizeram provas com *Treponema pallidum*, em meios de cultura e verificaram que a concentração ativa era de 800 a 1.600 unidades por 0,8 cm³. Com 240 unidades a atividade foi mínima.

O'LEARY HERRELL²¹⁰ usaram penicilina no tratamento de um paciente com sifiloderma nodular do nariz. Administraram dose total de 320.000 Unidades Oxford, por via endovenosa e intramuscular, durante período de 8 dias. O resultado aparentemente foi satisfatório, porém permaneceram positivas as reações do sêro sanguíneo e do líquido cefalorraquidiano.

BLOOMFIELD, RANTZ e KIRBY⁸⁰ obtiveram bons resultados com penicilina em 7 pacientes com sífilis primária. O *Treponema pallidum* desapareceu, rapidamente, da superfície das lesões que se cicatrizaram em muito pouco tempo.

AREIA LEÃO, GUIMARÃES e NOBREGA¹⁶⁵ trataram 6 pacientes sífilíticos com penicilina, em pequenas doses, no Hospital Evandro Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz. Protossifilomas foram bacterioscopicamente negativos entre 3 e 6 dias e cicatrizaram, completamente, dentro de 10 a 13 dias, com a aplicação de 1.200 a 2.400 Unidades Oxford, por 24 horas. Condilomas sífilíticos e placas mucosas hipertróficas tiveram bacterioscopia negativa dentro de 6 a 8 dias, e cicatrizaram completamente dentro de 10 a 20 dias, com a aplicação de 1.200 unidades por 24 horas. Porém, doses de 4.800 unidades, no mesmo espaço de tempo, foram insuficientes para controlar outras manifestações luéticas secundárias (roséolas, placas mucosas). Em 3 casos sob contrôle sorológico, verificou-se que a negatividade das reações não acompanha imediatamente a cura clínica. Além disso, conforme foi observado também com a boubá, os resultados dos testes sorológicos oscilam meses a fio, negativando e voltando à positividade.

LYDON e COWE¹⁷⁷, em publicação mui recente dizem que nas primeiras 50 observações sôbre o tratamento de sífilis pela penicilina, nos Estados Unidos, a dose total usada em cada caso foi de 2.500.000 Unidades Oxford. Em todos os pacientes o *Treponema pallidum* desapareceu, ràpidamente, das lesões, que logo ficaram limpas. Segundo os autores, êstes pacientes continuam a apresentar reações sorológicas negativas.

Considerando a data da publicação das observações de MAHONEY e colaboradores¹⁸³, alguns pacientes permanecem com reações negativas após um ano e meio do tratamento.

A casuística é diminuta e o tempo de observação ainda pequeno para se poder tirar conclusões definitivas sôbre a eficiência da penicilina na sífilis, que, ao contrário das infecções bacterianas em geral, é moléstia de evolução lenta e pode manifestar reações tardias, paraluéticas. Desejamos lembrar que a penicilina, em relação às bactérias, é essencialmente bacteriostática e, na cura das infecções bacterianas intervém, geralmente, a atividade fagocitária dos leucócitos.

Se, à semelhança do que acontece com as bactérias sensíveis, a penicilina age essencialmente inibindo o desenvolvimento do *Treponema pallidum*, ocorre a possibilidade de os espiroquetas da sífilis ficarem em "estado de latência" durante certo tempo. Nestas condições, os pacientes cujas lesões primárias foram curadas podem continuar a ser portadores do *Treponema* que possivelmente, se encontra em localização mais profunda no interior de órgãos e até mesmo nas meninges.

Diante destas possibilidades, é recomendável que se use em todo tratamento de sífilis, pela penicilina, doses elevadas, particularmente as iniciais, a fim de se evitar o desenvolvimento de resistência do espiroqueta, por adaptação à penicilina.

Queremos lembrar, ainda, que FRAIZIER¹⁰⁸ acha que há variantes do *Treponema pallidum* mais resistentes que outras.

LUÍS DE SALLES GOMES¹¹⁸, do Instituto Adolfo Lutz, tem observação recentíssima de aplicação de penicilina, em alta dosagem, em paciente de *tabes dorsalis*, com a avançada idade de 78 anos. A administração foi feita, simultâneamente, no músculo e na raque, sendo que, só no canal raqueano foram injetadas 297.500 Unidades Oxford, em período de 7 dias, alcançando a última das aplicações intrarraqueanas diárias a dose de 82.500 unidades.

Segundo dados que gentilmente nos forneceu o citado colega, o paciente apresentou melhoras consideráveis (avaliadas em 75%) das dores fulgurantes, de que, ininterruptamente, vinha padecendo durante 6 meses; além disso, houve restabelecimento do contrôlo vesical, o qual, dias antes do início do tratamento, havia sido perdido pela instalação de paresia incipiente esfíncter da bexiga. Houve volta dos reflexos cutâneo-plantares e de ligeira reação pupilar à luz, ambos ausentes antes do tratamento. O exame do líquido cefalorraquidiano revelou acentuadas melhoras tanto citológicas como nas reações globulínicas (Pandy, Weichbrodt), na de Takata Ara, no teor de albumina e na reação do benjoim coloidal, especialmente na sua zona intermediária ou parenquimatosa. O exame de sangue revelou ligeira diminuição na positividade (Reação de Wassermann e de Kahn). Essa interessantíssima observação de penicilinterapia na tabes parece a primeira realizada entre nós.

Nelson e Duncan* obtiveram resultados ótimos, sob o ponto de vista clínico e de laboratório, em 10 pacientes com meningite sífilítica aguda, tratados com penicilina administrada apenas pela via intramuscular. Julgam que o uso da via intratecal é desnecessário, considerando que, na neurosífilis não ha razão para se acreditar que a ação de um agente quimioterápico dependa, necessariamente, de sua capacidade de penetração no líquido cefalorraquidiano, porém, de sua penetrabilidade nos tecidos lesados (meninges, vasos, parenquima). Verificaram que a penicilina, embora não apareça no líquido cefalorraquidiano, mesmo após administração intramuscular freqüente, é ativa na meningite sífilítica aguda quando administrada por via intramuscular. Recomendam a dose total de 2.000.000 a 3.000.000 de Unidades Oxford de penicilina administrada cada 3 ou 4 horas, dia e noite, durante período de 8-16 dias.

ROCHA²⁵³ fez tratamento combinado de penicilina + arsenóxido, em 4 pacientes com sífilis recente. O tratamento durou 7 dias e meio e obedeceu ao seguinte esquema: penicilina sódica, dose única de 5.000 Unidades Oxford, por via intramuscular, com intervalo de 3 horas, perfazendo a dose total de 300.000 unidades (60 injeções); arsenóxido, uma injeção diária de "Arsenox" de 0,04 gr., sendo a dose total de 320 miligramas. Com essa interessante terapêutica combinada, obteve cura clínica e sorológica

(*) NELSON, R. A. e DUNCAN, L. — 1944 — Acute syphilitic meningitis treated with penicillin. Bull. Johns Hopkins Hosp., 75: 327-352.

nos 4 pacientes tratados. Estes resultados confirmam as observações de Moore, Mahoney, Schwartz, Sternberg e Wood, citados por esse autor, os quais em reunião da Secção de Dermatologia e Sifilologia da "American Medical Association" apresentaram relatório sobre 1.418 casos observados.

RAIZISS²²⁸ fez interessantes estudos sobre o tratamento da sífilis com penicilina em veículo oleoso. Tratou coelhos, que tinham sido inoculados intratesticularmente, com *Treponema pallidum*, com penicilina suspensa em óleo. Um coelho sífilítico recebeu 2 doses diárias de 2.500 Unidades Oxford, por quilo de peso, de penicilina em solução aquosa, durante 8 dias consecutivos, num total de 40.000 unidades. Os testículos apresentaram espiroquetas até o 14.º dia e a cura completa das lesões ocorreu no fim do 42.º dia. 2 outros coelhos infectados receberam 1 dose diária de 5.000 unidades, por quilo, de penicilina em óleo, durante 8 dias consecutivos, num total de 40.000 unidades. Em ambos as lesões testiculares tornaram-se negativas para espiroquetas em menos de 10 dias e os testículos mostraram-se normais no fim de 35 dias.

A superioridade da suspensão em óleo, lembra a possível vantagem de se fazer a terapêutica da sífilis pela penicilina neste veículo, pelo fato de se reduzir a uma o número de injeções diárias intramusculares.

TERAPÊUTICA DAS MOLÉSTIAS POR VÍRUS

Dada a importância do assunto e falta de recursos terapêuticos para a cura de certas infecções produzidas por vírus, faremos aqui algumas considerações sobre o que tem sido observado.

Entre nós, LINHARES¹⁷¹ fez provas, tanto "in vivo" como "in vitro", a respeito da ação de filtrados de culturas de alguns cogumelos sobre o vírus da febre amarela. Semeou em caldo simples de cultura ou água peptonada com 2% de extrato de carne, 3 culturas de cogumelos (*Aspergillus flavus*, *Penicillium camemberti* e *Actinomyces sp.*) e obteve filtrados que continham agentes virulicidas com atividade, tanto "in vitro" como "in vivo", sobre o vírus amarelho neurotrópico. Estes agentes "virulicidas" apareciam no meio de cultura durante a segunda semana de incubação em temperatura ambiente. Os meios filtrados em Seitz EK perdiam a atividade quando aquecidos a 100°C. por 10 minutos ou a 90°C. durante 30 minutos. Conservaram-se, porém, ativos quando aquecidos a 75°C. durante 30 minutos ou 56°C. por 1 hora.

HEILMAN e HERREL¹³² fizeram provas de proteção pela penicilina, em camundongos inoculados por via intracerebral com vírus da ornitosis. A penicilina administrada logo após a inoculação do vírus prolongou a vida dos animais, porém todos morreram.

Noutra série de experiências usaram 80 camundongos jovens que receberam inoculação intraperitonal do vírus. 40 foram tratados com penicilina, os outros serviram de contrôlo. Dos 40 que só receberam inoculação do vírus da ornitosis, 35 morreram, ao passo que, dos 40 tratados com penicilina, morreram apenas 2.

LINHARES¹⁷¹, considerando as íntimas relações entre os vírus da ornitosis e da psitacosis lembra que a penicilina talvez exerça ação terapêutica favorável nas infecções humanas por vírus.

Algumas experiências de tratamentos do tracoma pela penicilina foram publicadas, recentemente, por GILFORD¹¹⁵. Obteve ótimos resultados em 2 casos de tracoma, após 3 dias de tratamento local que consistiu em instilar, cada 3 horas, gôtas de solução de penicilina contendo 16.000 unidades por cm³. Dois outros pacientes que serviram de contrôlo, receberam o tratamento comum: sulfatiazol (25 grs.) e instilações oculares com gôtas de solução de oxícloreto de mercúrio a 1:1.000 e sulfato de cobre a 1:1.000 cada 4 horas. Após 3 dias com êsse tratamento, os dois apresentavam a conjuntiva inflamada e a fotofobia não diminuiria. Êstes sintomas desapareceram rapidamente com o uso subsequente de penicilina, empregada do mesmo modo que nos dois primeiros casos. A cura clínica rápida dêsses quatro pacientes lembra a possibilidade de ação específica sobre o vírus do tracoma, além da ação conhecida sobre os agentes bacterianos das infecções conjuntivais secundárias.

Demonstrando-se por maior número de experiências a atividade da penicilina contra o vírus do tracoma, pode-se esperar resultados terapêuticos melhores, fazendo-se, além da aplicação local, tratamento sistêmico pela penicilina.

INDICAÇÕES E CONTRA-INDICAÇÕES DA PENICILINOTERAPIA

Quanto às indicações e contra-indicações do uso da penicilina, além do que vimos ao estudarmos a terapêutica dos diversos grupos de infecção, pouco se tem a acrescentar ao interessante relatório publicado em 1 de maio de 1944 (*) pelo Serviço de Distribuição de

(*) Distribuído pelo Departamento Médico de E. R. Squibb & Sons, New York.

Penicilina para Uso Civil, da Junta de Produção de Guerra (War Production Board), dos Estados Unidos.

Esse relatório, preparado pelo Dr. Chester S. Keefer, presidente do "Committee on Chemotherapeutic and Others Agents, Division of Medical Sciences National Research Council", encerra as bases da penicilinaterapia atual. Seu texto é o seguinte:

"A experiência adquirida durante o ano passado em matéria de terapêutica pela penicilina, mostrou que essa substância é o melhor agente terapêutico existente para o tratamento de determinadas entidades mórbidas, de acôrdo com os seguintes dados:

GRUPO I — INDICAÇÕES

1 — Tôdas as infecções estafilocócicas com ou sem bacteriemia:

Osteomielite aguda
Abscesso dos tecidos moles
Meningite
Trombose dos seios lateral e cavernoso
Pneumonia-empiema
Abscesso de rim
Infecção de feridas

2 — Todos os casos de infecção por Clostridium:

Gangrena gasosa
Edema maligno

3 — Tôdas as infecções por estreptococos hemolíticos, com bacteriemia e tôdas as infecções locais sérias:

Celulite
Mastoidite com complicaçõe intracranianas,
Pneumonia-empiema
Septicemia puerperal
Peritonite

4 — Tôdas as infecções por estreptococos anaeróbios:

Septicemia puerperal

5 — Tôdas as infecções pneumocócicas de

Meninges
Pleura
Endocárdio
Todos os casos sulfonamido-resistentes de pneumonia pneumocócica.

6 — Tôdas as infecções gonocócicas complicadas por:

- Artrites
- Oftalmia
- Endocardite
- Peritonite
- Epididimite
- Também todos os casos sulfonamido-resistentes de gonorréia.

GRUPO II — INDICAÇÕES.

Também se verificou que a penicilina é agente terapêutico eficaz nas seguintes doenças, em cujo tratamento, entretanto, sua posição não está definitivamente estabelecida:

- 1 — Sífilis
- 2 — Actinomicose
- 3 — Endocardite bacteriana

GRUPO III — CONDIÇÕES EM QUE O VALOR TERAPÊUTICO É DUVIDOSO

A penicilina é de valor terapêutico duvidosa nas infecções mistas do peritônio e do fígado, em que o microrganismo predominante é Gram-negativo, isto é:

- 1 — Ruptura do apêndice
- 2 — Abscesso de fígado
- 3 — Infecções das vias urinárias
- 4 — Também é de terapêutica duvidosa na febre da dentada de rato, produzida pelo *Streptobacillus moniliformis*.

GRUPO IV — CONTRA-INDICAÇÕES.

A penicilina é contra-indicada por ser ineficaz, nos seguintes casos:

- 1 — Tôdas as infecções por bacilos Gram-negativos:
 - Febres tifóide e paratifóides
 - Disenteria
 - Escherichia coli*
 - Haemophilus influenzae*
 - Bacillus proteus*
 - Bacillus pyocyaneus*
 - Brucella melitensis* (febre ondulante)
 - Tularemia
- 2 — Tuberculose
- 3 — Toxoplasmose
- 4 — Histoplasmose

- 5 — Febre reumática aguda
- 6 — Lupus eritematoso difuso
- 7 — Mononucleose infecciosa
- 8 — Pênfigo
- 9 — Doença de Hodgkin
- 10 — Leucemia aguda ou crônica
- 11 — Colite ulcerosa
- 12 — Granulomatose coccidiídica
- 13 — Malária
- 14 — Poliomielite
- 15 — Blastomicose
- 16 — Irite e uveíte não específicas.
- 17 — Monilioses (blastosporoses).

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PENICILINA

A penicilina é fornecida em ampôlas de diferentes capacidades — 25.000 e 100.000 unidades cada uma. Uma vez que é extremamente solúvel, pode ser dissolvida em pequenas quantidades de água destilada estéril livre de substâncias pirogênicas ou, então, em solução fisiológica. Nos hospitais, quando se usam ampôlas de maior número de unidades, seu conteúdo deve ser diluído de modo a se obter concentração final de 5.000 unidades por centímetro cúbico. Essa solução deve ser guardada com as necessárias precauções de assepsia, em geladeira, nova solução devendo ser preparada todos os dias. As soluções para uso local ou parenteral podem ser ainda mais diluídas, conforme a concentração desejada.

PARA INJEÇÃO ENDOVENOSA

1 — O pó seco pode ser dissolvido em solução salina fisiológica estéril em concentrações de 1.000 a 5.000 unidades por cm^3 , para injeção endovenosa direta com seringa.

2 — O pó seco pode ser dissolvido em solução salina estéril ou em solução a 5% de glicose, em concentração menor (25 a 50 unidades por cm^3) para injeção endovenosa contínua.

PARA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR

1 — O volume total de cada injeção deve ser pequeno, isto é, 5.000 por cm^3 de solução salina fisiológica.

PARA APLICAÇÃO TÓPICA

1 — O sal sódico, sob a forma de pó, é irritante para a superfície das feridas e não deve ser empregado.

2 — A diluição em solução salina fisiológica na concentração de 250 unidades por cm^3 dá resultado satisfatório. Para os casos de infecção resistente ou mais intensa, essa concentração pode ser elevada a 500 unidades por cm^3 .

POSOLOGIA

MODO DE EMPRÊGO DA PENICILINA

Há tres métodos de emprêgo da penicilina — endovenoso, intramuscular e tópico. As injeções subcutâneas podem ser dolorosas e devem ser evitadas.

Injeções intramusculares repetidas podem ser menos toleradas que endovenosas repetidas ou contínuas. Em muitos casos, entretanto, a via intramuscular pode ser a de escolha.

No tratamento de meningite, empiema e queimaduras superficiais de extensão limitada, deve ser feita a aplicação tópica, da penicilina, injetando-a diretamente no espaço subaracnóideo ou na cavidade pleural, ou, então aplicando-a localmente, sendo usada solução contendo 250 unidades por cm^3 .

DOSAGEM

A dosagem da penicilina deverá variar de paciente a paciente, conforme o tipo e a gravidade da infecção. Segundo nossa experiência, a cura foi conseguida em muitos casos sérios de infecção após emprêgo de 40.000 a 50.000 Unidades Oxford por dia, em outros 100.000 a 120.000 unidades ou mesmo mais, tendo sido necessárias. O objetivo em todos os casos é de dominar a infecção tão rapidamente quanto possível. As recomendações que se seguem são feitas agora com perfeita compreensão de que, à medida que se fôr acumulando experiência, poderão ser necessárias alterações.

Será bom recordar que a penicilina é rapidamente excretada pela urina, de modo que é muitas vezes impossível encontrá-la no sangue, por período superior a 2 ou 4 horas, após uma única injeção. Por isso, é conveniente empregá-la, em injeções intramusculares ou endovenosas repetidas, com intervalos de 3 ou 4 horas ou usá-la em injeção endovenosa contínua.

Nos casos de infecção séria com ou sem bacteriemia, uma dose inicial de 15.000 ou 20.000 Unidades Oxford, com doses subsequentes sob a forma de:

1 — Injeção endovenosa contínua de solução salina fisiológica contendo penicilina em concentração tal que se empreguem de 2.000 a 5.000 Unidade Oxford por hora, perfazendo total de 48.000 a 120.000 unidades, em período de 24 horas. Metade da dose total diária poderá ser dissolvida em um litro de solução salina fisiológica e injetada, na proporção de 30 a 40 gôtas por minuto.

2 — Se a injeção endovenosa contínua não fôr aconselhável, poder-se-á injetar de 10.000 a 20.000 unidades, por via intramuscular, de 3 em 3 ou de 4 em 4 horas.

3 — Quando a temperatura tiver voltado ao normal, poder-se-á interromper o emprêgo da penicilina, acompanhando cuidadosamente a marcha da moléstia.

Nos casos de lesões cronicamente infectadas de osteomielite, etc., o esquema de dosagem deverá ser de 5.000 unidades, com intervalos de 2 horas, ou de 10.000 com intervalos de 4 horas, por via parenteral, fazendo-se ao mesmo tempo o tratamento local que o caso indicar. Poderá ser necessário aumentar as doses indicadas, neste esquema, dependendo isso da gravidade da infecção e do resultado do tratamento.

Gonorréia sulfonamido-resistente

10.000 unidades de 3 em 3 horas, por via intramuscular ou endovenosa, usando 10 doses. É provável que se obtenha o mesmo resultado empregando 20.000 unidades, de 3 em 3 horas, usando 5 doses. A dosagem mínima ainda não pôde ser estabelecida com exatidão. Os resultados do tratamento devem ser controlados pela cultura da secreção.

Empiema.

Dever-se-á injetar a penicilina diluída em solução salina fisiológica, diretamente na cavidade do empiema, após aspiração do líquido purulento ou não. É necessário fazer isso uma a duas vezes por dia, usando 30.000 a 40.000 unidades, conforme o volume da cavidade, o tipo de infecção e o número de microrganismos. Não se deverá empregar soluções de penicilina para irrigação. São necessárias, no mínimo, 6 a 8 horas para efeito máximo da penicilina.

Meningite.

A penicilina não penetra em quantidades apreciáveis no espaço subaracnóideo, de modo que é necessário injetar a penicilina

no espaço subaracnóideo ou na cisterna, para que se produza o efeito desejado. 10.000 unidades diluídas em solução salina fisiológica, na concentração de 1.000 unidades por cm^3 , deverão ser injetadas uma a duas vezes por dia, dependendo da marcha clínica e da presença de microrganismos.

Os esquemas de dosagem acima indicados podem exigir alterações à medida que maior experiência fôr adquirida. Em muitos casos estudados por investigadores competentes, os esquemas acima se mostraram adequados.”

REFERÊNCIAS

1. ABRAMAM, E. P. e CHAIN, E. — 1940 — An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146: 837.
2. ABRAHAM, E. P. — 1941 — Mode of action of chemotherapeutic agents. *Lancet*, 2: 762.
3. ABRAHAM, E. P. e OUTROS — 1941 — Further observations on penicillin. *Lancet*, 2: 177-188.
4. ABRAHAM, E. P. e CHAIN, E. — 1942 — Purification of penicillin. *Nature*, 149: 328.
5. ABRAHAM, E. P., e OUTROS — 1942 — Nitrogenous character of penicillin. *Nature*, 149: 356.
6. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. e HOLIDAY, E. R. — Purification and some physical and chemical properties of penicillin. *Brit. J. Exp. Path.*, 23: 103-115.
7. ABRAHAM, E. P. e OUTROS — 1943 — Penicillamine, a characteristic degradation product of penicillin. *Nature*, 151: 107.
8. AIDAR, O. e MIGNONE, C. — 1945 — Efeitos da penicilina sobre a regeneração de nervos. *Arq. Neuro-psiquiat.*, 3: 246-248.
9. ALGODOAL, F. C. — 1944 — Penicilina. *Rev. Clínica de S. Paulo*, 15: 103-106.
10. ANSLOW, N. K. e RAISTRICK, H. — 1938 — The biochemistry of microorganisms. *Bioch. J.*, 32: 687, 803, 2288.
11. ARAGÃO, R. M. — 1944 — Penicilina — Estudo terapêutico. *Resenha Médica (Rio de Janeiro)*, 11: 3-32.
12. ASHCAR, H. — 1942 — Contribuição ao estudo morfo-biológico do *Penicillium notatum*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (São Paulo)*, 2: 309-325.
13. ATKINSON, N. — 1943 — Antibacterial substances produced by moulds. The detection and estimation of antibacterial activity *in vitro*. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 21: 127-131.
14. ATKINSON, N. — 1942 — Antibacterial substances produced by moulds. I. Penicillin, a product of the growth of a penicillium. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 20: 287-288.
15. ATKINSON, N. — 1943 — Antibacterial substances produced by moulds. 2. The antibacterial substances produced by some common penicillia. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 21: 15-16.
16. AUGUSTINE, D. L., WEINMAN, D. e MCALISTER, J. — 1944 — Rapid and sterilizing effect of penicillin sodium in experimental relapsing fever infection and its ineffectiveness in the treatment of trypanosomiasis (*trypanosoma lewisi*) and Toxoplasmosis. *Science*, 94: 19-29.
17. AZULAY, R. D. — 1944 — Penicilina — A grande arma terapêutica moderna. *Hospital*, 25: 163-175.

18. BAKER, G. E. — 1944 — Nuclear behavior in relation to culture methods of *Penicillium notatum* Westling. *Science*, **99**: 436.
19. BARGER, G. e DORRER, O. — 1934 — Chemical properties of puberulic acid, $C_8H_6O_6$, and a yellow acid $C_8H_4O_6$. *Biochem. J.*, **28**: 11.
20. BARKER, L. T. — 1943 — Gradenigo syndrome complicated by pneumococic meningitis; recovery after intensive treatment with penicillin and sulfadiazine. *Am. J. Med. Sci.*, **206**: 701-703.
21. BERGEL, F. e OUTROS — 1943 — An antibacterial substance from *Aspergillus clavatus* and *Penicillium claviforme* and its probable identity with patulin. *Nature*, **152**: 750.
22. BERGER, F. M. — 1944 — Extration and purification of penicillin. *Nature*, **154**: 59.
23. BEYER, K. H. e OUTROS — 1944 — The prolongation of penicillin retention in the body by means of para-aminohypuric acid. *Science*, **100**: 107-108.
24. BIER, O. — 1944 — Noções básicas de imunoterapia e quimioterapia antibacteriana. Ed. Melhoramentos. S. Paulo, Brasil.
25. BIGGER, J. W. — 1944 — Synergic action of penicillin and sulfonamides. *Lancet*, **2**: 142-145.
26. BIRKINSHAW, J. H. e RAISTRICK, H. — 1943 — Notatin: an antibacterial glucose aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling. *J. Biol. Chem.*, **148**: 459-460.
27. BIRKINSHAW, J. B., CHAMBERS, A. R. e RAISTRICK, H. — 1942 — Studies in the biochemistry of micro-organisms. Stipitatic acid $C_8H_6O_5$, a metabolic of *Penicillium stipitatum* Thom. *Biochem. J.*, **36**: 242.
28. BLAKE, F. G. — 1945 — The therapeutic indications of the sulfonamides and penicillin. *J. Am. Med. Ass.*, **127**: 517-518.
29. BLAKE, F. G. e CRAIGE, B. Jr. — 1943 — Penicillin in suppurative disease of the lungs; report of 3 cases. *Yale J. Biol. Med.*, **15**: 507.
30. BLOOMFIELD, A. L., RANTZ, L. A. e KIRBY, W. M. M. — 1944 — The clinical use of penicillin. *J. Am. Med. Ass.*, **124**: 627-633.
31. BODENHAN, D. C. — 1943 — Infected burns and surface wounds; the value of penicillin. *Lancet*, **2**: 725-728.
32. BODENHAN, D. C. — 1943 — Use of penicillin in wound infectious. *Lancet*, **2**: 639.
33. BORNSTEIN, — 1940 — Action of penicillin on enterococci and other streptococci. *J. Bact.*, **39**: 383-387.
34. BULMER, E. O. B. E. — 1945 — Weil's disease in Normandy; its treatment with penicillin. *Brit. Med. J.*, **1**: 113-115.
35. BUSH, M. T. e GOTH, A. — 1943 — Flavicin: An antibacterial substance produced by an *Aspergillus flavus*. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **78**: 164-169.
36. BUXBAUM, L. e FIEGOLI, N. G. — 1943 — Penicillin — Its use in media for the isolation of *H. influenzae* from laryngeal cultures in obstructive laringitis.
37. CALLAHAM, J. R. — 1944 — Producción de penicilina en gran escala. *El Farmaceutico*, **20**: 47-50 e 72.
38. CAMERON, A. J. — 1945 — Penicillin in ophthalmic therapeutics. *Brit. Med. J.*, **1**: 222.

39. CARRACHER, A. E. — 1945 — A case of Weil's disease treated with penicillin. *Brit. Med. J.*, 1: 119.
40. CAMPBELL, D. A. e PRESSMAN, D. — 1944 — A simplified lyophil apparatus. *Science*, 99: 285-286.
41. CAMPOS, J. A. — A leishmania, em face da penicilina, "in vitro". (Trabalho apresentado à Secção de Dermatologia e Sifilografia, da Associação Paulista de Medicina, aos 12 de junho de 1945).
42. CATCH, J. R., COOK, A. H. e HELBRON, I. M. — 1942 — Purification and chemistry of penicillin. *Nature*, 150: 633-634.
43. CAVALLITO, C. J., BUCK, J. S. e SUTER, C. M. — 1944 — Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.*, 66: 1950-1951.
44. CHAIN, E. — 1941 — Mode of action of chemotherapeutic agents. *Lancet*, 2: 762.
45. CHAIN, E. — 1941 — Mode of action of chemotherapeutic agents (Discussion) — *Nature*, 148: 758 e *Biochem. J.* 36: 4-5.
46. CHAIN, E. e OUTROS — 1943 — Helvolic acid, an antibiotic produced by *Aspergillus fumigatus*, mut. *helvola* Yuill. *Brit. J. Exp. Path.*, 24: 108-119.
47. CHAIN, E., FLOREY, H. W. e JENNINS, M. A. — 1942 — An antibacterial substance produced by *Penicillium claviforme*. *Brit. J. Exp. Path.*, 23: 202-205.
48. CHAIN, E. e OUTROS — 1940 — Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, 239: 226-236.
49. CHALLINOR, S. W. — 1924 — Production of penicillin. *Nature*, 150: 688.
50. CHALLINOR, S. W. e MAC NAUGHTAN, — 1943 — The production of penicillin. *J. Path. Bact.*, 55: 441-446.
51. CHARNEY, J., ALBURN, H. E. e BERNHART, F. W. — 1945 — Urinary excretion of penicillin in man after oral administration with gastric antiacids. *Science*, 101: 251-252.
52. CHOLDEN, L. S. — 1944 — A simplified technique for the agar cup assay of penicillin. *J. Bact.*, 47: 402-403.
53. CHOW, B. F. e MAC KEE, C. M. — 1945 — Interaction between crystalline penicillin and human plasma proteins. *Science*, 101: 67-68.
54. CHRISTIE, R. V. — 1943 — Penicillin therapy. *Brit. Med. J.*, 2: 655-656.
55. CLARK, A. M. e OUTROS — 1943 — Penicillin and propamide in burns. Elimination of haemolytic streptococci and staphylococci. *Lancet*, 1: 606-609.
56. CLIFTON, C. E. — 1943 — Large scale production of penicillin. *Science*, 98: 69.
57. CLUTTERBUCK, P. W., LOVELL, R. e RAISTRICK, H. — 1932 — Studies in the biochemistry of microorganisms. XXVI. The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, and alkali-soluble protein and penicillin — the antibacterial substance of Fleming. *Biochem. J.*, 26: 1907-1918.
58. COHN, A. e SELJO, I. H. — 1944 — The "in vitro" effect of penicillin on sulfonamide susceptible strains of gonococci. *J. Am. Med. Ass.*, 124: 1125.

59. COHN, A. e SELJO, I. H. — 1943 — Further observations on the correlation between clinical and "in vitro" reaction of gonococcus strains to sulfathiazole. *Am. J. Syphl.* 27: 301.
60. COHN, A., STUDDIFORD, W. E. e GRUNSTEIN, I. — 1944 — Penicillin treatment of sulfonamide resistant gonococci infection in female patients. *J. Am. Med. Ass.*, 124: 1124-1125.
61. CONN, H. J. e CONN, J. E. — 1940 — The stimulating effect of colloids upon the growth of certain bacteria. *J. Bact.*, 39: 99.
62. COOK, A. H. e LACEY, M. S. — 1944 — An antibiotic from *Aspergillus parasiticus*. *Nature*, 153: 460.
73. COOK, E. N., POOL, T. L. e HERREL, W. E. — 1943 — Further observations on penicillin in sulfonamide resistant gonorrhoea. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, 18: 433-437.
64. COOK, R. P. e TULLOCK, W. J. — 1944 — The production of penicillin on media made from vegetable extracts, particularly extracts of pea. *J. Path. Bact.*, 56: 555-556.
65. COOKE, J. V. e GOLDRING, D. — 1945 — The concentration of penicillin in various body fluids during penicillin therapy. *J. Am. Med. Ass.*, 127: 80-87.
66. CORNMAN, I. — 1944 — Survival of normal cells in penicillin solutions lethal to malignant cells. *Science*, 99: 247.
67. COULTHARD, C. E. e OUTROS — 1942 — Notatin: an antibacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling. *Nature*, 150: 634-635.
68. CRADDOCK, S. — 1942 — Use of penicillin in cultivation of the acne bacillus. *Lancet*, 242: 558.
69. CUNHA, A. M. e OUTROS — 1944 — Ensaios terapêuticos com penicilina. I. Boubá (Framboesia, Pian, Yaws) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 40: 195-200 e 41: 247-255.
70. CUTLER, E. C. — 1943 — Penicillin in fractures and after amputation. *Lancet*, 2: 639.
71. DAWSON, M. H. e HOEBY, G. L. — 1944 — The clinical use of penicillin: Observation one hundred cases. *J. Am. Med. Ass.*, 124: 611-622.
72. DAWSON, M. H. e HUNTER, T. H. — 1945 — The treatment of subacute bacterial endocarditis with penicillin. *J. Am. Med. Ass.*, 127: 129-137.
73. DUBOS, R. J. — 1939 — Bactericidal effect of an extract of a soil bacillus on Gram-positive cocci. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 40: 311.
74. DUFFIN, W. M. e SMITH, S. — 1943 — Penicillic acid, and optically active acid from penicillin. *Nature*, 151: 251.
75. DUNHAM, W. B. e OUTROS — 1942 — Action of penicillin and other antibiotics on *Treponema pallidum*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55: 158.
76. DUTCHER, J. D. — 1941 — The chemical nature of gliotoxin: a microbial compound produced by the fungus *Gliocladium fimbriatum*. *J. Bact.*, 42: 815.
77. Editorial — 1943 — Penicillin and other antibiotics produced by microorganisms. An annotated bibliography. E. R. Equibb & Sons, New York.

78. Editorial — 1944 — Penicillin and the present-day concept of its clinical applicability. Commercial Solvents Corporation, New York.
79. Editorial — 1944 — A review of the present information concerning penicillin. Abbott Research Laboratories. North Chicago, Illinois.
80. EMMERICH, R. — 1900 — Ueber die morphologischen Veränderungen der Milzbrand-bacillen bei ihrer Auflösung durch Pyocyanase. *Zentralbl. f. Bakt.*, 27: 776.
81. ERCOLI, N. e LAFFERTY, L. C. — 1944 — The anti-spirochetal activity of penicillin in experimental infections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57: 4-6.
82. EWART, A. J. — 1944 — The presence of citrinin in *Crotalia crispata*. *Ann. Botany*, 47: 913.
83. FILDES, P. — 1940 — A rational approach to research in chemotherapy. *Lancet*, 1: 955-957.
84. FINDLAY, G. M. — 1941 — Mode of action of chemotherapeutic agents. *Lancet*, 2: 761.
85. FINDLAY, G. M., HILL, H. R. e MAC PHERSON, A. — 1944 — Penicillin in yaws and tropical ulcer. *Nature*, 154: 795-796.
86. FISCHER, A. N. — 1943 — The antibacterial properties crude penicillin. *Bull. John Hopkins Hosp.*, 75: 303-373.
87. FISK, A. T., FOORD, A. G. e ALLES, G. — 1945 — Prolongation of penicillin activity by means of adrenalin. *Science*, 101: 124-125.
88. FLEMING, A. — 1929 — On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Path.*, 129: 226-236.
89. FLEMING, A. — 1932 — On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. *J. Path. Bact.*, 35: 833-842.
90. FLEMING, A. — 1942 — A simple method of using penicillin, tellurite, and gentian violet for differential culture. *Brit. Med. J.*, 1: 547-548.
91. FLEMING, A. — 1942 — In vitro tests of penicillin potency. *Lancet*, 1: 732-733.
92. FLEMING, A. — 1944 — Penicillin for selective culture and for demonstrating bacterial inhibitions. *Brit. Med. Bull.*, 2: 7-8.
93. FLEMING, A. e ALLISON, V. D. — 1922 — Bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. *Brit. J. Exp. Path.*, 3: 252-260.
94. FLOREY, H. W. — 1944 — Penicillin: development for medical uses. *Nature*, 153: 40-42.
95. FLOREY, M. E. e FLOREY, W. W. — 1943 — General and local administration of penicillin. *Lancet*, 1: 387-397.
96. FLOREY e OUTROS — 1944 — Penicillin antibiotics from various species of moulds. *Nature*, 154: 268.
97. FLOREY, H. W. e JENNINGS, M. A. — 1942 — Some biological properties of highly purified penicillin. *Brit. J. Exp. Path.*, 23: 120-123.
98. FLOREY, M. e WILLIAMS, E. O. — 1944 — Hand infections treated with penicillin. *Lancet*, 1: 73-81.

99. FLOSDORF, E. W. e MUDD, S. — 1935 — Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" form of serum and other biological substances. *J. Immunol.*, 29: 389-425.
100. FLOSDORF, E. W. — 1945 — Dryng penicillin by sublimation. *Brit. Med. J.*, 1: 216-218.
101. FOLEY, E. J., EPSTEIN, J. A. e LEE, S. W. — 1944 — Effectiveness of penicillin on *Listerella*. *J. Bact.*, 47: 110-111.
102. FOSTER, J. W. — 1942 — Quantitative estimation of penicillin. *J. Biol. Chem.*, 144: 285-286.
103. FOSTER, J. W. e WILKER, B. L. — 1943 — Microbiological aspects of penicillin. II. Turbidimetric studies on penicillin inhibition. *J. Bact.*, 46: 377-389.
104. FOSTER, J. W. e WOODRUFF, H. B. — 1943 — Improvements in cup assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, 148: 723.
105. FOSTER, J. W. e WOODRUFF, H. B. — 1943 — Microbiological aspects of penicillin. I. Methods of assay. *J. Bact.*, 46: 187-202.
106. FOSTER, J. W., WOODRUFF, H. B. e MC DANIEL, L. E. — 1943 — Microbiological aspects of penicillin. III. Production of penicillin in surface cultures of *Penicillium notatum*. *J. Bact.*, 46: 421-433.
107. FOSTER, J. W. e WOODRUFF, H. B. — 1944 — Microbiological aspects of penicillin. VI. Procedure for the cup assay for penicillin. *J. Bact.*, 47: 43-58.
108. FRAZIER, C. N. — 1944 — Microbial adaptation to penicillin. *Texas Reports Biol. Med.*, 2: 385-396.
109. FREE, A. H. e OUTROS — 1944 — The urinary excretion of penicillin after oral administration to normal human subjects. *Science*, 100: 431-432.
110. FRIEDEN, E. H. — 1945 — The diffusion constant of penicillin. *Science*, 101: 21.
111. FURTADO, A. R. — 1944 — Atividade antibacteriana do *Aspergillus flavus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41: 45-57.
112. GARDNER, A. D. — 1940 — Morphological affects of penicillin on bacteria. *Nature*, 146: 837-838.
113. GARROD, L. P. — 1944 — Penicillin — Its properties and powers as a therapeutic agent. *Brit. Med. Bull.*, 2: 2.
114. GARROD, L. P. — 1945 — The action of penicillin on bacteria. *Brit. Med. J.*, 1: 107-110.
115. GILFORD, G. H. — 1945 — Treatment of trachoma with penicillin. *Brit. Med. J.*, 1: 232.
116. GLISTER, G. A. — 1941 — A new antibacterial agent produced by a mold. *Nature*, 148: 470.
117. GOLD, M. J. — 1945 — Impetigo treated with sodium penicillin cream. *Brit. Med. J.*, 1: 152-153.
118. GOMES, L. S. — 1945 — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 5: (1).
119. GREENBLATT, R. B. e STREET, A. B. — 1944 — Penicillin for the treatment of chemoresistant gonorrhoea in the female. *J. Am. Med. Ass.*, 126: 161.

120. GRIFFEY, W. P. — 1944 — Penicillin in treatment of gonorrhoea conjunctivitis; report of a case. *Arch. Ophth.*, **31**: 162.
121. GUDIN, M. e NEIVA, A. F. — 1944 — Tratamento da osteomielite por assepsia integral e penicilina intra-arterial. Sutura primitiva e secundária da ferida. *Mem. Inst. Osvaldo Cruz*, **41**: 163-166.
122. GUIMARÃES, N. F. — 1945 — Boubá (“framboesia, pian, yaws”) tratamento pela penicilina das lesões terciárias; ulcerações gomosas, periostites, osteites, áreas de rarefação óssea e gangoza (“Rhino-pharyngitis mutilans”) (Nota prévia) *Brasil Médico*, **59**: 89-91.
123. GYORGY, P. e ELMES, P. C. — 1944 — Experiments on the toxicity of the calcium salt of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**: 76-77.
124. HAG, L. R. e HUBERT, A. C. — 1943 — Penicillin in treatment of experimental *Clostridium welchii* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **53**: 61-62.
125. HAMRE, D. N. e OUTROS — 1943 — The toxicity of penicillin as prepared for clinical use. *Am J. Med. Sci.*, **206**: 642-652.
126. HANSEN, H. N. e SYNDER, W. C. — 1944 — Relation of dual phenomenon in *Penicillium notatum* to penicillin production. *Science* **99**: 264-265.
127. HARFORD, C. G. e OUTROS — 1945 — Treatment of staphylococci, pneumococci, gonococci and other infections with penicillin. *J. Am. Med. Ass.*, **127**: 253-259.
128. HARPER, G. J. — 1943 — Inhibition of penicillin in routine culture media. *Lancet*, **2**: 569-571.
129. HEILMAN, D. e HERRELL, W. E. — 1942 — Comparative bacteriostatic activity of penicillin and gramicidin. *J. Bact.*, **43**: 12-13.
130. HEILMAN, D. e HERRELL, W. E. — 1942 — Comparative activity of penicillin and gramicidin: tissue culture studies. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, **17**: 321-327.
131. HEILMAN, D. e HERRELL, W. E. — 1943 — Penicillin in the treatment of experimental relapsing fever. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, **18**: 457-467.
132. HEILMAN, F. R. e HERRELL, W. E. — 1944 — Penicillin in the treatment of experimental ornithosis. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, **19**: 57-65.
133. HERBST, R. H. e MERRICKS, J. W. — 1945 — *Staphylococcus albus* — Septicemia. Following nephrolithomy. *J. Am. Med. Ass.*, **127**: 518-519.
134. HERRELL, W. E. e NICHOLS, D. R. — 1944 — Penicillin in treatment of cellulitis of mouth. *Am. J. Orthodon. e Oral Surg.*, **30**: 1.
135. HERRELL, W. E. — 1943 — Further observation on the clinical use of penicillin. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, **18**: 65-76.
136. HERRELL, W. E., COOK, E. N. e THOMPSON, L. T. — 1943 — Use of penicillin in sulfanamide resistant gonorrhoeal infections. *J. Am. Med. Ass.*, **122**: 289.
137. HERRELL, W. E. — 1944 — The clinical use of penicillin, an antibacterial agent of biological origin. *J. Am. Med. Ass.*, **124**: 622-627.
138. HERRELL, W. E. e HEILMAN, D. — 1943 — Tissue culture studies on cytotoxicity of bactericidal agents. I. Effects of gramicidin, tyrocidin and penicillin on cultures of mammalian lymph node. *Am. J. Med. Sci.*, **205**: 157-162.

139. HERRELL, W. E. e NICHOLS, D. R. — 1943 — The calcium salt of penicillin. Proc. Staff Meet. Mayo Clin., 18: 313-319.
140. HERRELL, W. E. — 1945 — Penicillin and other antibiotic agents. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.
141. HERWICK, R. P. e OUTROS — 1945 — Correlation of the purity of penicillin sodium with intramuscular irritation in man. J. Am. Med. Ass., 127: 74-76.
142. HOBBY, G. I. e DAWSON, M. H. — 1944 — Relationship of penicillin to sulfonamide action. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 56: 184-187.
143. HOBBY, G. L., MEYER, K. e CHAFFEE, E. — 1942 — Chemotherapeutic activity of penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 50: 285-288.
144. HOBBY, G. L., MEYER, K. e CHAFFEE, E. — 1942 — Activity of penicillin in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 50: 277-280.
145. HOBBY, G. L. e OUTROS — 1943 — The nature of action of penicillin. J. Bact., 45: 65.
146. HOBBY, G. L. e OUTROS — 1942 — The antibacterial action of penicillin. J. Bact., 43: 11-12.
147. HOLIDAY, E. R. — 1942 — The spectrographic examination of penicillin preparation. Brit. J. Exp. Path. 23: 115-119.
148. HOOPER, I. e OUTROS — 1944 — The identity of clavacin with patulin. Science, 99: 16.
149. HOTCHKISS, R. D. e DUBOS, R. S. — 1941 — The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*. J. Biol. Chem., 149: 155.
150. JAHIEL, R., GUBERMAN, E. e KAZDAR, R. — 1944 — Action of radioactive substances on the speed of growth of *Penicillium notatum* and the product on of a potent penicillin. Science, 100: 298.
151. JANEWAY, C. A. — 1941 — Method for obtaining rapid bacterial growth in cultures from patients under treatment with sulfonamides. J. Am. Med. Ass., 116: 941-932.
152. JOHNSON, H. C. e WALKER, A. E. — 1945 — Intraventricular penicillin. J. Am. Med. Ass., 127: 217-219.
153. KATZ, L. N. e ELEK, S. R. — 1944 — Combined heparin and chemotherapy in subacute bacterial endocarditis. J. Am. Med. Ass., 124: 149-152.
154. KEEFER, C. S. e OUTROS — 1943 — Penicillin in the treatment of infections. A report of 500 cases (Statement by the Committee on Chemotherapeutic and Other Agents, Division of Medical Sciences, National Research Council) J. Am. Med. Ass., 122: 1217-1224.
155. KIRBY, W. M. M. — 1944 — Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. Science 99: 452.
156. KOCHOLATY, W. — 1942 — Cultural characteristics of *Penicillium notatum* in relation to the production of antibacterial substance. Indication of the dual nature of the antibacterial substance, J. Bact., 44: 469-477.
157. KOCHOLATY, W. — 1943 — Purification and properties of penatin, the second antibacterial substance produced by *Penicillium notatum* Westling. Arch. Biochem., 2: 73-86.
158. KOCHOLATY, W. — 1943 — Purification and properties of the second antibacterial substance produced by *Penicillium notatum*. Science, 97: 186-187.

159. LACAZ, C. S. — 1944 — Comentários gerais sobre a penicilino-terapia. Revista de Medicina (C. A. O. C. de São Paulo), 28: 547-562.
160. LAGO, S. — 1940 — Sulfamidoterapia. Editora Científica — Rio de Janeiro, Brasil.
161. LAST, C. E. — 1945 — Instrument for continuous and accurate administration of penicillin intramuscularly. Brit. Med. J., 1: 122.
162. LAWRENCE, C. A. — 1943 — Sterility test for penicillin. Science, 98: 413-414.
163. LAWRENCE, C. A. — 1944 — Action of clarase upon penicillin. Science, 99: 15-16.
164. LEÃO, A. E. A. — Comunicação pessoal.
165. LEÃO, A. E. A., GUIMARÃES, F. N. e NOBREGA, G. — 1944 — Ensaios terapêuticos com penicilina. II. Sífilis (Nota prévia) Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 41: 237-145.
166. LEE, S. W. e OUTROS — 1944 — Improvements in the turbidimetric assay for penicillin. J. Biol. Chem., 152: 485-486.
167. LEWIS, M. R. — 1944 — The failure of purified penicillin to retard the growth of grafts of sarcoma in mice. Science, 100: 314-315
168. LIBBY, R. L. — 1945 — Oral administration of penicillin in oil. Science, 101: 178-180.
169. LIEBMAN, A. J., Mc QUARRIE, E. B. e PERLSTEIN, D. — 1944 — A standard penicillinase preparation. Science, 100: 527-528.
170. LIKELY, D. S. e SWIRSKY, M. Y. — 1943 — *Staphylococcus aureus* septicemia treated with penicillin, with report of drug side effects. J. Am. Med. Ass., 123: 956-958.
171. LINHARES, H. — 1944 — Substâncias antibióticas. Ação dos filtrados de cogumelos e bactérias sobre o vírus amarello neurotrópico. Hospital, 26: 327-397.
172. LINHARES, H. — 1944 — Da penicilina, numa revisão geral. Imprensa Médica (Rio de Janeiro) 367: 43-63.
173. LINS, E. E. — 1944 — Penicilina — A nova esperança da ciência. Progresso Farmacêutico (Nova York), 4: 7-11.
174. LOCHHEAD, A. E. e TIMONIN, M. — 1943 — The effect of glucose on penicillin potency tests. Canadian Pub. Health, 34: 236-240.
175. LOEWE, L. e OUTROS — 1944 — Combined penicillin and heparin therapy of subacute bacterial endocarditis. J. Am. Med. Ass., 124: 144-149.
176. LOURIE, E. M. e COLLIER, H. D. J. — 1943 — The therapeutic action of penicillin on *Spirochaeta recurrentis* and *Spirillum minus* in mice. Ann. Trop. Med. Paras., 37: 200-205.
177. LYDON, F. L. e COWE, W. R. S. — 1945 — Penicillin in gonorrhoea and syphilis with notes on two cases of dual infection. Brit. Med. J., 1: 110-111.
178. LYONS, C. — 1943 — Penicillin therapy of surgical infection in the U. S. Army. J. Am. Med. Ass., 123: 1006-1018.
179. MACIEL, J. J. — 1942 — Penicilina (Bibliografia) Gazeta Clínica (Rio de Janeiro) 40: 241-242.
180. MACLEAN, K. H. — 1937 — A modification of the cough plate method of diagnosis in whooping cough. J. Path. Bact., 45: 472-473.
181. MAC MAHAN, J. R. — 1944 — An improved short time turbidimetric assay for penicillin. J. Biol. Chem., 153: 249-258.

182. MAHONEY, J. F., ARNOLD, R. C. e HARRIS, H. — 1943 — Penicillin treatment of early syphilis. *Am. J. Pub. Health*, **33**: 1387-1391.
183. MAHONEY, J. R. e OUTROS — 1943 — Use of penicillin sodium in treatment of sulfonamide — Resistant gonorrhoea in men: Preliminary report. *Am. J. Syph. Gonorr. Ven. Dis.*, **31**: 164.
184. McDERMOTT, E. e OUTROS — 1945 — Oral penicillin. *Science*, **101**: 228-229.
185. McINTOSH, J. e SELBIE, F. R. — 1942 — Zinc peroxide, proflavine and penicillin in experimental *Clostridium welchii* infections. *Lancet*, **2**: 750-752.
186. McINTOSH, J. e SELBIE, F. R. — 1943 — Chemotherapeutic drugs in anaerobic infections of wounds. *Lancet*, **1**: 793.
187. McINTOSH, J. e SELBIE, F. R. — 1944 — Combined action of antitoxin and local chemotherapy on *Cl. welchii* infection in mice. *Lancet*, **2**: 224-225.
188. MCKEE, C. M. e RAKE, G. — 1942 — Biological experiments with penicillin. *J. Bact.*, **43**: 645.
189. MCKEE, C. M. e MCPHILLAMY, H. B. — 1943 — An antibiotic substance produced by submerged cultivation of *Aspergillus flavus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **53**: 247-248.
190. MCKEE, C. M., RAKE, G. e HOUCK, C. L. — 1944 — Studies on *Aspergillus flavus*. II. The production and properties of a penicillin like substance flavacidin. *J. Bac.*, **47**: 187-197.
191. MCKEE, C. M. e HOUCK, C. L. — 1943 — Induced resistance to penicillin of cultures of staphylococci, pneumococci, and streptococci. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **53**: 33-34.
192. MCKNIGHT, W. B., LOEWENBERG, R. D. e WRIGHT, W. L. — 1944 — Penicillin in gas gangrene. *J. Am. Med. Ass.*, **124**: 360.
193. MELLO, J. T. — 1937 — Da ação antagônica dos fermentos lácticos sobre algumas bactérias do grupo intestinal e sobre o *B. subtilis*. *Folha Médica (Rio de Janeiro)*, **18**: 535-538.
194. MESQUITA, E. P. — 1945 — Estafilocóccias. *Revista Inst. Adolfo Lutz (S. Paulo, Brasil)*, **4**: 1/2: 1-181.
195. MEYER, L. e OUTROS — 1942 — On penicillin. *Science*, **96**: 20-21.
196. MEYER, K., HOBBY, G. L. e CHAFEE, E. — 1943 — On esters of penicillin. *Science*, **97**: 205-206.
197. MEYER, K., HOBBY, G. L. e DAWSON, M. H. — 1943 — The chemotherapeutic effect of esters of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **53**: 100-104.
198. MILLES, H. L. — 1945 — A method of administering systemic penicillin. *Brit. Med. J.*, **1**: 118.
199. MINGOJA, Q. — 1943 — Penicilina versus sulfanilamida. *Arquivos de Biologia (S. Paulo, Brasil)*, **27**: 129-135.
200. MIRANDA, C. — 1944 — Purificação da vacina anti-vaciólica pelo emprego da penicilina. (Nota prévia) *Revista Brasileira de Medicina*, **1**: 919-920.
201. MITCHELL, R. e RAMINESTER, S. — 1944 — Penicillin, case report of patient who recovered from puerperal sepsis hemolytic streptococcus, septicemia. *A. J. Surg.*, **63**: 136-140.

202. MODERN, F., ILLA, R. e ARZENO, M. — 1944 — Algunos medios de cultivo para la preparación de penicilina. Rev. Inst. Bacteriológico Buenos Aires, **12**: 355-361.
203. MÜHSAM, R. — 1908 — Ueber Pyocyranasebehandlung der Diphtherie. Deutsche Med. Wehchr., **34**: 231-234.
204. NEGRONI, P. — 1944 — Estudios sobre la penicilina. I. Influencia de algunos factores físicos y químicos. Rev. Inst. Bacteriológico Buenos Aires, **12**: 299-308.
205. NEGRONI, P. e FISCHER, I. — 1944 — Estudios sobre la penicilina. II. Influencia de la fuente carbonada de nutrición. La Prensa Med. Argentina, **31**: 238-242.
206. NEGRONI, P. e FISCHER, I. — 1944 — Estudios sobre la penicilina. IV. Influencia de la fuente de nutrición nitrogenada. La Prensa Med. Argentina, **31**: 1-8.
207. NEGRONI, P. e FISCHER, I. — 1944 — Estudios sobre la penicilina. IV. Sobre la obtención de cepas de *Penicillium notatum* con buena actividad penicilínogena y su relación con la constitución genética. La Prensa Med. Argentina, **31**: 1938-1943.
208. NEGRONI, P. e FISCHER, I. — 1944 — Estudios sobre la penicilina. V. Influencia de la acción enzimática sobre la producción de penicilina. La Prensa Med. Argentina, **31**: 1944-1948.
209. NEGRONI, P., BALIÑA, A. e JACHESKY, L. — 1944 — Aislamiento del bacilo de Ducrey mediante el empleo de la penicilina. Rev. Argentina de Dermatosifilología, **28**: 285-287.
210. O'LEARY, P. A. e HERRELL, W. E. — 1944 — Penicillin in the treatment of late cutaneous syphilis: Report of case. Proc. Staff Meet. Mayo Clin., **19**: 20-22.
211. OSTWALD, E. J. e RANDALL, W. A. — 1945 — A cylinder guide for use in plate assay of penicillin. Science, **101**: 99-100.
212. OXFORD, A. E., RAISTRICK, H. e SMITH, G. — 1942 — Antibacterial substances from molds. II. Penicillic acid a metabolic product of *Penicillium puberulum* Bainier and *Penicillium cyclopium* Westling. Chemistry and Industry, **61**: 22-24.
213. PECK, F. B. — 1944 — Penicillin with special reference to its use in infections complicating diabetes. Am. J. Med. Sci., **208**: 581-596.
214. PHILPOT, F. J. — 1943 — A penicillin-like substance from *Aspergillus giganteus* Wehm. Nature, **152**: 725.
215. PICCALUGA, F. — 1943 — Antisépticos biológicos. I. Penicilina A. Rev. Med. Latino-Americana, **28**: 590-608.
216. PLUMMER, N. e OUTROS — 1945 — Penicillin therapy in hemolytic streptococcal pharyngitis and tonsillitis. J. Am. Med. Ass., **127**: 369-374.
217. POMES, A. F. e IWING, F. G. N. — 1945 — Lyophilization apparatus. Science, **101**: 22.
218. PONTECORVO, F. e GEMMELL, A. R. — 1944 — Colonies of *Penicillium notatum* and others moulds as models for the study of population genetics. Nature, **154**: 532-534.
219. POWELL, H. M. e JAMIESON, W. A. — 1942 — Response of sulfonamide-fast pneumococci to penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **49**: 387-389.

220. PRADO, F. C. — 1943 — Penicilina a nova arma antibacteriana. *Anais Paulistas Med. Cir.*, 45: 421-430.
221. PRADO, F. C. — 1944 — O emprêgo clínico da penicilina. *O Hospital (Rio de Janeiro)*, 26: 399-406.
222. PRATT, SPOEHR e OUTROS — 1944 — Chlorellin, an antibacterial substance from chlorella. *Science*, 99: 351-352.
223. PRIEST, W. S. — 1944 — In. "Abstract of Discussion on Antibiotic Agents". *J. Am. Med. Ass.*, 124: 637.
224. PULVERTAFT, R. J. V. — 1943 — Local therapy of war wounds with penicillin. *Lancet*, 2: 314-346.
225. PUTNAM, L. E., WELCH, H. e OLANSKY, S. — 1945 — Treatment of gonorrhoea and studies of intramuscular irritations. *J. Am. Med. Ass.*, 127: 204-205.
226. RAISTRICK, H. — 1943 — Patulin in the common cold. *Lancet*, 2: 625-634.
227. RAISTRICK, H. e SMITH, G. — 1941 — Antibacterial substances from molds. I. Citrinin, a metabolic product of *Penicillium citrinum* Thom. *Chemistry and Industry*, 60: 828-830.
228. RAIZISS, G. W. — 1944 — Penicillin in oil suspension. Bacteriostatic spirocheticidal agent. *Science*, 100: 412-413.
229. RAKE, G. e JONES, H. — 1943 — A rapid method for estimation of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 189-190.
230. RAKE, G., JONES H. e MACKEE, C. M., — 1943 — Antiluminescent activity of antibiotic substances. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 52: 136.
231. RAMMELKAMP, C. H. — 1942 — A method for determining the concentration of penicillin in body fluids and exsudates. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 51: 95-97.
232. RAMMELKAMP, C. H. e KEEFER, C. S. — 1943 — The absorption, excretion and distribution of penicillin. *J. Clin. Investigation*, 22: 425-437.
233. RAMMELKAMP, C. H. e MAXON, T. — 1942 — Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51: 386-389.
234. RAMMELKAMP, C. H. e KEEFER, C. S. — 1943 — The absorption, excretion and toxicity of penicillin administered by intrathecal injection. *Am. J. Med. Sci.*, 205: 342-350.
235. RAMMELKAMP, C. H. e HELM, J. D. Jr. — 1943 — Studies on the absorption of penicillin from the stomach. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 324-327.
236. RAMMELKAMP, C. H. e BRADLEY, S. E. — 1943 — Excretion of penicillin in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 53: 30-32.
237. RAMMELKAMP, C. H. e HELM, J. D. Jr. — 1943 — Excretion of penicillin in bile. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 31-34.
238. RAPER, K. B., ALEXANDER, D. F. e COGHILL, R. D. — 1944 — Penicillin. II. Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species. *J. Bact.*, 48: 637-659.
239. RAPER, K. B. e COGHILL, R. D. — 1943 — "Home made" penicillin (A warming) *J. Am. Med. Ass.*, 123: 1135.
240. REID, R. D. — 1935 — Some properties of bacterial inhibitory substances produced by a mold. *J. Bact.*, 29: 215-221.

241. RIBEIRO, D. A. e SAMPAIO, S. — Considerações sobre a penicilinoterapia na leishmaniose cutâneo-mucosa americana. (Trabalho apresentado à Secção de Dermatologia e Sifiligrafia, da Associação Paulista de Medicina aos 12 de junho de 1945)
242. RICHARDS, A. N. — 1943 — Penicillin statement released by the Committee on Medical Research. *J. Am. Med. Ass.*, 122: 235.
243. RIVAROLA, J. B. — 1944 — La penicilina en la purification de la pulpa vacunal. *Rev. Brasileira de Medicina*, 4: 483-484.
244. ROBERTSON, J. M. — 1944 — Penicillin in bone infections. *Brit. Med. J.*, 1: 519-521.
245. ROBERTS, E. C. e OUTROS — 1943 — Penicillin B, an antibacterial substance from *Penicillium notatum*. *J. Biol. Chem.*, 147: 47-58.
246. ROBINSON, H. J. e WAKSMAN, S. A., — 1942 — Studies on the toxicity of antinomycin. *J. Pharmacol.*, 74: 25-32.
247. ROBINSON, H. J. — 1943 — Toxicity and efficacy of penicillin. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 77: 70-79.
248. ROBINSON, G. H. e WALLACE, J. E. — 1943 — An inoculated penicillin dressing. *Science*, 98: 329-330.
249. ROBSON, J. M. e SCOTT, G. I. — 1942 — Effect of certain chemotherapeutic agent on experimental eye lesion produced by *Staphylococcus aureus*. *Nature*, 149: 581-582.
250. ROBSON, J. M. e SCOTT, G. I. — 1943 — Local chemotherapy in experimental lesion of eye produced by *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 1: 100-103.
251. ROCHA, R. V. — 1943 — Contribuição ao estudo da penicilina — Estudo experimental electrocardiográfico das infecções intravenosas de penicilina. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Porto Alegre.
252. ROCHA, R. V. — 1944 — A penicilina e seu emprêgo no tratamento das infecções. *Anais Fac. Med. Porto Alegre*, 5: 74-121.
253. ROCHA, G. L. 1945 — Penicilina + arsênico no tratamento da sífilis recente. *O Hospital*, 27: 815-821.
254. ROMANSKY, M. J. e RITTMAN, G. E. — 1944 — A method of prolonging the action of penicillin. *Science*, 100: 196-198.
255. ROSA, M. C. — 1944 — Penicilina (Estudo químico e terapêutico). *Ilustração Médica (Rio de Janeiro)*, 10: 19-28.
256. RUBBO, S. D. e GILLESPIE, J. M. — 1940 — Para-aminobenzoic acid as bacterial growth factor. *Nature*, 146: 838-839.
257. SALLE, A. J. — 1943 — Fundamental principles of bacteriology. 2.^a ed., pg. 277. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York and London.
258. SALMANN, L. — 1943 — Penicillin and sulfadiazine in the treatment of experimental intraocular infection with pneumococcus. *Arch. Ophth.*, 30: 426-436.
259. SALMANN, L. — 1944 — Penicillin and sulfadiazine in the treatment of experimental intra-ocular infections with *Staphylococcus aureus* and *Clostridium welchii*. *Arch. Ophth.*, 31: 54-63.
260. SALMANN, L. e MEYER, K. — 1944 — Penetration of penicillin into the eye. *Arch. Ophth.*, 31: 1-7.

261. SCHMIDT, W. H. e MOYER, A. J. — 1944 — Penicillin. Method of assay. *J. Bact.*, 47: 199-209.
262. SCHMIDT, L. A. e SESLER, C. L. — 1943 — Development of resistance to penicillin by pneumococci. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 53: 353-357.
263. SCHNITZER, L. J. CAMAGNI, L. J. e BUCK, M. — 1943 — Resistance of small colony variants (G forms) of staphylococcus towards the bacteriostatic activity of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 53: 75-78.
264. SHWARTZMAN, G. — 1944 — Enhanced production of penicillin in fluid medium containing cellophane. *Science*, 100: 390-392.
265. SHWARTZMAN, G. — 1944 — Inhibition of *E. coli* by penicillin. *Science*, 100: 477-478.
266. SELBIE, F. R. — 1940 — Inhibition of action of sulphanilamide in mice by p-aminobenzoic acid. *Brit. J. Exp. Path.*, 21: 90-93.
267. SILVERTHORNE, N. — 1943 — Penicillin in the treatment of haemolytic staphylococcal septicaemia. *Canadian Ass. J.*, 49: 516-517.
268. SMITH, L. D. e HAY, T. — 1942 — The effect of penicillin on the growth and morphology of *Staphylococcus aureus*. *J. Franklin Inst.*, 233: 598-602.
269. SOLTYS, M. A. — 1944 — Antibiotic action of *Aspergillus fumigatus* against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 154: 550-551.
270. SOPHIAN, L. H. e CÖNNOLLY, V. J. — 1944 — The use of penicillin topical application. *Am. J. Med. Sci.*, 208: 577-580.
271. SPINK, W. W., FERNS, V. e VIONS, J. J. — 1944 — Comparative resistance of staphylococci to penicillin and sodium sulfathiazole. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 52: 207.
272. STENBERG, T. H. e TURNER, T. B. — 1944 — The treatment of sulfonamide resistant gonorrhoea with penicillin sodium. *Resuts in 1.686 cases. J. Am. Med. Ass.*, 126: 157-161.
273. STOKES, J. L. e WOODWARD, Jr. C. R. — 1943 — Formation of tyrothricin in submerged cultures of *Bacillus brevis*. *J. Bact.*, 46: 83-88.
274. SWEET, L. K. e OUTROS — 1945 — The treatment of pneumococci meningitis with penicillin. *J. Am. Med. Ass.*, 127: 263-267.
275. TAYLOR, H. G. — 1943 — Growth *Penicilium notatum* on various media and the development of an antibacterial substance. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 52: 299-301.
276. TAYLOR, P. H. e HUGHES, K. E. A. — 1944 — Infective dermatoses treated with penicillin. *Lancet*, 1: 780-784.
277. TILLET, W. S., CAMBIER, M. J. e HARRIS, W. H. J. — 1943 — Sulfonamide fast pneumococci. A clinical report of two cases of pneumonia together with experimental studies on effectiveness of penicillin and tyrothricin against sulfonamide-resistant strains. *J. Clin. Investigation*, 22: 249-255.
278. TILLET, W. S., CAMBIER, M. J. e MCKORMACK, J. E. — 1944 — The treatment of lobar pneumonia and pneumococcal empyema with penicillin. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 20: 142-178.
279. TODD, E. W., TURNER, G. S. e DREW, L. G. W. — 1945 — The temporary character of "fastness" of staphylococci to penicillin. *Brit. Med. J.*, 1: 111-113.

280. TOLOVI, J. — 1943 — Penicilina. Rev. Química e Farmácia (Rio de Janeiro), 8: 5-9.
281. THOM, C. — 1930 — The penicillia, Baltimore.
282. T'UNG, T. — 1943 — Concentration and preservation of crude penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 54: 103-105.
283. TRUMPER, M. e HUTTER, A. M. — 1944 — Prolonging effective penicillin action. Science, 100: 432-434.
284. TURNER, J. C., HEATH, F. K. e MAGASANIK, B. — 1943 — Inhibition of urease by penicillin. Nature, 152: 326.
285. TURNER, T. D. e STENBERG, T. A. — 1944 — Management of the venereal diseases in the army. J. Am. Med. Ass., 124: 133.
286. UBATUBA, F. e VIEIRA, G. — 1944 — Estudos sobre a bartonolose I.-A. bartonolose dos ratos splenectomizados e a penicilina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 41: 21-44.
287. UNGAR, J. — 1943 — Synergistic effect of para-aminobenzoic acid and sulphapyridin on penicillin. Nature, 152: 245-246.
288. UNGAR, J. — 1944 — Penicillinase from *B. subtilis*. Nature, 154: 236-237.
289. VAN BRUGGEN, J. T. e OUTROS — 1943 — Penicillin B. Preparation, purification and mode of action. J. Biol. Chem., 148: 365-378.
290. VAN SLYKE, O. J., ARNOLD, R. C. BUCHHOLTZ, M. — 1943 — Penicillin therapy in sulfonamide resistant gonorrhoea in man. Am. J. Pub. Health, 33: 1392-1394.
291. VAUDREMER, A. — 1913 — Action de l'extrait filtré d'*Aspergillus fumigatus* sur les bacilles tuberculeux. C. R. Soc. Biol., 74: 278-280.
292. VILLISTAEDT, H. — 1938 — L'analyse chromatographique et ses applications. Ed. Hermann etc. Cie., Paris.
293. VOGEL, J. A. — 1943 — Penicillin for all. Physicians can by following simple directions supply themselves with germ — fighter from mold for local treatment of infections. Science News Letter, 44: 350-351.
294. WAKSMAN, S. A. e WOODRUFF, H. B. — 1940 — Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 45: 609-614.
295. WAKSMAN, S. A. e TISHLER, M. — 1942 — The chemical nature of actinomycin an anti-microbial substance produced by *Actynomyces antibioticus*. J. Biol. Chem. 142: 519-528.
296. WAKSMAN, S. A. e WOODRUFF, H. B. — 1942 — Streptothricin, a new selective and bactericidal agent particularly active against Gram-negative bacteremia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49: 207-210.
297. WAKSMAN, S. A. — 1943 — Production and activity of streptothricin. J. Bact., 46: 299-310.
298. WAKSMAN, S. A. e GEIGER, W. B. — 1944 — The nature of the antibiotic substances produced by *Aspergillus fumigatus*. J. Bact., 47: 391-397.
299. WAKSMAN, S. A. e WOODRUFF, H. B. — 1940 — The soil as source of microorganism antagonistic to disease — producing bacteria. J. Bact., 40: 581-600.
300. WAKSMAN, J. A. e WOODRUFF, H. B. — 1942 — Selective antibiotic action of various substances of microbial Orig. J. Bact., 44: 373-384.

301. WAKSMAN, S. A. HORNING, E. S. e SPENCER, E. L. — 1943 — Two antagonistic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus clavatus*, and their antibiotic substances. *J. Bact.*, 45: 233-248.
302. WAKSMAN, S. A. — 1943 — Nature and mode of action of antibiotic substances. *J. Bact.*, 45: 64.
303. WAKSMAN, S. A., HORNING, E. S. e SPENCER, E. L. — 1942 — The production of two antibacterial substances, fumigacin and clavacin. *Science*, 96: 202-203.
304. WEINTRAUB, R. L. — 1943 — Chemotherapeutic agents from microbes. *Smithsonian Report* — publicação 3761, pp. 545-568.
305. WELCH, H. e OUTROS — 1944 — The relative toxicity of six salts of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55: 246-248.
306. WELCH, H. e OUTROS — 1944 — Penicillin X. Successful treatment of gonorrhoea with a single intramuscular injection. *J. Am. Med. Ass.*, 126: 1024.
307. WELSCH, M. — 1941 — Bactericidal substances from sterile culture media and bacterial culture. With special reference to the bacteriolytic properties of actinomycetes *J. Bact.*, 42: 801.
308. WHITE, E. C. e HILL, J. H. — 1943 — Studies on the antibacterial products formed by molds. I. Aspergillic acid, a product of strain of *Aspergillus flavus*. *J. Bact.*, 45: 433.
309. WHITE, P. D. — 1945 — Notes on the treatment of substance bacterial endocarditis encountered in 88 cases at the Massachusetts General Hospital during the six year period 1939 to 1944 (inclusive) *Annals of Internal Med.*, 22: 61-74.
310. WIESNER, B. P. — 1942 — Bactericidal effects os *Aspergillus clavatus*. *Nature*, 149: 356.
311. WILKINS, W. H. e HARRIS, G. C. M. — 1942 — Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. I. Preliminary examination of 100 fungal species. *Brit. J. Exp. Path.*, 23: 166-169.
312. WILKINS, W. H. e HARRIS, G. C. M. — 1943 — Investigation into the production of bacteriostatic substance by fungi. Preliminary examination of a second 100 fungal species. *Brit. J. Exp. Path.*, 24: 141-143.
313. WILLIAMS, H. L. e NICHOLS, D. R. — 1943 — Spreading osteomyelitis of the frontal bone treated with penicillin. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 18: 467-469.
314. WILSON, U. — 1943 — The assay of penicillin. *Nature*, 152: 476.
315. ZECHMEISTER, L. e CHOLNOKY, L. — 1941 — Principles and practice of chromatography. Tradução de Bacharach, A. L. e Robinson, F. A. — Chapman e Hall Ltd., Londres.
316. ZOBELL, C. E. — 1943 — The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bact.*, 46: 39- 56.
317. ZOOK, H. D., OAKWOOD, T. S. e WHITMORE, F. C. — 1944 — Isolation of ergosterol from *Penicillium notatum*. *Science*, 99: 427-428.