

DEPARTAMENTO DE MOLESTIAS INFECTUOSAS E PARASITARIAS

Diretor: Prof. Dr. Laerte M. Guimarães

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGANICA E BIOLÓGICA

Diretor: Prof. Dr. Fonseca Ribeiro

SÔBRE A AÇÃO BACTERIOSTÁTICA E BACTERICIDA DE PRODUTOS DE CONDENSAÇÃO DE SULFA E FORMALDEÍDO

(BACTERIOSTATIC AND BACTERICIDE ACTION OF DRUGS FROM
CONDENSATION OF SULFANILAMIDE WITH FORMALDEHYDE)

DINOBERTO CHACON DE FREITAS
Tecnologista

O. F. RIBEIRO
Tecnologista

1 gráfico no texto

Após as observações primordiais de DOMACK, em 1935, sôbre a ação anti-bacteriana dos compostos azóicos sulfamídicos, muito se tem realizado nesse campo de estudos, à procura de novos derivados que possam ser empregados na luta contra os germes.

Em 1948, BHATNAGAR e col., trabalhando com um novo composto sulfamídico, o "6257" e MEIER & DRUEY (citado por BHATNAGAR), obtiveram resultados plenamente satisfatórios, em experiências contra o vibrião colérico. Tal composto, condensação do sulfatiazol com o formol, mostrou-se eficiente tanto "in vitro" como "in vivo".

Em 1949, COLLIER e col., estudando a ação vibriostática das fezes de camundongos, a cuja dieta eram incluídos compostos sulfamídicos — sulfaguanidina e formocibazol* — ressaltam a potência dêste último.

Interessados por tais trabalhos, demos início à presente pesquisa, estudando um novo composto, produto de condensação da sulfamida com o formol. As experiências realizadas tiveram resultados claros e convincentes, permitindo-nos conclusões que justificam a apresentação do presente trabalho.

Tínhamos por escopo, a princípio, apenas o estudo da atividade anti-bacteriana dessa nova droga. Todavia, no decorrer das provas, orientamos a pesquisa no sentido de esclarecer o seu modo de ação, bem como o daquela experimentada por BHATNAGAR.

Aliás, tal orientação se impunha, em princípio, desde que tínhamos em mãos um produto resultante de duas substâncias *anti-bacterianas*: — a sulfanilamida, de comprovada ação bacteriostática — e o formol — indiscutivelmente um ger-

* Formo-sulfatiazol dos Laboratórios Ciba.

micida de grande potência, embora com limites estreitos na indicação terapêutica, eis que, sua ação sobre as proteínas o torna um veneno citoplasmático.

PARTE EXPERIMENTAL

Da condensação da sulfanilamida com o formol resulta um composto de solubilidade muito baixa, cuja estrutura química parece encerrar duas moléculas de sulfa e três de formol. Tal composto será designado por nós “formo-sulfa”, bem como denominaremos “formo-tiazol” ao composto obtido da condensação do sulfatiazol com o formol.

Obtenção: — Dissolver em 200 cm³ de água em ebulição 100 g de sulfanilamida e juntar aos poucos, com agitação constante, 50 cm³ de aldeído fórmico a 37% (p/v), previamente diluído em 250 cm³ de água. Forma-se logo um precipitado branco; êste é lavado três vêzes com água fria, para se retirar o excesso de formol e, em seguida, filtrado ou centrifugado, para retirar o máximo de água retida, deixando-se depois a temperatura ambiente, com ventilação, até secar. Obtém-se assim um pó branco, inodoro, insípido, facilmente pulverizável.

Em tôdas as provas trabalhamos com uma suspensão de “formo-sulfa” a 20%, em água destilada com 2% de goma arábica (maior estabilidade da suspensão), de modo a cada 0,1 cm³ corresponder a 20 mg de substância. Quantidades menores eram obtidas por diluição.

Meio de cultura: — Utilizamos a água de peptona a 0,5%, pH 7,4-7,8, na qual os germes utilizados se desenvolvem com facilidade.

Germes: — *Micrococcus pyogenes aureus* (Am. Wood); *Salmonella pullorum*; *E. coli*; *S. abortivoequina*; *Pasteurella avicida*.

Depois de verificarmos a uniformidade quase absoluta da ação da “formo-sulfa” sobre essas amostras, passamos a trabalhar com a *S. pullorum*.

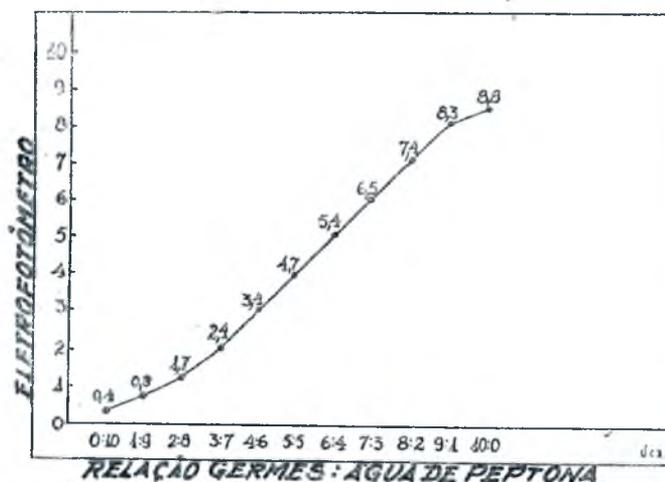
Para os diversos testes, trabalhamos com suspensões de germes correspondentes ao tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland (150 milhões de germes por cm³).

Encontramos no eletrofotômetro de Fisher (Filtro B-425 — Microcélula) um meio conveniente para avaliar a atividade da “formo-sulfa”, através do grau de turvação no meio de cultura. Partindo de um tubo com 10 cm³ de água de peptona, na qual a *Salmonella pullorum* se desenvolvera em 24 horas a 37°C, fizemos diluições progressivas, de modo a obter uma “curva de turvação”. Os

extremos dessa curva eram, de um lado, o meio de cultura sem germes e, de outro, a cultura desenvolvida em 24 horas a 37°C.

Obtivemos assim valores que nos permitiram, em diversas provas, julgar a potência anti-bacteriana das drogas utilizadas.

CURVA DE TURVAÇÃO PARA "S. PULLORUM"



Experiência 1.ª: — No intuito de verificar, de um modo geral, a atividade da "formo-sulfa", experimentamo-la com os seguintes germes: *S. pullorum*, *S. abortivoequina*, *Escherichia coli*, *Pasteurella avicida* e *Micrococcus aureus*.

Os resultados são apresentados na tabela I.

Dos tubos onde havia limpidez, fizemos sementeiras em placas de agar simples. Após 24 horas de incubação a 37°C, as placas se mostraram totalmente estéreis, contrastando com aquelas sementeiras para controle, com material dos tubos com turvação moderada, onde houve formação abundante de colônias.

Essa experiência nos indicou que a "formo-sulfa" possui atividade bactericida.

Experiência 2.ª: — Diante do resultado anterior, estabelecemos um protocolo comparativo entre sulfas e compostos sulfo-formolados. Acrescentamos a essa experiência o ácido p-aminobenzóico (PABA), com o qual faríamos posteriormente provas de antagonismo em relação à sulfa e o derivado formolado desse ácido, "formo-PABA", conseguido também por condensação.

A fim de acompanhar a atividade dessas substâncias, fizemos sementeiras em placas de agar com intervalos de seis horas. Os resultados são encontrados na tabela II.

TABELA I

Tubos	Água de peptona cm ³	Formo-sulfa mg	Germe *	Observações após 24 hs. a 37°C
1	10	20	<i>S. pullorum</i>	Limpidez
2	10	15	"	"
3	10	10	"	"
4	10	5	"	Turvação moderada
5	10	—	"	Turvação intensa
6	10	20	<i>S. ab.-equina</i>	Limpidez
7	10	15	"	"
8	10	10	"	"
9	10	5	"	Turvação moderada
10	10	—	"	Turvação intensa
11	10	20	<i>B. coli</i>	Limpidez
12	10	15	"	"
13	10	10	"	Turvação ligeira
14	10	5	"	Turvação moderada
15	10	—	"	Turvação intensa
16	10	20	<i>P. avicida</i>	Limpidez
17	10	15	"	"
18	10	10	"	"
19	10	5	"	Turvação moderada
20	10	—	"	Turvação intensa
21	10	20	<i>Estafilococo</i>	Limpidez
22	10	15	"	"
23	10	10	"	"
24	10	5	"	Turvação moderada
25	10	—	"	Turvação intensa

(*) 0,1 cm³ da suspensão equivalente ao tubo 0,5 MF (150 milhões de germes).

TABELA II

Tubos	Sol. fis. 8,5% cm ³	MEIO DE CULTURA						<i>Salm. pullorum</i> cm ³	OBSERVAÇÕES				
		Água de peptona cm ³	Sulfa mg	Formo-sulfa mg	Sulfatiazol mg	Formo-tiazol mg	PABA mg		F-PABA mg	0 horas	6 horas	12 horas	18 horas
1	10							0,1	—	—	—	—	—
2		10						0,1	—	C	C	C	C
3		10	20					0,1	—	C	25x10 ⁻⁶	C	C
4		10		20				0,1	—	C	NC	NC	NC
5		10			20			0,1	—	C	20x10 ⁻⁶	C	C
6		10				20		0,1	—	C	NC	NC	NC
7							20	0,1	—	C	NC	NC	NC
8								20	0,1	—	NC	NC	NC

C = crescimento confluyente

NC = nenhum crescimento

Desta tabela depreende-se que a atividade dos compostos formolados é muito superior em relação aos seus congêneres não formolados. Além disso, verificou-se uma nítida ação bactericida do ácido p-aminobenzóico sobre a *Salmonella pullorum*. Nota-se que há crescimento de germes nas primeiras seis horas, iniciando-se depois a ação bactericida. Ora, se a sulfamida e o sulfatiazol agem por bacteriostase, então a destruição das bactérias só poderia correr por conta do formol. De fato, pesquisando êste, no sobrenadante do meio de cultura, obtivemos confirmação da nossa hipótese *. Naturalmente, sendo os compostos sulfo-formolados muito pouco solúveis, a libertação de formol só ocorreria após algum tempo, permitindo uma certa multiplicação de germes (primeiras seis horas). O "formo-PABA" seria mais solúvel e libertaria o formol mais rapidamente, impedindo desde logo o desenvolvimento de germes no tubo que o continha.

Experiência 3.^a: — Ocorreu-nos verificar se as bactérias intervinham nessa libertação de formol. Elas poderiam se utilizar da "formo-sulfa" em seu metabolismo, cindindo a molécula e libertando formol. Por outro lado, um simples fenômeno de hidrólise explicaria a presença de formol no meio de cultura. Depois de verificarmos que a reação do formol, quando procedida imediatamente após a colocação do composto formolado no meio de cultura, era negativa, organizamos o protocolo da tabela III.

TABELA III

Tubos	Água de peptona cm ³	Formo-sulfa mg	Formotiazol mg	Formo-PABA mg	Salm. pullorum cm ³	Resultado após 24 hs. a 37°C	
						Crescimento	Formol
1	10				0,1	+	—
2	10	20			0,1	—	++
3	10	20			—	—	++
4	10		20		0,1	—	+
5	10		20		—	—	+
6	10			20	0,1	—	+
7	10			20	—	—	+

Comparando tubos contendo compostos formolados e germes, com outros contendo apenas os primeiros, verificamos não haver diferença entre os mesmos, quanto à libertação de formol, sendo o resultado indicativo de hidrólise.

A ação bactericida evidenciou-se mais uma vez nessa experiência, fazendo crer que ela dependia sempre do formol. Aliás, isso não seria difícil de ser verificado, desde que fôssem esclarecidas algumas minúcias:

(*) Pesquisa do formol pela reação da fenil-hidrazina.

a) colocando-se no meio de cultura uma substância que neutralize o formol liberado, a “formo-sulfa” deixará de agir ou pelo menos perderá a ação bactericida. Essa substância poderia ser o bissulfito de sódio;

b) inibindo a sulfa, pelo ácido p-aminobenzóico, e não resultando disso o impedimento da libertação do formol, continuaríamos a presenciar a mesma ação bactericida anteriormente verificada.

Provas preliminares puderam demonstrar que o bissulfito de sódio, mesmo na quantidade de 20 mg, não afeta o desenvolvimento da *S. pullorum*, e que o PABA perde sua ação sobre esta bactéria em quantidade inferior a 5 mg, para 10 cm³ de água de peptona. A capacidade inibidora do PABA para com a sulfamida é assegurada na proporção de 1:10.

Experiência 4.^a: — Estabelecidas essas premissas, realizamos as experiências resumidas na tabela IV.

TABELA IV

Tubos	Água de peptona cm ³	Bissulfito de sódio mg	Formo-sulfa mg	PABA mg	Salm. pullorum cm ³	Resultado após 24 hs. a 37°C	
						Crescimento	Formol
1	10				0,1	+	—
2	10	10			0,1	+	—
3	10		20		0,1	—	+
4	10			2	0,1	+	—
5	10	10	20		0,1	+	—
6	10		20	2	0,1	—	+
7	10	10		2	0,1	+	—
8	10	10	20	2	0,1	—	—

Dêstes resultados concluímos:

a) que, uma vez neutralizado o formol, a “formo-sulfa” perde a ação bactericida;

b) que o PABA não inibiu a ação da “formo-sulfa”.

Experiência 5.^a: — Como tivemos ocasião de comentar, a “formo-sulfa” parece encerrar uma proporção de duas moléculas de sulfamida para três de formol, totalizando um peso molecular próximo a 430. Se assim fôr, o formol corresponderá a mais ou menos 20% do total.

Para verificar se todo o formol integrante do composto era liberado, na base admitida de 20%, fizemos as experiências resumidas na tabela V.

TABELA V

Tubos	Água de peptona cm ³	Formo-sulfa mg	Formol mg	Salm. pullorum cm ³	Leituras no fotômetro	Resultado	
						Aspecto	Formol
1	10			0,1	0,5	límpido	—
2	10	12		0,1		"	—
3	10	10		0,1	0,7	límpido	+
4	10	8		0,1	0,6	"	+
5	10	6		0,1	4,2	turvo	—
6	10	4		0,1	4,2	"	—
7	10	2		0,1	5,3	"	—
8	10	1		0,1	5,3	"	—
9	10		2,4	0,1		límpido	+
10	10		2,0	0,1		"	+
11	10		1,6	0,1		"	+
12	10		1,2	0,1		"	+
13	10		0,8	0,1		"	+
14	10		0,4	0,1		"	+
15	10		0,2	0,1	0,4	"	+
16	10		0,1	0,1	0,4	"	+
17	10			0,1	8,3	turv. intensa	—

De tais resultados concluímos que:

a) Se, de fato, o formol ocupa 20% da molécula, não é totalmente liberado em 24 horas. Compare-se o tubo n.º 5 com o tubo n.º 12;

b) pelo valor encontrado no eletrofotômetro, comparando os tubos 8 e 17, verifica-se que 1 mg de "formo-sulfa" exerceu ainda uma ação bacteriostática eficiente;

c) sempre que a quantidade de "formo-sulfa" foi insuficiente para impedir a multiplicação da *S. pullorum*, a pesquisa do formol foi negativa, o que reforça os dados encontrados anteriormente com respeito ao modo de ação da droga.

Sempre que pesquisávamos formol pela reação da fenil-hidrazina, notávamos que a reação nos tubos que continham "formo-sulfa" era sempre mais intensa do que aquela observada nos tubos que continham "formo-tiazol". Isso sugere uma liberação maior de formol pela "formo-sulfa", dependendo de seu maior índice de dissociação.

Os compostos sulfo-formolados, em razão de pequena solubilidade, teriam sua grande indicação terapêutica no tratamento das infecções intestinais. Êles preenchem um requisito fundamental, que é o da concentração no trato intestinal. Sendo pouco ou quase nada solúveis, podem atravessar todo o intestino sem ser praticamente absorvidos, ao mesmo tempo que libertam formol.

COLLIER, quando verificou a ação vibriostática das fezes de camundongos, tratados com sulfa-tiazol-formol, não deixou transparecer que tal ação fôsse devida ao formol. As nossas experiências indicam fortemente esta possibilidade.

Restava-nos ainda um detalhe a esclarecer. Vínhamos confirmando, de prova em prova, que a sulfamida funcionava como veiculadora de formol, ainda mais que a presença de peptona no meio de cultura deveria prejudicar sua possível ação bacteriostática contra a *S. pullorum*. Seria natural que outras substâncias, a exemplo da “formo-PABA”, produtos também de condensação de moléculas, apresentassem propriedades bactericidas “in vitro”. Estudando o “Tanofórmio”, condensação do tanino com formol, verificamos que, com 5 mg. os tubos semeados permaneciam límpidos após 24 horas a 37°C. No entretanto, a pesquisa do formol no sobrenadante, mesmo após destilação, resultava sempre negativa. De outro lado, a semeadura em placas de agar demonstrava formação de colônias. Julgamos, a princípio, tratar-se de uma forte ação bacteriostática, mas, depois de experimentarmos somente o tanino, verificamos que êste tem o poder de precipitar a peptona, criando assim um ambiente impróprio à multiplicação dos germes, sem contudo afetar o “inoculum”. Cremos ser êste o fenómeno que se passa “in vitro” com o “Tanofórmio”. É possível que “in vivo” haja condições diferentes e que tal substância liberte também formol.

CONCLUSÕES

Pelo que foi exposto, parece-nos plausível admitir as seguintes conclusões:

- 1) — É possível obter-se um produto de condensação de sulfanilamida com aldeído fórmico.
- 2) — Tal produto, por nós denominado “formo-sulfa”, apresenta “in vitro” propriedades bactericidas muito acentuadas, sobre os germes experimentados.
- 3) — A “formo-sulfa” age como bactericida, indiferentemente sobre germes Gram positivos e Gram negativos, pelo menos “in vitro”.
- 4) — Tanto a “formo-sulfa” como o “formo-tiazol” agem por libertação de formol, sendo êste o responsável pela forte ação bactericida desses compostos.

5) — A “formo-sulfa” pode ser experimentada no tratamento de infecções intestinais, porque a sua pouca solubilidade permite que atravesse todo o trato digestivo sem ser praticamente absorvida.

6) — O ácido p-aminobenzóico tem propriedades bactericidas contra a *Salmonella pullorum* “in vitro”.

7) — O ácido p-aminobenzóico, condensado com formol, dá origem a um composto de grande atividade bactericida, e que age como as sulfas formoladas, pela libertação de formol.

8) — Desde que as sulfanilamidas condensadas com aldeído fórmico agem como veículo do formol, outras moléculas poderão substituí-las, talvez com maiores vantagens.

CONCLUSIONS

1) — It is possible to obtain a product from the condensation of sulfanilamide with formaldehyde.

2) — Such a product, called by the AA. “formo-sulfa”, shows “in vitro” strong bactericide properties, against the following germs: *S. pullorum*, *S. ab. equina*, *P. avicida*, *E. coli* and *M. aureus*.

3) — Both the “formo-sulfa” and the “formo-thiazol” liberate formaldehyde. There is considerable indication in the experiments described that the formaldehyde is responsible by the bactericide action of these drugs.

4) — The “formo-sulfa” may be experimented in intestinal infections, because its low solubility.

5) — The p-aminobenzoic acid has bactericide properties against *Salmonella pullorum* “in vitro”.

6) — The p-aminobenzoic acid, condensed with formaldehyde, originated a compound of great bactericide activity, which acts as the “formo-sulfa”, by liberation of formaldehyde.

7) — If the sulfanilamide condensed with formaldehyde acts as a simple formaldehyde carrier, other molecules may replace it, perhaps with better advantages.

BIBLIOGRAFIA

- American Public Health Association — 1941 — Standard methods for the examination of dairy products. 8th. ed. New York, Am. Public Health Association
- BHATNAGAR, S. S. — SÁ, J. DE — FERNANDEZ, F. & DIVEKAR, P. V. — 1948 — Chemotherapy of cholera with a new sulphonamide compound ("6257"). *British Med. Jour.*, 719-23
- COLLIER, H. O. J. — HALL, IRIS F. and WATERHOUSE, PAMELLA D. — 1949 — Studies in the chemotherapy of cholera. 1: The laboratory evaluation of remedies for cholera. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.*, 43(2):155-63
- DOMAGK, G. — HEGLÉR, C. — 1944 — Quimioterapia de las infecciones bacterianas. Trad. 2.ª ed. alemana. Buenos Aires, E. Labor S. A.