

ESTUDO PRELIMINAR COM 2-(4' TIAZOLIL) BENZIMIDAZOL QUIMIOTERÁPICO ATIVO "IN VITRO" CONTRA FUNGOS PATOGENICOS DO HOMEM

Ricardo NEGRONI (1), William BARBOSA (2), Margarida Dobler KOMMA (3)
e Onofre Pereira MACHADO (4)

RESUMO

Os Autores, após breve comentário sobre a terapêutica das micoses, relatam seus estudos preliminares, "in vitro" com o 2-(4'Tiazolil) benzimidazol "Tiabendazol", fármaco de síntese, isolado primeiramente nos Estados Unidos por BROWN & col.⁴ e também sintetizado no Brasil por CAPELL em 1962, de grande atividade anti-embrionária, e que demonstrou atividade antifúngica sobre os dermatófitos.

Referem-se à ação do medicamento sobre os principais agentes das micoses superficiais e profundas e constataram que "in vitro" o Tiabendazol se comportou como agente antimicótico de largo espectro. Atuando em concentração de 0,78 µg/ml sobre todos os agentes das "tinhas" e na mesma concentração inibe parcialmente o crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis*, da *Phialophora verrucosa* e da *Fonsecaea pedrosoi*, e totalmente o do *Histoplasma capsulatum*. Em concentrações um pouco maiores, variáveis de 3.125 µg/ml a 25 µg/ml, inibe o crescimento de todos os agentes das micoses profundas, exceto da *Allescheria boydii* que somente é inibida parcialmente na concentração de 100 µg/ml.

O Tiabendazol não demonstrou ação sobre o gênero *Candida*.

INTRODUÇÃO

A terapêutica das micoses é um problema médico, ainda não inteiramente resolvido: embora algumas micoses sejam relativamente de fácil manejo, muitas delas são de terapêutica trabalhosa, pouco eficaz, e mesmo perigosa. No que tange a determinadas micoses profundas, como a maduromicose e a blastomicose de Jorge Lobo praticamente não se dispõe de terapêutica. Daí o interesse sempre renovado dos pesquisadores em bus-

ca de novas sínteses e pesquisas experimentais no campo da terapêutica micológica^{1, 2, 3, 8, 11, 12, 13}.

No presente trabalho relatamos as experiências iniciais com o Tiabendazol, substância química sintetizada por BROWN & col.⁴, e que foi estudada extensamente do ponto de vista farmacológico e terapêutico — experimental em animais e no homem, principal-

Trabalho realizado no Instituto Central de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás com o auxílio parcial de verbas provenientes do Convênio com o Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (que possibilitou a montagem do Laboratório de Micologia) e do Conselho Nacional de Pesquisas, que financiou a vinda do Dr. Ricardo Negróni, que financiou a vinda do Dr. Ricardo Negróni

- (1) Professor, convidado, de Micologia do I.C.P.T., chefe de trabalhos práticos da Cadeira de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Buenos Aires.
- (2) Chefe do Depto. de Medicina Tropical do I.C.P.T. da Universidade Federal de Goiás, Brasil
- (3) Chefe do Depto. de Parasitologia do I.C.P.T. da Universidade Federal de Goiás
- (4) Instrutor de ensino do Depto. de Microbiologia do I.C.P.T. da Universidade Federal de Goiás, Brasil

mente quanto a sua ação como anti-helmínico. Em 1962 no Brasil, baseado nos trabalhos de BROWN & col.⁴ foi o medicamento também sintetizado por CAPELL¹⁵ e desde então tem sido muito empregado, inicialmente, em experimentação clínica terapêutica na estrogiloidose^{5, 7, 9, 10, 14, 15} e posteriormente com anti-helmínico de escolha nessa verminose.

Quimicamente o tiabendazol, corresponde ao 2-(4' Tiazolil) Benzimidazol, cuja fórmula empírica é C₁₀ H₇ N₃ S, de peso molecular de 201,3. A droga apresenta-se como um produto cristalino, branco, insípido, inodoro, que funde a 298-300°C com decomposição, pouco solúvel em água, em álcool, ésteres e solventes clorados, solúvel em álcool etílico, à quente, e em dimetil-formanida. É um pouco estável, tanto em forma sólida como em solução. Os testes biológicos disponíveis de experimentação em animais não nos fornecem as qualidades farmacocinéticas, tais como nível sanguíneo, nível tissular e eliminação. Sabemos, contudo, que ele é rapidamente absorvido e excretado pelo organismo.

O estudo da toxicidade observada em coelhos, visando principalmente ao possível efeito hepatotóxico, demonstrou perfeita tolerância da droga e ausência daqueles efeitos, mesmo nas doses de 1 g/kg/pêso, dose 20 vezes maior do que a considerada terapêutica¹⁵.

Os ensaios clínicos terapêuticos experimentais largamente realizados na estrogiloidose demonstram efeitos colaterais de pequena intensidade e habitualmente representados por tonturas, náuseas, vômitos e cefaléia^{5, 10, 14, 15}. Os efeitos colaterais parecem estar relacionados diretamente com a dosagem do medicamento, sendo mais intensos quando se empregam dose única de 50 mg/kg/pêso e quase desprezíveis quando se reduz a dose (5-6-) ou quando se utilizam doses fracionadas em dias consecutivos.

Baseados na ação anti-embriogênica do medicamento e interessados na pesquisa terapêutica antifúngica ocorreu-nos testar a eficácia *in vitro* do produto sobre os fungos patogênicos do homem, visando a possibilidade de seu emprêgo em terapêutica humana. Nossos interesses se robusteceram, quan-

do nos deparamos com os primeiros trabalhos sobre a atividade do Tiabendazol, contra os fungos das dermatomicoses, micetomas e cromomicose^{3, 8, 13}.

MATERIAL E MÉTODOS

O meio de cultura empregado foi o proposto por MARIAT & SATRE¹² e por LACAZ & MINAMI¹¹, e tem composição química definida, não possuindo nitrogênio protéico^{11, 12}.

Composição do meio de cultura:

PO ₄ H Na ₂ 12 H ₂ O	1,8 g
PO ₄ H ₂ K	0,25 g
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	0,50 g
ClK	0,50 g
PO ₄ (NH ₄) ₂	1 g
Asparagina	1 g
Glicose	10,0 g
Água destilada	1.000 ml

O pH do meio foi ajustado a 7 e o meio de cultura distribuído em tubos de ensaio (5 ml para cada tubo), esterilizando-se em seguida em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Com base no trabalho de BLANK & REBELL³ o Tiabendazol foi diluído em solução 0,1 N de HCl a razão de 10 g/ml. A partir dessa solução-mãe efetuaram as diluições seguintes no meio de cultura básico: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, empregando-se ao mesmo tempo um tubo com meio básico livre da droga, para controle do crescimento.

Foram estudados os seguintes fungos patogênicos: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporotrichum schenckii*, *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Madurella grisea*, *Allescheria boydii*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon beigeli*, *Cladosporium werneckii*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Nocardia asteroides*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Torulopsis grabrata*, pertencentes às micotecas do Centro de Micolo-

gia da Faculdade de Ciências Médicas de Buenos Aires e do Instituto Central de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás.

Uma vez semeadas, incubaram-se as culturas à temperatura ambiente, durante 15 dias, salvo no caso do *Paracoccidioides brasiliensis*, que foi incubado durante 30 dias.

RESULTADOS

Os resultados obtidos, na experimentação, estão expressos no Quadro I.

DISCUSSÃO

Pelos resultados acima obtidos constatamos ser o 2-(4'Tiazolil) benzimidazol, um antimicótico de largo espectro, que demonstrou *in vitro* intensa ação sobre os agentes das dermatomicoses, inibindo totalmente seu crescimento na concentração de 0,78 µg/ml. É, particularmente digno de nota a intensa ação inibidora que exerce sobre o *Cladosporium werneckii*.

A ação da droga destaca-se, outrossim, sobre a *Phialophora verrucosa* e *Fonsecaea pedrosoi*, agentes da cromoblastomicose verru-

QUADRO I

Resultados obtidos "in vitro" com o Tiabendazol sobre fungos patogênicos

Fungos	INIBIÇÃO parcial µg/ml	INIBIÇÃO total µg/ml
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	0,78	3,125
<i>Histoplasma capsulatum</i>	—	0,78
<i>Coccidioides immitis</i>	3,125	12,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	12,5	25
<i>Sporotrichum schenckii</i>	3,125	12,5
<i>Phialophora verrucosa</i>	0,78	3,125
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	0,78	1,56
<i>Madurella grisea</i>	3,125	6,25
<i>Allescheria boydii</i>	100	—
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,5	100
<i>Trichosporon beigeli</i>	0,78	1,56
<i>Cladosporium werneckii</i>	—	0,78
<i>Nocardia asteroides</i>	25	100
<i>Microsporum canis</i>	—	0,78
<i>Microsporum gypseum</i>	—	0,78
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	—	0,78
<i>Trichophyton rubrum</i>	—	0,78
<i>Trichophyton tonsurans</i>	—	0,78
<i>Epidermophyton floccosum</i>	—	0,78
<i>Candida albicans</i>	Não foi inibido	Não foi inibido
<i>Candida tropicalis</i>	Não foi inibido	Não foi inibido
<i>Torulopsis grabata</i>	25	100

cosa (cromomicose), cujos medicamentos empregados até hoje têm sido pouco eficientes.

Cumpre-nos ressaltar também a ação do medicamento sobre a *Madurella grisea*, agente de maduromicose, que até hoje não tem terapêutica satisfatória. É presumível que o emprêgo do medicamento seja eficaz, quer por via oral, quer por circulação extra-corpórea regional em casos escolhidos, uma vez que as soluções do fármaco são estáveis^{4, 15}.

A atividade muito intensa sobre o *Histoplasma capsulatum* sugere a possibilidade do seu emprêgo na histoplasmose; como se sabe esta micose responde de maneira diferente à terapêutica, na dependência da cepa regional; é assim que se comporta em relação à sulfa, cepas de *Histoplasma capsulatum* da Argentina, sendo ineficientes em relação aos dos Estados Unidos, motivo que obriga naquele País ao uso da Anfotericina B, agente antimicótico, realmente útil mas de grande limitação, devido às reações colaterais, locais e gerais, imediatas e tardias. O mesmo se poderia dizer quanto ao *Coccidioides immitis* em relação a Anfotericina B, que também *in vitro* é muito sensível a esse novo agente antifúngico.

Quanto ao *Paracoccidioides brasiliensis*, embora o Tiabendazol tenha se mostrado ativo em concentrações também muito baixas, 0,78 µg/ml, e a micose por ele determinada constituir ainda um problema de monta em vista da cronicidade da doença, nada podemos adiantar sobre a exequibilidade de seu emprêgo. Novos trabalhos serão necessários neste campo a fim de se demonstrar o valor dessa terapêutica.

Em cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, recentemente isoladas de doentes não tratados, constatamos *in vitro* idêntica sensibilidade ao Tiabendazol.

A necessidade de melhor conhecimento sobre a tolerância do homem e dos animais ao medicamento, quando usado por tempo prolongado; nos impediu de iniciar essa experimentação clínica. Contudo os testes de toxicidade sobre o parênquima hepático, já realizados em animais, e a longa experiência na terapêutica anti-helmíntica, faz-nos supor da possibilidade de seu emprêgo.

De qualquer maneira abre-se um novo campo de pesquisa a ser palmilhado, que po-

derá trazer, assim esperamos, grande avanço na terapêutica das micoses profundas.

SUMMARY

Preliminary study on the action of 2-(4' Thiazolyl)-Benzimidazole, a drug with in vitro activity against pathogenic fungi of man

After a brief commentary on the therapeutics of mycoses, the Authors report their preliminary *in vitro* studies with the 2-(4' Thiazolyl)-Benzimidazole "Thiabendazole", primarily synthesized in the United States by BROWN et al., in 1961 and later, in 1962, by CAPELL in Brasil. This drug has a strong anti-embryogenic activity, and was demonstrated to be effective against dermatophytoses.

The action of the drug on the main agents of deep and superficial mycoses is described, and the finding that Thiabendazole displays *in vitro* a large spectrum of anti-mycotic activity, is reported. In a final concentration of 0.78 µg per ml of culture medium, Thiabendazole was effective against all the agents of *Tineae* and *Histoplasma capsulatum*, partially inhibiting the growth of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi*. In a concentration varying from 3.125 to 25 µg per ml, growth inhibition of all the deep-mycoses agents was observed, exception being made to *Allescheria boydii*, whose growth was somewhat restrained by a 100 µg per ml drug concentration.

Thiabendazole failed to show any action on the different strains of *Candida* tested.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Usafarma S.A., pelo fornecimento do Tiabendazol e à Professora Margarida Dobler Komma, pelos trabalhos de pesquisa realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, W. & DAHER, R. R. — Estudo preliminar com uma nova sulfa de ação lenta — RO 4/4393 na Blastomicose Sul Americana. *Rev. Goiana Med.* 12:27-35, 1966.

NEGRONI, R.; BARBOSA, W.; KOMMA, M. D. & MACHADO, O. P. — Estudo preliminar com 2-(4' Thiazolil) Benzimidazol, quimioterápico ativo *in vitro* contra fungos patogênicos do homem. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:113-117, 1968.

2. BARBOSA, W.; CEZARINO Neto, J. B.; SOUZA, M. do C. M. de & MACHADO, A. de J. — Experiência preliminar com 2-sulfamilamido-5alquil-pirimidina (BT-402), nova sulfa eficaz na terapêutica da Blastomycose Sul Americana. Trabalho apresentado no III Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Salvador, Bahia, 1967. (Em publicação).
3. BLANK, H. & REBELL, G. — Preliminary and short report. Thiabendazole activity against the fungi of Dermatophytosis, mycetomas and chromomycosis. *J. Invest. Derm.* 44:219-220, 1965.
4. BROWN, H. D.; MATZUK, A. R.; ILVES, F. R.; PETERSON, L. H.; HARRIS, S. A.; SARETT, L. H.; EGERTON, J. R.; YAKSTIS, J. J.; CAMPBELL, W. C. & CUCKLER, A. C. — Antiparasitic drugs. IV — 2-(4'-Thiazolyl)-Benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Amer. Chem. Soc.* 83:1764-1765, 1961.
5. CAMPOS, R.; AMATO NETO, V. & PUPO, A. de A. — Considerações sobre o fenômeno de intolerância ao tiabendazol e relato de um caso. *Hospital* (Rio) 66:131-135, 1964.
6. CHAIA, G. & CUNHA, A. S. — Novo esquema terapêutico com o Tiabendazol, na estrogiloidiase humana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:173-176, 1966.
7. CROCE, J.; CAMPOS, R.; AMATO NETO, V.; PIRES, C. D. A.; CASTRO, A. C. M.; LAURENTI, R. & ALBUQUERQUE, F. J. M. — Tratamento da estrogiloidose pelo Tiabendazol. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:194-197, 1963.
8. FLEISCHMAJER, R.; GOLDSTEIN, J. & NICHOLAS, L. — Preliminary report on the antimycotic effect of topical Thiabendazole "in vivo". *Curr. Ther. Res.* 7:558-561, 1965.
9. FRANZ, K. H. — Clinical trials with thiabendazole against human strongiloidiasis. *Amer. J. Trop. Med.* 12:211-214, 1963.
10. JORGE, J. & BARBOSA, W. — Tratamento da estrogiloidose pelo Tiabendazol. *Rev. Goiana Med.* 10:135-141, 1964.
11. LACAZ, C. da S. & MINAMI, P. S. — Ação "in vitro" da sulfamida RO 4/4393 sobre o *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hospital* (Rio) 64:603-607, 1963.
12. MARIAT, F. & SATRE, J. — Action de la sulfaméthoxyypyridazine sur quelques actinomycètes aerobies pathogenes. *Bull. Soc. Path. Exot.* 54:63-70, 1961.
13. ROBINSON, H. J.; PHARES, F. H. & GRAESSLE, O. E. — Antimycotic properties of Thiabendazole. *J. Invest. Derm.* 42:479-482, 1964.
14. RODRIGUES DA SILVA, J.; COURA, L. P.; CARVALHO, H. T. & ALMEIDA LOPES, P. I. — Tratamento da estrogiloidiase. Resultados preliminares do ensaio com um novo anti-helmintico, o Tiabendazol. *Hospital* (Rio) 63:1247-1264, 1963.
15. VILELA, M. P.; RODRIGUES, L. D.; CAPPELL, J. L.; BRANDÃO, J. A.; MARTIRANI, I. & ZUCATO, M. — O emprêgo do Tiabendazol no tratamento da estrogiloidose e de outras parasitoses humanas. *Hospital* (Rio) 62:691-710, 1962.

Recebido para publicação em 9/6/1967.